

ANA CAROLINA DOS SANTOS FONSECA

**Caracterização de rearranjos cromossômicos
citogeneticamente equilibrados associados
a quadros clínicos**

**Characterization of karyotypically balanced
chromosomal rearrangements associated
with clinical features**

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética**

**São Paulo
2015**

ANA CAROLINA DOS SANTOS FONSECA

**Caracterização de rearranjos cromossômicos
citogeneticamente equilibrados associados
a quadros clínicos**

***Characterization of karyotypically balanced
chromosomal rearrangements associated
with clinical features***

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Biologia/Genética

São Paulo
2015

Orientadora: **Dra. Angela M. Vianna Morgante**

DOS SANTOS FONSECA, ANA CAROLINA

Caracterização de rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados associados a quadros clínicos

292 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo,
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1. Rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados
2. *Mate-pair sequencing*
3. Hibridação genômica em *microarray*

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética de Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo concedidos à orientadora (FAPESP CEPID 1998/14254-2; CEPID 2013/08028-1) e à aluna (FAPESP 2011/14293-4; 2013/01146-9).

A Deus

Aos meus familiares

Aos meus amigos

Agradecimentos

Agradeço:

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e ao Wilhelm Johannsen Centre for Functional Genome Research da Universidade de Copenhague, pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Dra. Angela M. Vianna Morgante, pela orientação neste projeto, por todos os ensinamentos ao longo de oito anos, pela amizade e a confiança depositada em mim.

Ao Dr. Niels Tommerup, pela orientação da parte do projeto desenvolvida em Copenhague, pelas sugestões e ajuda que me ofereceu no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Kikue Terada Abe e à equipe médica do Hospital Sarah - Brasília, pela colaboração .

Ao Dr. Mads Bak, pelo auxílio e ensinamentos sobre *next generation sequencing*.

Ao Dr. Paulo Otto, pelos auxílios e ensinamentos clínicos.

À Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pelos ensinamentos e apoio ao longo desses anos.

À Dra. Ana Cristina Krepischi e à Dra. Carla Rosenberg, pelos ensinamentos sobre a-CGH. À Dra. Juliana F. Mazzeu, pelos primeiros ensinamentos.

Às Dras. Simone Aparecida Siqueira da Fonseca, Sylvie Antonini e Larissa Fontes, pela possibilidade de dar continuidade a seus trabalhos.

Aos funcionários da Universidade de São Paulo e da Universidade de Copenhague, particularmente Maria Raimunda Pinheiro, Laurinda de Fátima Baptista, Paulo Rogério Camargo, Maria Teresa Auricchio e Maraísa Sebastião, pela colaboração e apoio neste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Humana e da Universidade de Copenhague, Fátima, Mara, Mana, Gustavo, Leandro, Adriano, José, Ana Carla, Dayane, Rodrigo, Tatiane, Ian, Helena, Renan, Juliana, Rafaella, Larissa, Jacaré, Lilian e Nappor, pela ajuda, amizade e momentos de descontração ao longo dos anos.

Aos amigos da época da graduação Michelle, Mariana, Paula, Priscila, Érica, Aryana, Lyz, Simone, Cláudia, Diana, Daniela, Bruno, Rodrigo, Ivan, Patrícia, Aline e Fernanda, pela amizade e incentivo nos felizes anos do curso de Biologia.

À família dos pacientes, pela colaboração.

Aos meus amigos queridos, pelo apoio e amizade ao longo dos anos.

À minha família, pela compreensão, atenção e incentivo em todos os momentos.

A Deus, por me ter dado força em todos os momentos da minha vida.

Índice

I. INTRODUÇÃO	2
I.1 Técnicas de estudo de alterações estruturais cromossômicas.....	2
I.2 Mecanismos de formação de alterações estruturais cromossômicas.....	6
I.3 Mecanismos patogênicos associados a rearranjos citogeneticamente equilibrados.....	12
• Interrupção de genes pelas quebras cromossômicas.....	13
• Formação de gene híbrido.....	16
• Efeito de posição.....	17
• Dissomia uniparental.....	21
• Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos.....	23
II. OBJETIVOS	28
III. PACIENTES E MÉTODOS	30
III.1 Pacientes	30
III.2 Métodos	30
III.2.1 Estudo cromossômico	30
Preparações cromossômicas.....	30
Identificação dos rearranjos cromossômicos.....	31
Mapeamento dos pontos de quebra por FISH.....	31
III.2.2 Busca de microdeleções e duplicações	36
III.2.3 Caracterização dos rearranjos cromossômicos por <i>mate-pair sequencing</i> (MPS).....	38
Preparação das bibliotecas <i>mate-pair</i>	38
Processamento de dados e interpretação dos resultados.....	42
III.2.4 Sequenciamento Sanger dos segmentos de junção dos rearranjos	43
III.2.5 Padrão de inativação do cromossomo X	44
Metilação do gene <i>AR</i>	44
III.2.6 Análise da expressão dos genes <i>LMNB1</i> , <i>MARCH3</i> e <i>FBN2</i>	45
PCR quantitativo em tempo REAL (qt-PCR).....	45
IV. CARACTERIZAÇÃO DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS: DO CARIÓTIPO AO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	47
IV.1 Introdução	48
IV.2 Metodologia	48
IV.3 Resultados e discussão	48
IV.3.1 Investigação dos rearranjos por aCGH.....	48
IV.3.2 Investigação dos rearranjos por FISH	49
IV.3.3 Investigação dos rearranjos por MPS	56
IV.4 Conclusões	61
V. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS ASSOCIADOS A QUADROS CLÍNICOS: MECANISMOS PATOGÊNICOS	64
V.1 Introdução	64
V.2 Metodologia	64
V.3 Resultados e discussão	64
V.3.1 Perdas e ganhos de segmentos cromossômicos.....	64
V.3.2 Genes truncados pelos pontos de quebra.....	66
V.3.3 Alteração da região reguladora de genes.....	67
V.4 Conclusões	70

VI. GENES CANDIDATOS PARA QUADROS CLÍNICOS ASSOCIADOS A REARRANJOS CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS ESPORÁDICOS OU HERDADOS DE GENITOR AFETADO.....	73
VI.1 Introdução	73
VI.2 Pacientes e Métodos.....	73
VI.3 Resultados e discussão	74
VI.3.1 Rearranjos em que não foram detectadas alterações submicroscópicas na análise por aCGH.....	75
Translocações t(2;18)(q33;q21.3) (BCR A16) e t(11;18)(q13.1;q21.31) (BCR A23).....	75
• Translocação t(2;18) (BCR A16).....	75
Paciente.....	75
Investigação da t(2;18) por FISH, MPS e aCGH	75
Genes afetados pela translocação cromossômica	76
• Translocação t(11;18) (BCR A23).....	77
Investigação da t(11;18) por MPS e aCGH	77
Genes afetados pela translocação cromossômica	77
As translocações t(2;18) e t(11;18) e o quadro clínico dos portadores.....	78
• Translocação t(14;15)(q13;q22.1) (BCR A25)	81
Paciente.....	81
Investigação da t(14;15) por MPS e aCGH	81
Genes afetados pela translocação cromossômica	81
A translocação t(14;15) e o quadro clínico do portador	81
• Translocação t(10;21)(q21.2;q22.2) (BCR A9).....	84
Paciente	84
Investigação da t(10;21) por FISH, MPS e aCGH	84
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico	84
A translocação t(10;21) e o quadro clínico do portador	87
• Translocação t(4;18)(p15.2;q11.2) (BCR A9).....	93
Paciente.....	93
Investigação da t(4;18) por FISH, MPS e aCGH	93
Genes afetados pela translocação cromossômica	95
A translocação t(4;18) e o quadro clínico do portador	95
• Translocação t(9;20)(q22.3;p13) (BCR A11)	97
Paciente	97
Investigação da t(9;20) por MPS e aCGH.....	97
Genes afetados pela translocação cromossômica	98
A translocação t(9;20) e o quadro clínico do portador	98
• Inversão inv(12)(q21q23) (BCR A10)	100
Paciente.....	100
Investigação da inversão por FISH, aCGH e MPS.....	100
Gene afetado pela inversão cromossômica	101
A inversão inv(12) e o quadro clínico do portador	102
• Inversão inv(17)(p11.2q21.3) (BCR A6)	104
Paciente.....	104
Investigação da inv(7) por FISH, MPS e aCGH	104
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico	104
Genes mapeados nos segmentos da deleção em 2q23.1	107

A inversão inv(17) e o quadro clínico do portador	107
• Translocação t(4;14)(q27;q13) (BCRA21).....	107
Paciente	107
Investigação da translocação por MPS e aCGH	108
Gene afetado pela translocação cromossômica	109
A translocação t(4;14) e o quadro clínico do portador	110
• Translocação t(2;16)(q35;q24.1) (BCR A7)	111
Paciente	111
Investigação da translocação por FISH, MPS e aCGH	111
A translocação t(2;16) e o quadro clínico do portador	112
VI.3.2 Translocações associadas a microdeleções.....	118
• Translocação t(6;18)(q13;q22)	118
Paciente	118
Investigação da translocação por FISH e aCGH.....	118
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	120
Genes afetados pelas microdeleções no cromossomo 18.....	120
A translocação t(6;18) e o quadro clínico do portador	120
• Translocação t(6;7)(q12;q31)	124
Paciente	124
Investigação da translocação por MPS e aCGH	125
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	125
A translocação t(6;7) e o quadro clínico do portador	125
• Translocação t(5;18)(q33.3;q21.1) (BCR A17)	129
Paciente	129
Investigação da translocação por MPS e aCGH	129
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	130
A translocação t(5;18) e o quadro clínico do portador	130
• Translocação t(1;2)(p34.3;q31) (BCR A22)	135
Paciente	135
Investigação da translocação por MPS e aCGH	135
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico	135
A translocação t(1;2) e o quadro clínico do portador.....	136
• Translocação t(10;21)(p13;q22)	140
Paciente	140
Investigação da translocação por MPS e aCGH	140
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico	142
Relação da alteração cromossômica com o quadro clínico.....	142
• Translocação t(X;17)(q21~22;p11.1)	147
Paciente	147
Investigação da translocação por MPS e aCGH	148
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	148
A translocação t(X;17) e o quadro clínico do portador	149
VI.3.3 Rearranjos complexos associado a microdeleções.....	152
• Translocação t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13) (BCR A1) ...	152
Paciente	153
Investigação da translocação por FISH, MPS e aCGH	153
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	154
O rearranjo t(7;10)ins(7;11) e o quadro clínico do portador ...	154
• Inserção ins(2)(p13q11.2q21),ins(12;18)(p11;q21.3q11.2) (BCR A3)	163
Paciente	163

Investigação da inserção por aCGH e MPS	164
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	166
A inserção ins(2) ins(12;18) e o quadro clínico do portador	166
• Translocação t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1) ..	171
Paciente	171
Investigação da translocação por aCGH e MPS.....	171
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	171
A translocação t(1;17;3;1;12;16) e o quadro clínico do portador.....	177
• Inserção ins(1)(q32.1p21p34.1)	178
Paciente	178
Investigação da inserção por aCGH.....	178
Genes afetados pela rearranjo cromossômico	178
A inserção ins(1) e o quadro clínico do portador.....	178
VI.3.4 Rearranjo cromossômico associado a microdeleções e microduplicações.....	180
• Inserção ins(16)(p13.1q23q12.1).....	180
Paciente.....	180
Investigação da inserção por aCGH e MPS	180
Genes afetados pelo rearranjo cromossômico.....	181
A inserção ins(16) e o quadro clínico do portador.....	181
VI.4 Conclusões.....	189
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	190
VII. A COMPLEXIDADE DE UM REARRANJO CROMOSSÔMICO FAMILIAL ASSOCIADO A PERDAS E GANHOS DE SEGMENTOS SUBMICROSCÓPICOS.....	193
VII.1 Introdução	193
VII.2 Pacientes e Métodos.....	193
VII.2.1 Pacientes.....	193
VII.2.2 Métodos.....	195
VII.3 Resultados.....	195
VII.4 Discussão	197
VII.5 Conclusões.....	207
VIII. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS ASSOCIADOS A QUADROS CLÍNICOS E HERDADOS DE GENITORES FENOTIPICAMENTE NORMAIS.....	209
VIII.1 Introdução	209
VIII.2 Metodologia	210
VIII.3 Resultados e discussão	210
VIII.4 Conclusões	219
IX. MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE REARRANJOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS: MAPEAMENTO DOS SEGMENTOS DE JUNÇÃO POR MATE-PAIR SEQUENCING E SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	221
IX.1 Introdução	221
IX.2 Material e métodos	223
IX.3 Resultados e discussão	223
IX.3.1 Mecanismos de formação de translocações.....	234
IX.3.2 Mecanismos de formação de inversões.....	237
IX.3.3 Mecanismos de formação de rearranjos complexos	237

IX.4 Conclusões	249
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	250
X. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	255
XI. ABSTRACT	261
XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	268

I. INTRODUÇÃO

I. Introdução

As anomalias cromossômicas ocorrem em cerca de seis a cada mil recém-nascidos. As mais comuns são as aneuploidias, porém as alterações cromossômicas estruturais representam cerca de 40% das alterações cromossômicas em recém-nascidos (Jacobs e Hassold, 1986).

As alterações cromossômicas, em sua maioria, constituem eventos esporádicos e, devido aos desequilíbrios de dose, o efeito fenotípico impede sua transmissão para a geração seguinte. Os rearranjos estruturais, entretanto, são predominantemente equilibrados e seus portadores geralmente não apresentam sinais ou sintomas clínicos. Esses rearranjos equilibrados podem, assim, ser transmitidos por seus portadores que, no entanto, possuem riscos reprodutivos aumentados; a segregação meiótica dos cromossomos participantes dos rearranjos e de seus homólogos normais pode levar à produção de gametas com o rearranjo estrutural em estado não equilibrado, resultando em abortos espontâneos, natimortos ou crianças nascidas vivas apresentando sinais clínicos. Estudos de casais com histórico de abortamento de repetição mostram que, em 3 a 6% daqueles que tiveram dois ou mais abortos consecutivos, um dos membros era portador de rearranjo equilibrado (Franssen et al., 2006).

I.1 Técnicas de estudo de alterações estruturais cromossômicas

Em 1956, Tjio e Levan mostraram que o número de cromossomos da espécie humana é 46. A partir desse momento foi possível associar anomalias cromossômicas específicas a doenças. Nos anos 70, foram desenvolvidos protocolos de coloração que produziam um padrão de bandas claras e escuras ao longo dos cromossomos (Caspersson et al., 1970; Drets e Shaw, 1971; Dutrillaux e Lejeune, 1971), totalmente reprodutível, permitindo a identificação de todos os pares de cromossomos, que eram anteriormente classificados apenas de acordo com o tamanho e a posição dos centrômeros. Alterações estruturais, como translocações, inversões, deleções e duplicações, passaram a ser identificadas com maior precisão.

Apesar dos avanços trazidos para a identificação dos cromossomos, as técnicas de bandamento aplicada a cromossomo metafásicos/prometafásicos permitem a detecção de alterações cromossômicas que afetem no mínimo 5 a 10 Mb. Mas o nível de resolução pode ser menor, dependendo do padrão de bandas do segmento afetado. O desenvolvimento de técnicas moleculares aplicadas à citogenética trouxe maior precisão

na caracterização dos rearranjos cromossômicos. Essas técnicas permitem a análise do genoma de forma global (*genome-wide*) ou alvo-dirigida, com diferentes graus de resolução (revisão em Speicher e Carter 2005; revisão em Feuk et al., 2006; Miller et al., 2010).

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), baseada na detecção de sondas de DNA hibridadas a sequências complementares em cromossomos, foi um avanço importante para os estudos citogenéticos. Nesse método, a sonda e o DNA alvo na lâmina são desnaturados, seguindo-se a hibridação das sequências complementares. Para visualização em microscópio de fluorescência, as sondas são ligadas diretamente a um fluorocromo ou são marcadas com um heptano (biotina ou digoxigenina), já conjugado a um fluorocromo ou reconhecido por um anti-heptano ligado a um fluorocromo. As sondas de DNA podem ser clonadas a partir de um cromossomo inteiro, no caso das bibliotecas cromossômicas ou a partir de um segmento específico, podendo ser sondas para sequências únicas ou repetitivas, como as centroméricas. No estudo de rearranjos cromossômicos equilibrados, a hibridação *in situ* fluorescente permite refinar a localização de pontos de quebra e identificar microdeleções ou duplicações nos cromossomos rearranjados.

A hibridação genômica baseada em *microarrays* constitui ferramenta efetiva para a detecção de perdas e ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos em indivíduos com deficiência mental ou malformações congênitas (Miller et al., 2010). Na técnica de hibridação genômica comparativa baseada em *microarray* de DNA (a-CGH), o DNA controle e o DNA teste, marcados com fluorocromos diferentes, competem pela hibridação a sondas fixadas e organizadas na superfície de uma lâmina; perdas e ganhos de segmentos são indicadas pela diferença na intensidade da fluorescência dos fluorocromos. Os primeiros *arrays* utilizavam sondas clonadas em BACs (cromossomos artificiais de bactérias), porém plataformas mais recentes têm oligonucleotídeos como alvos de hibridação. Outro tipo de *microarray* tem sondas de SNP, que permitem não somente a avaliação de desequilíbrios cromossômicos, mas a genotipagem. Nessa abordagem, a amostra de um único paciente é hibridizada ao *array* e alterações no número de cópias são detectadas pela comparação com hibridações de controles realizados separadamente (Speicher e Carter, 2005). Além de perdas e ganhos de segmentos, os *arrays* de SNP têm a vantagem de detectar perdas de heterozigose e permitir a determinação da origem parental de rearranjos esporádicos (Miller et al., 2010). A hibridação em *microarrays* aumentou o poder de resolução da análise

cromossômica global do nível de megabase para kilobase; consequentemente desequilíbrios cromossômicos não detectáveis pelas técnicas de bandamento passaram a ser identificados.

A aplicação de aCGH na análise de rearranjos cromossômicos equilibrados evidenciou a presença de desequilíbrios submicroscópicos em cerca de 25% dos rearranjos estudados (Gribble et al., 2005, Sismani et al., 2008, Baptista et al., 2008, Higgins et al., 2008, De Gregori et al., 2007, Schluth-Bolard et al., 2009, Gijbers et al., 2010, Feenestra et al., 2011). Rearranjo citogeneticamente equilibrado, é portanto, o melhor termo para designar esse tipo de alteração cromossômica (Chiang et al., 2012). A aplicação de aCGH tem permitido não somente detectar alterações submicroscópicas nos pontos de quebra citogenéticos, mas também alterações distantes a ele nos cromossomos rearranjados (Gribble et al., 2005; Sismani et al., 2008), essa uma vantagem em relação à técnica alvo-específico de FISH. Ao investigar o genoma todo e não apenas os cromossomos rearranjados, o aCGH permite identificar também desequilíbrios de cromossomos que não participam do rearranjo, mas que podem ser a causa do fenótipo (Morales et al., 2009).

Nos últimos anos várias técnicas denominadas de *next generation sequencing* (NGS) têm sido desenvolvidas (Scouarnec e Gribble, 2012). Os sequenciadores de NGS têm a capacidade de processar a sequência de milhões de *reads* em paralelo, enquanto que os sequenciadores baseados em capilares processam, no máximo, 96 sequências simultaneamente (Mardis et al., 2008). Por meio desse tipo de sequenciamento, a sequência de milhões de moléculas de DNA é determinada simultaneamente, após a preparação de fragmentos obtidos a partir bibliotecas, permitindo assim a produção de *reads*. As *reads* são alinhadas em relação a um genoma de referência e, consequentemente, variações de bases, pequenas inserções/deleções (in/dels), variações de números de cópias (>50pb) e rearranjos equilibrados são detectados (Scouarnec e Gribble, 2012). A aplicação de NGS no estudo de rearranjos citogeneticamente equilibrados aumentou o poder de resolução da análise do nível de megabase (cariótipo) e dezenas a centenas de kilobases (FISH e aCGH) para o nível de pares de bases (Chen et al., 2008; Halgren et al., 2012; Slade et al., 2010; Sobreira et al., 2011, Talkowski et al., 2011; Chiang et al., 2012; Kloosterman et al., 2012; Schluth-Bolard et al., 2013; Suzuki et al., 2014; Utami et al., 2014). Inicialmente os cromossomos derivativos eram isolados por *flow-sorting* (Chen et al. 2008; Chen et al. 2010). Com a diminuição da relação custo benefício do sequenciamento do genoma todo, o isolamento dos

cromossomos derivativos por *flow sorting* deixou de ser necessário, e atualmente bibliotecas *whole-genome* são utilizadas para o estudo de rearranjos equilibrados (Scouarnec e Gribble, 2012; Slade et al., 2010).

A estratégia de NGS mais eficiente para caracterizar rearranjos cromossômicos tem sido o sequenciamento por *paired-end reads*, em que os pares de *reads* são sequências curtas de ambas as extremidades de cada um dos milhões de fragmentos de DNA (insertos) que compõem as bibliotecas (revisão em Le Scouarnec e Gribble, 2012). Assim, apenas as extremidades dos insertos são sequenciados. Quando alinhados ao genoma de referência, pares de *read* devem estar mapeados a distância correspondente ao tamanho do inserto gerado pela biblioteca (revisão em Scouarnec e Gribble, 2012). O *clustering* de pelo menos três pares de *reads* discordantes sugere a presença de rearranjo cromossômico (Korbel et al., 2007). As deleções são identificadas por pares de *reads* que no genoma de referência estão mais distantes uma da outra. Já em inserções e duplicações em *tandem*, os pares de *reads* estão mais distantes do que no genoma de referência. Pares de *reads* que mapeiam na mesma fita de DNA indicam inversões. Pares de *reads* que mapeiam em cromossomos diferentes indicam a presença de translocação. O alinhamento de pares de *reads* delimita a extensão do segmento que contém o ponto de quebra em poucos kb, ou até mesmo, pares de bases.

No mapeamento de rearranjos cromossômicos equilibrados por *mate-pair sequencing*, utilizam-se insertos de aproximadamente 3 kb de extensão, o que aumenta a probabilidade de o inserto conter o ponto de quebra (pares de *reads* mapeados em cromossomos diferentes, no caso de translocações, ou que contêm orientações inversas, nas inversões) (Berglund et al., 2011; Talkowski et al., 2011; Halgren et al., 2012). Outra estratégia recentemente desenvolvida para o estudo de rearranjos equilibrados foi o sequenciamento por *paired-end* de bibliotecas construídas a partir de insertos mais extensos, com 7 a 11 kb de extensão (Utami et al., 2014).

Os intervalos das quebras definidos pelo mapeamento de pares de *reads* permitem posterior sequenciamento das junções dos fragmentos pelo método de Sanger e assim chegar aos mecanismos de formação dos rearranjos. Ao identificar e sequenciar múltiplos pontos de quebra simultaneamente, o uso de NGS também permite analisar rearranjos cromossômicos complexos (CCR), que contêm três ou mais quebras. As análises de CCR revelaram grande complexidade, com a identificação de múltiplas quebras, várias delas identificadas apenas por NGS (Talkowski et al., 2011; Kloosterman et al., 2012). Com base nesses resultados, mecanismos novos, como

chromothripsis, têm sido propostos para explicar a formação desses rearranjos complexos (Kloosterman et al., 2012). A aplicação de NGS trouxe também maior eficiência na identificação de genes candidatos aos quadros clínicos dos portadores dos rearranjos citogeneticamente equilibrados (Chen et al., 2008; Halgren et al., 2012; Slade et al., 2010; Sobreira et al., 2011).

Talkowski et al. (2011) admitem que, futuramente, com uma melhor relação custo-benefício das técnicas de NGS, os rearranjos cromossômicos serão mapeados e sequenciados, em larga escala, no nível de resolução de pares de base. Esse é o objetivo do *International Breakpoint Mapping Consortium* (IBMC) que, por meio de colaborações entre laboratórios de vários países busca saturar o genoma humano com pontos de quebras de rearranjos equilibrados detectados em indivíduos clinicamente normais ou portadores de alterações fenotípicas (Tommerup et al., 2015). Um possível obstáculo para a análise em larga escala de rearranjos é que esse tipo de alteração cromossômica é identificado inicialmente por técnicas de bandamento. Recentemente o sequenciamento *low coverage*, aliado ao aprimoramento das estratégias de filtragem dos dados de NGS, permitiu identificar rearranjos equilibrados mesmo sem sua detecção *a priori* no cariótipo; essa pode ser a estratégia futura para a identificação desse tipo de alteração estrutural (Dong et al., 2014).

Mesmo com o aumento da resolução dos *microarray*, a técnica de hibridação genômica não revela a presença de rearranjos cromossômicos equilibrados, porém detecta perda ou ganho de segmentos a eles associados. A hibridação genômica baseada em *microarray* também não é capaz de determinar a localização de duplicações. Dessa forma, futuramente, as técnicas de sequenciamento de nova geração, capazes de detectar alterações estruturais equilibradas e não equilibradas, devem substituir os *microarrays* no estudo de indivíduos com malformações congênitas ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor ou deficiência intelectual (Vergult et al., 2014). A identificação das quebras no nível de pares de bases é outra vantagem do NGS em relação ao *microarray*.

I.2. Mecanismos de formação de alterações estruturais cromossômicas

Quebras na dupla fita do DNA ocorrem nas células devido a uma variedade de agentes endógenos (metabolismo oxidativo, recombinação VDJ) ou exógenos (radiações ionizantes, agentes químicos). As principais vias de reparo de quebras na dupla fita são os mecanismos de *Non Allelic Homologous Recombination* (NAHR) e *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) (Symington e Gautier et al., 2011). Outro

mecanismo, similar ao NHEJ, é o e *microhomology-mediated end-joining* (MMEJ) (McVey et al., 2008)

O reparo das quebras na dupla fita do DNA pode originar alterações estruturais equilibradas e não equilibradas. No passado, os mecanismos de formação e as sequências participantes da maior parte dos rearranjos equilibrados eram pouco conhecidos devido às técnicas disponíveis para caracterizar as junções dos fragmentos (FISH, *Southern blotting*, *inverse-PCR* ou *long range PCR*) e permitir o sequenciamento pelo método de Sanger. O crescente conhecimento da sequência e da arquitetura do genoma humano e o desenvolvimento de técnicas de NGS tornaram factível a elucidação dos mecanismos de formação desses rearranjos cromossômicos.

A recombinação homóloga não alélica (NAHR) é o mecanismo responsável pela formação de alterações estruturais recorrentes. Esse é o mecanismo que origina a maioria das deleções e duplicações recorrentes, como a duplicação do cromossomo 17, que causa a doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo 1A (CMT1A; MIM 601097), e a deleção do cromossomo 7, que resulta na síndrome de Williams-Beuren (WBS; MIM 194050). Em geral, a recombinação ocorre entre repetições de poucas cópias (*Low Copy Repeats*, LCR), que têm entre 10 e 500 kb de extensão e compartilham mais de 95% de identidade; representam 5% a 10% do genoma humano. Mais raramente, elementos repetidos (*Short Interspersed Nuclear Elements*, SINE; *Long Interspersed Nuclear Elements*, LINE) também podem ser substratos para a recombinação homóloga não alélica (revisão em Shaw e Lupski, 2004). O mecanismo de NAHR também foi proposto para a formação da translocação recíproca recorrente t(4;8)(p16;p23). Ambos os pontos de quebra ocorrem em *clusters* de genes de receptores olfativos, sugerindo que a recombinação entre esses loci em 4p16 e 8p23 seja responsável pela formação do rearranjo (Giglio et al., 2001). No caso das translocações Robertsonianas, o emparelhamento de sequências repetitivas pericentroméricas, que teriam homologia em cromossomos acrocêntricos, facilitariam a transferência de braços cromossômicos, pela troca entre sequências emparelhadas em disposição invertida (revisão em Shaffer e Lupski, 2000). As translocações Robertsonianas e a t(4;8)(p16;p23) formam-se preferencialmente na gametogênese materna (Page et al., 1997; Giglio et al., 2002).

Outro mecanismo que atua na formação de rearranjos cromossômicos é a junção de extremidades não homólogas (NHEJ). Ocorrendo mais de uma quebra na dupla fita de DNA em uma célula, o reparo por NHEJ pode unir extremidades que não estavam contíguas, originando rearranjos estruturais. Inicialmente, as extremidades quebradas

emparelham-se com base na homologia de alguns poucos pares bases e sua junção ocorre após adição ou perda de alguns pares de base, tornando as fitas compatíveis (Gu et al., 2008).

Estudos em que foram sequenciadas junções das quebras de rearranjos citogeneticamente equilibrados, em indivíduos com malformações congênicas graves ou atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, mostraram que, raramente, são observadas sequências que, pela identidade compartilhada, poderiam ter mediado a formação do rearranjo por NAHR (Higgins et al., 2008; Lieber et al., 2010; Gohring et al., 2010) e depois da aplicação do NGS (Talkowski et al., 2011; Chen et al., 2008; Chen et al., 2011; Sobreira et al., 2011; Kloosterman et al., 2012; Chiang et al., 2012; Nazaryan et al., 2014; Schluth-Bolard et al., 2013; Suzuki et al., 2014; Utami et al., 2014). Por outro lado, nas junções dos rearranjos foram detectadas duplicações, inserções e deleções de poucos pares de base, uma indicação de NHEJ como mecanismo gerador do rearranjo. Esses trabalhos também evidenciaram que rearranjos equilibrados não recorrentes formam-se preferencialmente na espermatogênese (Borg et al., 2002; Ciccone et al., 2005; Thomas et al., 2010; Grossmann et al., 2010; Kloosterman et al. 2011).

Apesar de não ser encontrada homologia (>70pb) nas junções das quebras de rearranjos citogeneticamente equilibrados, em cerca de 30% deles, ocorre micro homologia de dois ou mais pares de bases entre as sequências participantes dos rearranjos (Chiang et al., 2012), sugerindo que mecanismos baseados em micro homologia (>70pb) possam contribuir também para a formação de alterações estruturais citogeneticamente equilibradas (Kloosterman et al., 2012). No entanto, micro homologia de 1 pb a 4 pb de extensão é frequentemente utilizada pelas enzimas do NHEJ e podem apenas refletir a ocorrência desse mecanismo (Ma et al., 2003; Lieber et al., 2010).

Um mecanismo de formação similar ao NHEJ, mas baseado em micro homologia é o MMEJ, em que o reparo de quebras de dupla fita do DNA requer micro homologia de 5 pb a 25 pb para alinhar as extremidades quebradas, antes de torná-las compatíveis (McVey et al., 2008). O processo de MMEJ sempre resulta em deleções, em geral maiores que as observadas no reparo por NHEJ (30-200pb; Kent et al., 2015); inserções também podem ocorrer, embora sejam raras.

A determinação das quebras no nível de pares de bases é necessária não somente para elucidar os mecanismos responsáveis pela sua formação, mas também para determinar a existência de estruturas secundárias do DNA que possam ter favorecido a

ocorrência das quebras. A translocação recíproca recorrente mais frequente, a t(11;22)(q23;q11), é um exemplo de rearranjo associado à formação de estruturas secundárias do DNA que criariam instabilidade genômica em loco específico (revisão em Kurahashi et al., 2010). Os pontos de quebra em 11q23 e 22q11 localizam-se em regiões ricas em AT, que formam estruturas palindrômicas denominadas, respectivamente, de PATRR11 e PATRR22 (*Palindromic AT-rich Repeats*, PATRR) (Kurahashi et al., 2000; Kurahashi et al., 2001; Kurahashi et al., 2007). A caracterização dos fragmentos de junção da t(11;22) localizou os pontos de quebras, em ambos os cromossomos, no centro das PATRR (Kurahashi et al., 2000). Pequenas regiões palindrômicas de DNA, como as PATRR, podem formar estruturas cruciformes de fita dupla que induziriam a instabilidade genômica, levando a quebra na dupla fita e formação das translocações (Kurahashi et al., 2004). A ausência de homologia e a presença de pequenas deleções nos pontos de quebra da t(11;22) sugerem que, após a quebra na dupla fita do DNA, o reparo é realizado via NHEJ (revisão em Shaffer e Lupski, 2000). A frequência relativamente alta da t(11;22) em espermatozóides de homens normais (Kurahashi et al., 2001b) e a origem paterna de t(11;22) esporádicas (Ohye et al., 2010) indicam que esse rearranjo se origina na espermatogênese.

Nos últimos anos, o uso de ferramentas, como a hibração genômica em *microarray* e o sequenciamento de nova geração, para a caracterização dos pontos de quebra e junção dos rearranjos cromossômicos, vem revelando sua complexidade e novos mecanismos têm sido propostos para explicar a formação desses rearranjos, como *chromotripsis* e mecanismos baseados em erros na duplicação do DNA, como *Fork Stalling and Template Switching - FoSTeS* (Lee et al., 2007) e *microhomology-mediated break-induced replication* (MMBIR; Hastings et al., 2009).

Ao identificar múltiplos pontos de quebras e fragmentos de junção simultaneamente, as técnicas de NGS permitiram determinar a estrutura dos rearranjos cromossômicos complexos citogeneticamente equilibrados (Stephens et al., 2011; Kloosterman et al., 2012; Chiang et al., 2012). A complexidade desses rearranjos levou à proposição de novos mecanismos para explicar sua formação. Inicialmente proposto como modelo para a formação de rearranjos somáticos complexos, formados a partir de mais de cem quebras, em tumores (Stephens et al., 2011), o mecanismo de *chromotripsis* também foi sugerido como responsável pela formação de rearranjos complexos na linhagem germinativa (Kloosterman et al. 2011; Chiang et al., 2012; Kloosterman et al. 2012; Nazaryan et al., 2014). Nesse mecanismo, em uma única

célula, agentes endógenos ou exógenos induziriam, simultaneamente, múltiplas quebras na dupla fita do DNA, resultando em fragmentação cromossômica. A união dos fragmentos seria feita por NHEJ ou MMEJ. O *clustering* de pontos de quebras sugeriu que os rearranjos não poderiam ter-se formado por eventos múltiplos e independentes, em subclones diferentes, hipótese apoiada pela análise estatística (Stephens et al., 2011). Extensa reorganização de segmentos é observada em rearranjos cromossômicos formados a partir *chromothripsis*. Rearranjos tumorais também estão associados a várias perdas e ganhos de segmentos, embora rearranjos originados na linhagem germinativa sejam predominantemente equilibrados. A análise por NGS de múltiplas linhagens celulares de diferentes tipos de câncer revelou sinais de *chromothripsis* em 2 a 3% das células estudadas, e em até 25% dos tumores de tecidos ósseos (Stephens et al., 2011). Por outro lado a frequência do mecanismo em rearranjos na linhagem germinativa ainda não está determinada, pois poucos rearranjos complexos foram investigados por NGS. Embora muitos aspectos a respeito do mecanismo de *chromotripsis* ainda não terem sido esclarecidos, evidências sugerem a participação de micronúcleos. Erros mitóticos que levam a atraso anafásico e erros na replicação do DNA podem levar à formação de micronúcleos de (Terradas et al., 2010; Crasta et al., 2012). Foi demonstrado experimentalmente que o isolamento de um ou alguns poucos cromossomos que sofreram atraso anafásico em micronúcleos pode facilitar a formação de rearranjos cromossômicos complexos, por mecanismo típico de *chromothripsis*. No interior dos micronúcleos, os cromossomos estariam mais suscetíveis a sofrer quebras, evidenciando a importância da arquitetura nuclear e do envelope nuclear para a manutenção da instabilidade genômica em células eucarióticas (Zhang et al., 2015).

Apesar de raramente estarem associados a rearranjos equilibrados, mecanismos baseados na replicação do DNA, como FoSTeS e MMBIR, estão sendo identificados como responsáveis pela formação de um número crescente de rearranjos complexos associados a doenças, conforme observado para os loci do *PLP1*, *MECP2*, *DMD*, entre outros (Zhang et al., 2009). Esses mecanismo decorre de trocas de forquilha, facilitadas por meio do *annealing* de sequências que compartilham micro homologia de 2 pb a 5 pb de extensão (Ottaviani et al., 2014). Em comum, os rearranjos cromossômicos formados a partir desses mecanismos, além da micro homologia, incluem múltiplos pontos de quebra e inserção de segmentos de DNA mapeados em outras regiões do genoma.

O primeiro mecanismo baseado na replicação DNA, proposto para a formação de rearranjos cromossômicos, foi o FoSTeS, para explicar rearranjos complexos

contendo segmentos duplicados interrompidos por segmentos intactos, triplicados ou deletados que incluíam o gene *PLP1* (*proteolipid protein 1*), em afetados pela doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD; MIM 312080) (Lee et al., 2007). FoSTeS baseia-se na correção da duplicação do DNA, interrompida por lesões ou formação de estruturas secundárias; diante da interrupção da forquilha de duplicação, a fita *lagging* invade outras forquilhas próximas e completa a duplicação na forquilha original. A mudança de forquilha exige a presença de micro homologia com os sítios invadidos para o *priming* da extremidade 3' reiniciar a replicação. Apesar de FoSTeS aparecer como explicação para formação de rearranjos complexos, como as deleções ou duplicações já associadas a síndromes, não há relatos de rearranjos citogeneticamente equilibrados que possam ter sido formados por FoSTeS. Outro mecanismo similar, proposto por Howarth et al. (2011), baseia-se em erros na replicação do DNA, para explicar a formação de translocações, nas quais ocorrem segmentos duplicados nas junções dos pontos de quebras, como na t(X;22)(q22;q13) que descrevemos (Fonseca et al., 2013). Nesse modelo, as duplicações são produzidas a partir de uma bolha de replicação do DNA, formada por duas forquilhas de replicação, com as sequências que estarão duplicadas, no centro. Quebras na dupla fita do DNA ou trocas de forquilhas em regiões específicas, seguidas de quebras no outro cromossomo, levariam à formação da translocação. Esse modelo pode explicar também deleções nos pontos de quebras de translocações.

O MMBIR também foi proposto como modelo para explicar a formação de rearranjos complexos, contendo segmentos duplicados ou deletados interrompidos por segmentos intactos, invertidos ou triplicados (Hastings et al., 2009). O MMBIR é baseado no mecanismo experimentalmente comprovado de replicação induzida por quebra (*break-induced replication*, BIR), responsável pela formação de rearranjos complexos em leveduras (Morrow et al., 1997). Para que ocorram, BIR e MMBIR necessitam de uma extremidade livre de dupla fita de DNA durante a replicação, que pode originar-se após o colapso de uma forquilha de replicação ou ainda por meio da erosão de telômeros. Após ressecção da extremidade 5' ocorre a exposição da extremidade 3' *overhang*, que pode invadir sucessivas vezes outras regiões de fita única no genoma e servir de *priming* para reiniciar a replicação nesses pontos. A presença de LCR pode favorecer a parada da forquilha de replicação, podendo assim iniciar o processo. Como ocorre no FoSTeS, múltiplas dissociações e invasões de novas fitas podem resultar em rearranjos extremamente complexos. Teoricamente o MMBIR

poderia formar translocações, se a fita invadida pertencer a outro cromossomo, embora não haja relatos na literatura.

I.3 Mecanismos patogênicos associados a rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados

Embora a maioria dos portadores de rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados serem clinicamente normais, 6% e 9,4%, respectivamente, das translocações e inversões aparecem associadas a alterações fenotípicas ao nascimento (Warburton, 1991). Estudos de indivíduos com deficiência intelectual e malformações congênicas evidenciaram que as translocações aparentemente equilibradas são mais frequentes nesse grupo do que na população geral (Tharapel et al., 1977; Fryns e van den Berghe, 1979).

Diferentes mecanismos têm sido identificados ou sugeridos para explicar a associação entre rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados e quadros clínicos: interrupção de genes pelas quebras cromossômicas (Tonkin et al., 2004; Vandeweyer et al., 2009); modificação da expressão de gene próximo aos pontos de quebra devido interrupção de região reguladora ou heterocromatização (Lettice et al., 2002; Kleinjan e Heyningen, 1998; Leipoldt et al., 2009; Fonseca et al., 2013); formação de gene híbrido (Nothwang et al., 2001; Backx et al., 2011) e dissomia uniparental (Liehr, 2010), principalmente no caso de rearranjos herdados (Dupont et al., 2002). A aplicação de hibridação genômica em *microarrays* ao estudo de rearranjos aparentemente equilibrados de ocorrência esporádica tem revelado que microdeleções e microduplicações nos pontos de quebra ou próximas a eles, podem explicar os fenótipos alterados de cerca de 25% dos pacientes (Baptista et al., 2008, Higgins et al., 2008, Gijbbers et al., 2010; Feenestra et al., 2011; Fonseca et al., 2012). Esses desequilíbrios submicroscópicos também foram identificados, como mutações *de novo*, em rearranjos equilibrados associados a patologias, mas que foram herdados de genitores fenotipicamente normais (Ciccone et al., 2005; Schluth-Bolard et al., 2009; South et al., 2010; Le Tanno et al., 2014). Outra possibilidade em rearranjos herdados é que o ponto de quebra pode ter inativado ou interrompido um gene, cuja haploinsuficiência não tenha consequências clínicas, mas que se manifeste na presença de alelo alterado herdado do outro genitor, num padrão recessivo de herança (Hearn et al., 2002; Lesnik Oberstein et al., 2006).

A aplicação de NGS ao estudo desses rearranjos tem agilizado a identificação de mecanismos patogênicos. O mapeamento de alta resolução dos rearranjos citogeneticamente equilibrados é determinante para a correlação genótipo-fenótipo, que depende dos genes ou regiões reguladoras que foram alteradas pelo rearranjo (Huang et al., 2010). Além da identificação de genes associados a doenças monogênicas, futuramente, a caracterização, em larga escala, de rearranjos equilibrados em indivíduos da população geral pode contribuir para elucidar os mecanismos genéticos responsáveis por doenças complexas e de manifestação tardia (Bache et al., 2006; Baptista et al., 2008; Talkowski et al., 2011).

Assim, a caracterização dos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados pode levar à identificação de genes candidatos a serem responsáveis pelos quadros clínicos a eles associados. No entanto, é importante ressaltar que a associação entre fenótipo alterado e rearranjos equilibrados pode ser casual e indivíduos clinicamente normais portadores desses podem ter genes interrompidos pelos pontos de quebra (Baptista et al., 2008).

- ***Interrupção de genes pelas quebras cromossômicas***

A investigação de rearranjos citogeneticamente equilibrados em indivíduos com deficiência intelectual e malformações congênitas frequentemente identifica genes associados a doença, nas regiões das quebras, como no caso dos genes *TCF4* e *FOXP2*, (Nazaryan et al., 2014; Schluth-Bolard et al., 2013). Esses genes são sensíveis a dosagem e os quadros clínicos estão associados a haploinsuficiência, resultante da interrupção pelas quebras cromossômicas. Ao identificar novos genes candidatos interrompidos pelas quebras cromossômicas, o estudo de rearranjos equilibrados tem contribuído também para elucidar os mecanismos genéticos de doenças monogênicas.

A identificação do gene da distrofina foi um dos primeiros casos de mapeamento de um gene a partir de translocações. No início da década de 80 foram publicados trabalhos que descreveram mulheres afetadas por distrofia muscular do tipo Duchenne (DMD), que eram portadoras de translocações recíprocas entre o cromossomo X e um autossomo (Zatz et al., 1981, Boyd et al., 1986). Em todos esses casos, o ponto de quebra no cromossomo X ocorreu na banda Xp21, o que sugeria que o gene mutado na DMD estava localizado nesse segmento e que tinha sido interrompido pelas quebras que originaram as translocações. Esses resultados juntamente com a detecção de deleções em afetados permitiram a clonagem do gene da distrofina (Koenig et al., 1987). A

manifestação da DMD, que tem herança recessiva, nas mulheres foi resultado da inativação do cromossomo X normal. Em geral, esse padrão de inativação é observado em portadoras de translocações X-autossomo; o desvio da inativação casual decorre da seleção contrária às células que inativam o cromossomo X translocado, que não são equilibradas do ponto de vista funcional, pois apresentam dissomia parcial do cromossomo X e monossomia parcial do autossomo, por propagação da inativação. O estudo de translocações X-autossomo também tem sido importante para a identificação de genes candidatos a deficiência intelectual. Vandeweyer et al. (2009), em revisão sobre a associação de deficiência intelectual e translocações equilibradas, mostraram que esses rearranjos levaram à identificação de 11 novos genes relacionados a deficiência intelectual. Nesses casos, os resultados foram confirmados pela identificação de mutações em outros afetados.

O estudo de rearranjos equilibrados também auxiliou a identificação de genes responsáveis por várias doenças localizados em autossomos como o *NFI* [*neurofibromin1*; neurofibromatose tipo 1 (Schmidt et al., 1987; Ledbetter et al., 1989)], *NSD1* [*nuclear receptor binding SET domain protein 1*; síndrome de Sotos; (Kurotaki et al., 2002)], e *NIPBL* [*Nipped-B-like*; Cornelia de Lange (Tonkin et al., 2004)]. Um exemplo interessante é o do gene *DYRK1A* (*Dual-specificity tyrosine-(Y) phosphorylation regulated kinase1A*), localizado no cromossomo 21. O estudo de duas translocações com pontos de quebra em 21q22.2 levou à identificação do gene relacionado ao fenótipo de deficiência intelectual, microcefalia e retardo de crescimento (Moller et al., 2008). Posteriormente, em outro paciente com quadro clínico similar foi identificada uma mutação de perda de função no gene *DYRK1A* (van Bon et al. 2011), confirmando a haploinsuficiência do gene como responsável por nova forma de deficiência intelectual síndrômica. Outro exemplo é o gene *ARID1B* (*AT richinteractivedomain 1B*) localizado em 6q25.3. Por sequenciamento *mate-pair* foram mapeados os pontos de quebra de uma translocação t(1;6)(p31;q25), detectada em um paciente com autismo, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, ausência de fala e agenesia do corpo caloso (Halgren et al., 2012). O ponto de quebra do cromossomo 6 truncou o gene *ARID1B*. Outro paciente com quadro clínico similar, descrito anteriormente, era portador de translocação que também interrompia o gene *ARID1B* (Backx et al., 2011). Halgren et al., (2012) também mostraram a semelhança clínica entre os dois portadores de translocações e portadores de deleções que incluíam o *ARID1B*. Esses dados sugerem que o gene *ARID1B* tenha papel importante no

desenvolvimento do corpo caloso, e atuando sobre a fala. Recentemente uma inversão paracêntrica inv(2)(q14.3q34) caracterizada por NGS interrompeu o gene *PTH2R* (*parathyroid hormone 2 receptor*) em uma criança com craniossinostose não síndrômica (Kim et al., 2015). Outros pacientes portadores de alterações no gene devem ser descrito para confirmar a relação causal.

O estudo de rearranjos equilibrados também tem sido importante para identificar genes responsáveis pelo quadro clínico em síndromes de microdeleções conhecidas. Um exemplo é a síndrome da deleção terminal 22q13.3, caracterizada por grave atraso de linguagem, deficiência intelectual moderada, hipotonia e dismorfismos faciais (MIM 606232). Bonaglia et al. (2001) identificaram uma criança com quadro típico da síndrome, portadora de translocação equilibrada t(12;22)(q24.1;q13.3). O ponto de quebra no cromossomo 22 interrompia o gene *SHANK3* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*), que é altamente expresso no córtex cerebral e no cerebelo. Os autores sugeriram que a haploinsuficiência desse gene seria responsável pela síndrome da deleção terminal em 22q13.3. Posteriormente, Wilson et al. (2003) identificaram uma região crítica de 130 kb comum a 46 pacientes com microdeleção, que incluía o gene *SHANK3*.

A comparação entre rearranjos citogeneticamente equilibrados em indivíduos afetados e clinicamente normais revelou que a proporção de rearranjos que interrompem genes foi maior no grupo controle do que nos rearranjos associados a quadros clínicos, embora haja predominância de genes que atuam no sistema nervoso entre os indivíduos afetados (Baptista et al., 2008). A detecção de genes interrompidos em rearranjos equilibrados em indivíduos normais pode, portanto, identificar genes cuja haploinsuficiência não tem efeito sobre o desenvolvimento (Bernheim et al., 2007). Por outro lado rearranjos equilibrados em indivíduos fenotipicamente normais também podem contribuir para elucidar mecanismos genéticos responsáveis por doenças complexas. Bache et al. (2006) avaliaram o potencial da associação entre translocações equilibradas e essas doenças. Para isso, investigaram a presença de várias doenças complexas em portadores de translocações equilibradas, sem histórico de doença de manifestação precoce. Foram consideradas como potencialmente associadas a doenças complexas, as translocações que segregavam com o quadro clínico, com *lod score* significativo, ou aquelas translocações cujos pontos de quebra estavam localizados em regiões que já haviam sido associadas às doenças. Os autores identificaram 42 pontos de quebra potencialmente associados a doenças complexas. A associação mais consistente

ocorreu entre um ponto de quebra em 1p36 em uma translocação t(1;18)(p36.1;q21) familiar que segregava com dislexia. O locus DYX8, também mapeado em 1p36, já havido sido associado à dislexia em estudo de ligação (Tzenova et al., 2004). Outra associação muito provável ocorreu entre uma translocação t(9;17)(q33;q25.3) e distúrbio bipolar familiar. A associação entre o segmento 17q25.3 e o distúrbio bipolar foi apoiada pela identificação, no mesmo trabalho, de dois pacientes com depressão e pontos de quebra de translocação nesse segmento. Em outro estudo (Baptista et al., 2008), uma translocação - t(4;16)(q35.1;p13.13), interrompia o gene *FAT* [tumor suppressor homolog 1 (*Drosophila*)]. Esse gene é pouco caracterizado em humanos, mas o ortólogo em *Drosophila* atua como supressor de tumor. Diante do aparecimento de prolactinoma aos 37 anos de idade na portadora do rearranjo, os autores sugerem que a interrupção do gene *FAT* possa ter contribuído para o desenvolvimento do tumor.

- **Formação de gene híbrido**

Os rearranjos cromossômicos podem formar genes híbridos, cujos produtos estão associados geralmente ao desenvolvimento de tumores. Para que ocorra a formação de transcrito híbrido, ambos os genes precisam estar orientados na mesma direção e o quadro de leitura deve ser preservado. O exemplo mais conhecido é o da leucemia mielóide crônica (MIM 608232), caracterizada pela presença da translocação t(9;22)(q34;q11) na linhagem tumoral (Rowley et al., 1973). No cromossomo 22 derivativo, o cromossomo Filadélfia, ocorre a justaposição dos genes *ABL* (*Breakpoint Cluster Region*, cromossomo 9) e *BCR* (*Abelson tyrosine kinase*, cromossomo 22), formando um gene híbrido que codifica um polipeptídeo similar ao produto do *ABL*. No entanto, a substituição da porção N-terminal de *ABL* pela porção N-terminal de *BCR* faz com que o produto híbrido tenha atividade desregulada e constitutiva de tirosina quinase. Essa proteína estimula a proliferação de células precursoras hematopoiéticas e impede que sofram apoptose.

Apesar de raros, existem relatos de formação de transcritos híbridos associados a translocações em afetados por deficiência intelectual e malformações congênitas (Nothwang et al., 2001, Ramocki et al., 2003, Backx et al., 2011; Bertelsen et al., 2015). Nessas translocações constitutivas, mesmo diante da formação de produtos híbridos, a haploinsuficiência de genes interrompidos pelas quebras cromossômicas parece ser a causa dos quadros clínicos. Entretanto, o ganho de função ou o efeito dominante negativo dos transcritos híbridos constitutivos não pode ser descartado.

- ***Efeito de posição***

O efeito de posição é definido como alteração da expressão gênica devida a mudança de posição do gene do seu ambiente cromossômico, não estando associado a mutação ou deleção intragênica, mantendo-se portanto, a unidade transcricional e o promotor intactos (Kleinjan e Heyningen, 1998). O efeito de posição pode estar associado a alterações fenotípicas por dois mecanismos principais: heterocromatização ou alteração da relação espacial do gene com elementos reguladores em cis. No último caso, o rearranjo pode afastar um gene de elementos reguladores próprios ou de um elemento de fronteira ou ainda pode aproximá-lo a elementos reguladores de outro gene. Kleinjan e Coutinho (2009) propuseram que doenças causadas por interrupção da arquitetura em cis da região reguladora de um loco gênico sejam chamadas de “*cis-ruption disorders*”. Com raras exceções, os genes já associados ao efeito de posição codificam fatores de transcrição que atuam no desenvolvimento, refletindo a importância do controle temporal e espacial da expressão desses genes. O estudo de rearranjos com pontos de quebra 3’ ou 5’ a esses genes tem contribuído para o entendimento da estrutura da região reguladora de genes que atuam no desenvolvimento em mamíferos (revisões em Kleinjan e Lettice, 2008; Bhatia e Kleinjan., 2014). O mapeamento de pontos de quebra de rearranjos, que supostamente afetam a região reguladora de genes, mostrou que podem interromper ou estar localizados nas proximidades de elementos não codificadores conservados (*conserved non-coding elements*, CNE). O estudo funcional dos CNE em camundongos transgênicos mostra que esses elementos atuam como *enhancers* (Benko et al., 2009; Brown et al., 2010; Klopocki et al., 2011). Quando um rearranjo equilibrado interrompe um desses elementos reguladores em cis ou o afasta do gene contribui para a alteração da expressão espacial ou temporal do gene.

A aplicação de técnicas capazes de determinar as interações de cromatina (3C, 4C, 5C, 6C e Hi-C) demonstrou que os genomas de *Drosophila*, camundongo e humano são segmentados em domínios funcionais e estruturais denominados de *topological associated domains* (TAD) (Sexton et al., 2012; Nora et al., 2012; Dixon et al., 2012). A importância dos TAD na regulação da expressão gênica tem sido intensamente debatida (De Laat and Duboule., 2013; Nora et al., 2013). As fronteiras dos domínios que constituem os TAD são enriquecidas de *insulator binding proteins* (CTCF), um importante sinal de que as fronteiras dos TAD correspondam a barreiras (Dixon et al.,

2012). Essas fronteiras são estáveis entre diferentes tipos celulares e conservadas nos genomas de humanos e camundongos. Essas características sugerem que as fronteiras dos TAD poderiam funcionar como barreiras, restringindo as interações cis do genoma aos domínios (De Laat and Duboule., 2013; Nora et al.,2013). Estudos demonstram que alterações estruturais cromossômicas em humanos, que removem as fronteiras dos TAD ou alteram a sua posição, causam quadros clínicos ao permitir a interação dos genes candidatos com *enhancers* localizados nos domínio vizinhos (Ibn-Salem et al., 2014; Giorgio et al., 2015; Lupiáñez et al., 2015). Além disso, as quebras de translocações, que supostamente afetam a região reguladora de genes, também ocorrem nos mesmos domínios topológicos dos genes cuja expressão foi alterada. Isso ocorre mesmo quando há grandes distancias (~1Mb) entre os genes e as quebras, como no casos dos genes *SHH*, *SOX9* e *MAF* (Nora et al., 2013).

Um dos exemplos mais conhecidos do impacto clínico de rearranjos cromossômicos em decorrência de alteração de região reguladora é o lócus do *SOX9* (*Sry-related hmg-box gene 9*), mapeado no braço longo do cromossomo 17. Mutações de perda de função do gene *SOX9* causam displasia campomélica (CD, MIM 114290), doença rara e frequentemente letal, caracterizada por alterações esqueléticas, entre as quais se destacam o encurvamento e a diminuição do comprimento dos ossos longos. Existem relatos de afetados que não possuem essas mutações, mas são portadores de rearranjos equilibrados cujos pontos de quebra se localizam entre 50 kb e 932 kb *upstream* ao *SOX9* (revisões em Gordon et al., 2009 e Fonseca et al., 2013). Duas translocações que supostamente afetam a região reguladora do *SOX9*, t(7;17)(p.13;q24) e t(17;20)(q24.3;q11.), foram por nós descritas (Fonseca et al., 2013). Os pontos de quebra no cromossomo 17 da t(7;17) e t(17;20) foram localizados por FISH, respectivamente, a 917 – 855 kb e 682 – 585 kb *upstream* ao gene *SOX9* (*Sry-related hmg-box gene 9*). Clinicamente, os dois pacientes apresentavam, em comum, alterações esqueléticas torácicas e craniofaciais compatíveis com mutações no *SOX9*. No entanto, a curvatura anormal dos ossos longos, característica principal da CD, está ausente em nossos pacientes e em outros portadores de rearranjos cujos pontos de quebra se localizam entre 585-932 kb *upstream* ao *SOX9*; nesses casos, a doença é chamada de displasia campomélica acampomélica (ACD). Com exceção do paciente portador da t(17;20) e de outro paciente descrito em trabalho anterior (Leipoldt et al., 2007), portadores de rearranjos com quebras mais distantes ao *SOX9* têm expectativa de vida normal. Em oposição, a maioria dos portadores de rearranjos que estão localizados até

350 kb *upstream* ao *SOX9*, assim como portadores de mutação no gene, têm grave comprometimento das vias respiratórias, em virtude das alterações esqueléticas. Rearranjos com pontos de quebra localizados a cerca de 1Mb *upstream* ao *SOX9* são identificados em afetados pela sequência de Pierre Robin (PRS; MIM 261800), caracterizada por fissura de palato, micrognatia e glossoptose. No entanto esses pacientes não apresentam outras alterações típicas de CD ou ACD. Baseando-se no espectro clínico de portadores de rearranjos próximos ao *SOX9*, supõe-se que a região reguladora do gene deva estender-se por cerca de 1Mb *upstream* ao *SOX9*, uma região desprovida de genes, altamente conservada em diferentes grupos de vertebrados (revisão em Fonseca et al., 2013). O afastamento ou interrupção de elementos reguladores distantes ao gene estariam associados aos fenótipos desses pacientes. Quanto mais próxima ao gene está a quebra do rearranjo, maior é o número esperado de *enhancers* com localização em cis alterada em relação ao *SOX9*, levando a maior gravidade do quadro clínico. Vários *enhancers* que controlam a expressão do gene já foram isolados, a maioria deles localizados até 350 kb *upstream* ao *SOX9* (Wunderle et al., 1998; Bagheri-Fam et al., 2006); dois *enhancers* mapeados a cerca de 1Mb *upstream* ao *SOX9* foram isolados (Benko et al., 2009). Indivíduos 46,XY, portadores de deleções e rearranjos cromossômicos *upstream* ao *SOX9*, principalmente aqueles com quebras até 350 kb distantes do gene, também apresentam alterações do desenvolvimento sexual (reversão sexual), refletindo a atuação do gene na determinação sexual. Um *enhancer* que ativa o *SOX9* na via de determinação sexual, denominado de TESCO, foi isolado (Sekido e Lovell-Badge, 2008). Baseando-se na ausência de alterações sexuais no portador da t(17;20) que descrevemos, propuzemos a existência de outro *enhancer*, que atua na determinação sexual, na região 517-595 kb *upstream* ao *SOX9* (Fonseca et al., 2013). Além de rearranjos equilibrados, deleções e duplicações *upstream* ao *SOX9* foram identificados em pacientes com ACD, Pierre Robin ou com alterações no desenvolvimento sexual, comprovando o impacto de alterações na região reguladora do *SOX9* no fenótipo dos portadores (Fonseca et al., 2013).

A compreensão da estrutura da região reguladora do gene *SHH* (*Sonic hedgehog*) também foi favorecida pelo estudo de rearranjos equilibrados *upstream* ao gene, identificados em pacientes com holoprosencefalia (Roessler et al., 1997) ou alterações de membros (Lettice et al., 2002). Esses rearranjos evidenciaram que a expressão do *SHH*, em diferentes tipos celulares, é controlada por elementos reguladores localizados ao longo da região de 1 Mb 3' ao gene (Amano et al., 2009). O

elemento regulador localizado a 1 Mb do gene, denominado de ZPA (*regulatory sequence ZRS*), foi identificado no estudo de uma translocação t(5;7)(q11,q36) associada a polidactilia preaxial (Lettice et al., 2002). Esse elemento localiza-se no intron 5 do gene *LMBR1* gene e sua interrupção teria causado as alterações de membros no portador da translocação. Esses resultados foram confirmados pela identificação de mutações de ponto no ZPA, que segregavam com o quadro de polidactilia em famílias (Gurnett et al., 2007). Além do ZPA, outros CNE localizados na região 1 Mb *upstream* ao *SHH* foram capazes de ativar, em *zebrafish*, a expressão gênica em sítios embrionários em que *SHH* se expressa (Woolfe et al., 2005; Goode et al., 2005).

Alterações na região reguladora do gene *PAX6* (*paired box 6*), mapeado em 11p13, estão associadas a aniridia (NA, MIM 106210). Já foram descritos indivíduos afetados que eram portadores de rearranjos cromossômicos com pontos de quebra *downstream* ao gene, o mais distal localizando-se a 125 kb do último exon do *PAX6* (Fantès et al., 1995; Lauderdale et al., 2000; Crolla e van Heyningen, 2002). Todos os pontos de quebra se localizavam no último intron do gene *ELP4* [*elongation protein 4 homolog (S. cerevisiae)*], que é expresso em todos os tecidos. Estudos em camundongos indicam que a interrupção do *ELP4* não contribui para o fenótipo.

Embora a interrupção da região reguladora seja o principal mecanismo proposto para rearranjos que afetam a expressão gênica, o rearranjo pode também aproximar o gene de elementos reguladores de outro gene e alterar a sua expressão. Esse mecanismo foi denominado de *enhancer adoption* (Lettice et al., 2011). Em uma inversão pericêntrica do cromossomo 7, foi demonstrado que a holoprosencefalia em seu portador foi resultado da interrupção da região reguladora do gene *SHH*. No entanto, o portador da inversão também apresentava alterações de membros que não eram compatíveis com a alteração de expressão do *SHH*. Os autores demonstraram que a nova localização do *SHH* em 7q22.1 aproximou o gene (~190 kb 3') de um CNE altamente conservado mapeado no intron do gene *EMID2*. Esse CNE atua como *enhancer* de membros em embriões de camundongos e foi capaz de induzir a expressão ectópica do *SHH*, recapitulando, em camundongos, o fenótipo de membros observado no portador da inversão. É importante ressaltar que para que o mecanismo de *enhancer adoption* ocorra é necessário que o gene candidato e o *enhancer* com o qual ele passa a interagir estejam no mesmo TAD (Giorgio et al., 2015). Outro exemplo de *enhancer adoption* é o do linfoma de Burkitt (BL; MIM 113970), caracterizado pela proliferação monoclonal de linfócitos-B5 e associado à translocação t(8;14)(q24;q32), presente na

linhagem tumoral, em 80% dos casos. No cromossomo derivativo 14, o gene *c-myc* [*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*], translocado do cromossomo 8, está justaposto a genes de imunoglobulina e passa a estar sob o controle de seus reguladores, tendo sua expressão exacerbada. O gene *c-myc* atua em vários aspectos da biologia celular, incluindo proliferação, diferenciação, metabolismo e apoptose. A superexpressão do gene *c-myc* no cromossomo derivativo (14) altera essas funções e, conseqüentemente, desenvolve-se o tumor.

Além da alteração de elementos reguladores em cis, o rearranjo cromossômico pode influenciar a expressão de gene(s) próximo(s) ao ponto de quebra devido a alteração da estrutura da cromatina. A heterocromatização pode ocorrer quando o rearranjo aproxima uma região de eucromatina a uma de heterocromatina; o estado mais condensado do DNA da heterocromatina pode propagar-se para a região eucromática justaposta, silenciando genes, de forma aleatória, mas estável. Rees et al., (1994) descreveram uma translocação em mosaico, associada a β -talassemia, na qual o gene da cadeia β da hemoglobina foi translocado intacto do cromossomo 11 para o cromossomo 22, junto ao centrômero. Os autores sugerem que o gene estaria silenciado devido à proximidade com a região pericentromérica, de cromatina constitutiva. Finelli e colaboradores (2012) descreveram o primeiro caso de heterocromatização constitutiva em um portador da translocação t(15;16)(p11.2;q12.1), que apresentava grave atraso de desenvolvimento neuropsimotor e epilepsia. A translocação aproximou uma região heterocromática (satellite III) do cromossomo 15 a uma região eucromática do cromossomo 16, contendo o gene *ITFG1*, que foi interrompido. Os autores mostraram por real time PCR que houve perturbação na expressão de genes que permaneceram no der(16): o gene de região eucromática *NETO2/BTCL2*, mapeado em 16q12.1, estava silenciado, enquanto que os genes de região heterocromática *VPS35* e *SHCBP1*, mapeados em 16q11.2, estavam superexpressos; essa modificação na expressão de genes de região heterocromática, em decorrência de sua aproximação com segmento heterocromático pericentromérico, foi observada em *Drosophila*, desconhecendo-se o mecanismo (Baker et al., 1968). Não houve alteração na expressão de genes localizados no der(15).

Dissomia uniparental (UPD)

A dissomia uniparental (UPD) é definida pela presença no cariótipo de um par de cromossomos homólogos ou de segmentos cromossômicos homólogos com mesma

origem parental. É classificada como isodissomia uniparental, quando o mesmo cromossomo ou segmento cromossômico está presente em duplicata. Quando são herdados dois cromossomos homólogos diferentes ou parte deles de um mesmo genitor, tem-se uma heterodissomia uniparental.

Cerca de 30% dos casos de UPD estão associados a cariótipos anormais, sendo 8% rearranjos equilibrados (Liehr, 2010). No caso de um portador de translocação equilibrada, uma não disjunção meiótica pode originar um gameta dissômico, com os dois cromossomos derivativos e um dos normais que, ao se juntar a um gameta normal, formará um zigoto trissômico. A trissomia poderá ser corrigida pela perda do cromossomo homólogo normal do outro genitor e, nesse caso, o embrião terá uma heterodissomia uniparental. Outra possibilidade de heterodissomia é ocorrer a fertilização entre o gameta dissômico do portador da translocação e o do outro genitor, com a nulissomia correspondente. Caso o gameta do portador da translocação seja nulissômico, com apenas um dos cromossomos normais da translocação, a união com um gameta normal originará um embrião monossômico. O resgate da monossomia pode ocorrer por duplicação do cromossomo homólogo do genitor não portador da translocação. Essa pode ser também a origem de UPD em associação com rearranjos equilibrados esporádicos, que se originem na formação dos gametas (Robinson, 2000).

A relação entre dissomia uniparental e fenótipo alterado pode decorrer da homozigose quanto a alelos recessivos deletérios ou de *imprinting genômico*, ou seja, da expressão gênica dependente da origem parental (Wilkins et al., 2003).

Entre as doenças relacionadas a *imprinting genômico*, já foram descritos vários casos de UPD associada a rearranjos equilibrados. Dupont et al. (2002), por exemplo, descreveram uma menina afetada pela síndrome de Silver-Russell (SRS; MIM 180860), que herdou uma translocação equilibrada $t(7;16)(q21;q24)$ de sua mãe fenotipicamente normal; na criança foi detectada UPD materna do cromossomo 7, como causa da síndrome. Explica-se a UPD como decorrência de não disjunção, o gameta materno que originou o zigoto possuindo os cromossomos 7 normal e derivativo, determinando trissomia do cromossomo 7; o resgate dessa trissomia no embrião, com perda do cromossomo 7 paterno, levou à UPD7 materna e à SRS.

Entre as ocorrências esporádicas, existem vários exemplos de isocromossomos de braço longo ou translocações entre homólogos dos acrocêntricos 14 e 15, associados a síndromes bem caracterizadas de *imprinting* paterno e materno do cromossomo 14 e do cromossomo 15 (síndromes de Prader-Willi e de Angelman) (Robinson, 2000).

- ***Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos***

Os rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados são detectados por técnicas de citogenética clássica, dessa forma são considerados equilibrados aqueles rearranjos nos quais não são identificadas alterações maiores que 5 Mb, que podem ser visualizadas ao microscópio óptico. A partir de 2005, foram publicados trabalhos que aplicaram a-CGH no estudo de 216 rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos (Gribble et al., 2005, De Gregori et al., 2007, Baptista et al., 2008; Fantès et al., 2008; Higgins et al., 2008; Sismani et al., 2008; Schluth-Bolard et al., 2009; Gijsbers et al., 2010, Feenestra et al., 2011). Esses estudos mostraram a presença de microdeleções e microduplicações nos cromossomos rearranjados em aproximadamente 25% dos pacientes (Tabela I.1). Cerca de 17% dos desequilíbrios foram encontrados nos pontos de quebras citogenéticos, mas 7,4% estavam em cis a essas quebras. O tamanho das deleções variou entre 100 kb e 15,3 Mb; os segmentos duplicados variaram entre 240 kb e 650 kb. Dessa forma, os desequilíbrios submicroscópicos nos pontos de quebra ou próximos a eles podem ser responsáveis por grande parte dos fenótipos clínicos em pacientes com rearranjos equilibrados.

Os rearranjos complexos estavam mais frequentemente associados a desequilíbrios, sendo detectados em 72% dos rearranjos com três ou mais quebras (Feenestra et al., 2011; Guilherme et al., 2013). Em seu estudo de 54 rearranjos citogeneticamente equilibrados Feenestra et al. (2011) ressaltaram que os desequilíbrios nos cromossomos rearranjados estavam presentes apenas naqueles indivíduos que apresentaram atraso de desenvolvimento neuropsicomotor. Assim, rearranjos complexos ou rearranjos associados a atraso de desenvolvimento têm maior probabilidade de não serem equilibrados no nível molecular.

Como no caso de rearranjos cromossômicos *de novo*, a análise por a-CGH mostra que rearranjos cromossômicos herdados também podem estar associados a desequilíbrios submicroscópicos nos cromossomos derivativos (Ciccone et al., 2005; Lybaek et al., 2008; Schluth-Bolard et al., 2009; Le Tanno et al., 2014). As microdeleções ou microduplicações podem originar-se de permuta desigual na meiose do genitor portador do rearranjo (Delahaye et al., 2007). A identificação de perdas ou ganhos no rearranjo presente propósito também pode revelar a complexidade do rearranjo presente no genitor fenotipicamente normal que, no nível do bandamento G, não pôde ser determinada (South et al., 2010).

A maioria dos desequilíbrios em rearranjos equilibrados são microdeleções (Fantes et al., 2008). Ganhos de segmentos nos cromossomos rearranjados foram descritos em alguns casos (Schluth-Bolard et al., 2009; Papadopoulou et al., 2010; Fonseca et al., 2013). Isso pode ser resultado do mecanismo de formação dos rearranjos, levando preferencialmente à perda de material. Por outro lado, esse resultado pode refletir a menor patogenicidade das duplicações, que assim não estariam presentes nos indivíduos selecionados para os estudos (Schluth-Bolard et al., 2009). Estudamos uma criança com manifestações clínicas compatíveis com a doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), portadora de translocação equilibrada t(X,22)(q22;q13) (Fonseca et al., 2013). A maioria dos afetados por PMD são homens que apresentam duplicação do gene *PLP1* (*proteolipid protein 1*) (Woodward, 2008). As mulheres sintomáticas, em geral, apresentam quadro clínico leve da doença, de aparecimento tardio. A investigação da t(X;22) por a-CGH e FISH revelou a presença de duplicações de 490 kb e 570 kb, respectivamente, em 22q13 e Xq22. A análise por FISH mostrou que as cópias adicionais desses segmentos estavam localizadas nos pontos de quebra dos cromossomos derivativos X (segmento duplicado de 22q13) e 22 (segmento duplicado de Xq22). Um dos genes duplicados do cromossomo X é o *PLP1* e sua presença no der(22) garante duas cópias funcionais nas células da portadora do rearranjo, independentemente do padrão de inativação do cromossomo X. Essa é a primeira descrição de translocação constitutiva com duplicações de segmentos dos dois cromossomos derivativos. Na literatura, existe um único relato de duplicação num dos pontos de quebra de uma translocação equilibrada constitutiva, herdada da mãe da portadora (Cox et al., 2003).

Apesar de perda ou ganho de gene(s) ser a principal causa dos quadros clínicos, desequilíbrios submicroscópicos em rearranjos equilibrados podem alterar a região reguladora de genes próximos aos pontos de quebra. Em uma inv(7)(q21.3q35) familiar associada a perda auditiva e alterações craniofaciais foi detectada uma deleção de 5 kb no ponto de quebra do cromossomo 7 (Brown et al., 2010). A análise da deleção revelou a presença de um elemento conservado que pode atuar como um enhancer dos genes *DLX6* (*distal-less homeobox 6*) e *DLX5* (*distal-less homeobox 5*), localizados a 65 kb e 80kb do ponto de quebra do cromossomo 7 e que atuam no desenvolvimento das estruturas alteradas nos afetados.

Como a análise por hibridação genômica baseada em *microarrays* permite a investigação global do genoma, pode detectar, em portadores de rearranjos

citogeneticamente equilibrados, alterações em cromossomos que não participam desses rearranjos. Em determinados casos, os rearranjos cromossômicos e as alterações detectadas em outros cromossomos podem contribuir para o fenótipo. (Hayashi et al., 2007). Entretanto, o rearranjo pode estar de fato equilibrado e o fenótipo ser causado por perda ou ganho de segmentos de cromossomos que não participam dele (Morales et al., 2009).

Tabela I.1: Frequência de desequilíbrios submicroscópicos detectados por aCGH em portadores de rearranjos equilibrados esporádicos associados a comprometimento intelectual, atraso de desenvolvimento e malformações congênitas.

Estudo	Plataforma de aCGH	Número de rearranjos estudados	Pacientes portadores de desequilíbrios	Desequilíbrios no ponto de quebra	Desequilíbrios em cis ao ponto de quebra	Desequilíbrio não associado ao rearranjo
Gribble et al. (2005)	BAC PAC 3500 clones/array painting	10	4	1	1	2
De Gregori et al. (2007)	Oligo 44B/244K (Agilent)	27	11	7	1	3
Baptista et al. (2008)	Sanger 30K Whole Genome TilePath	14	4	3	0	1
Fantes et al. (2008)	1Mb 'CytoChip' BlueGnome	46	6	3	3	0
Higgins et al. (2008)	2600 BAC arrays/244K (Agilent)	11	6	2	3	1
Sismani et al. (2008)	Cytochip 1-Mb BlueGnome	12	3	1	1	1
Schluth-Bolard et al. (2009)	Oligo 44K/244K (Agilent)	33	16	7	4	5
Gijsbers et al. (2010)	262 K SNP, 238 K StyI SNP Affymetrix	9	7	2	2	3
Feenstra et al. (2011)	32k BAC, 105k or 244k oligo Agilent or 250k SNP Affymetrix	54	15	11	1	3
TOTAL		216	72 (33,3%)	37 (17,1%)	16 (7,4%)	19 (8,8%)

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Com este estudo, nosso objetivo foi (a) identificar mecanismos pelos quais rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados possam estar associados de maneira causal a determinados quadros clínicos e (b) contribuir para a compreensão dos mecanismos de formação desses rearranjos. Para isso estudamos 45 rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados (29 translocações, 10 inversões e seis rearranjos complexos) detectados em pacientes que apresentavam malformações congênitas, comprometimento do desenvolvimento neuropsicomotor ou déficit intelectual). Foram 31 rearranjos cromossômicos esporádicos, três familiares que segregavam com o quadro clínico e mais 11 rearranjos cromossômicos herdados de genitores fenotipicamente normais. Inicialmente os pontos de quebra dos rearranjos foram mapeados por FISH (hibridação in situ fluorescente), usando sondas mapeadas nas regiões dos pontos de quebra identificados na análise após bandamento G. A ocorrência de microdeleções e microduplicações foi investigada por a-CGH (hibridação genômica comparativa baseada em *array*). Apesar de a análise por a-CGH e FISH ter ajudado a revelar a complexidade dos rearranjos, a resolução inferior ao nível de pares de bases dificulta a correlação genótipo-fenótipo, que é dependente de como genes ou regiões reguladoras foram alterados. A análise refinada dos pontos de quebra também é essencial para compreender os mecanismos de formação desses rearranjos. Assim, prosseguimos a investigação dos pontos de quebra, aplicando a técnica de *Mate-Pair Sequencing* (MPS), que permite localizar as quebras em segmentos de 100 pb – 1 kb, na maioria dos casos. Para obter os segmentos de junção das quebras no nível de pares de bases, sequenciamos os segmentos delimitados por MPS, por meio do método de Sanger. As informações obtidas foram relacionadas aos mapas físicos do genoma humano e às características clínicas dos pacientes na busca de genes candidatos.

III. PACIENTES E MÉTODOS

III. PACIENTES E MÉTODOS

III.1 Pacientes

Vinte e seis indivíduos selecionados para este estudo foram identificados como portadores de rearranjos citogeneticamente equilibrados no Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (LGH-IB-USP), para onde foram encaminhados por diferentes serviços médicos, para diagnóstico e aconselhamento genético. Outros 19 pacientes portadores de rearranjos equilibrados foram identificados na Rede Sarah de Reabilitação, em Brasília. Esses rearranjos fazem parte do estudo colaborativo que realizamos com esse centro, nele sob a coordenação da Dra. Kikue Abe Terabe. A Tabela III.1 mostra os 45 rearranjos equilibrados estudados e o fenótipo de seus portadores. Para inclusão no estudo, os pacientes ou seus responsáveis legais, foram informados sobre a pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 125/2011 - FR 459462).

A amostra foi constituída de 29 translocações, dez inversões e seis rearranjos cromossômicos complexos (CCR), 31 deles esporádicos e três segregando na família com o quadro clínico. Onze rearranjos foram herdados de genitores fenotipicamente normais.

III.2 Métodos

III.2.1 Estudo cromossômico

- *Preparações cromossômicas*

Para o estudo cromossômico, as preparações foram obtidas a partir de culturas temporárias de linfócitos de sangue periférico, seguindo as técnicas de rotina do laboratório. Os linfócitos contidos em 0,5 mL de plasma sanguíneo foram cultivados por 72 h, a 37°C em 4,5 mL de meio de cultura TC 199 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), complementado com soro fetal bovino 15% (Invitrogen), L-glutamina 1% (Sigma, Saint Louis, EUA) e fitohemaglutinina 1% (Invitrogen). O tratamento com colchicina (Sigma) na concentração final de 0,0016% foi realizado nos 40 min finais do cultivo. Para a hipotonização, utilizou-se uma solução de KCl (0,075 M) por 12 min a 37°C e para a fixação, metanol:ácido acético, 3:1. Parte do material foi conservada a 20°C no fixador e parte foi utilizada na preparação de lâminas, que foram mantidas em estufa a

37°C, por sete a quinze dias e, então, utilizadas para a aplicação da técnica de bandamento cromossômico GTG ou congeladas a -20°C, para utilização posterior em experimentos de hibridação *in situ*.

- ***Identificação dos rearranjos cromossômicos***

Para a identificação dos rearranjos cromossômicos foi utilizada a técnica de bandamento GTG descrita por Seabright (1971), com modificações. As lâminas foram tratadas com 2xSSC (cloreto de sódio 0,03 M e citrato trissódico 0,03 M, pH 7,0) por 15 minutos, a 60°C. Em seguida foram lavadas em água destilada e tratadas com solução de tripsina (1:250; Invitrogen) 0,025% em tampão fosfato Sörensen (fosfato dissódico 0,03 M e fosfato monopotássico 0,03 M), pH 6,8, a 37°C por tempo variável de 10 s a 60 s, dependendo da idade da lâmina. A seguir as lâminas foram lavadas em água destilada e coradas por 3 a 6 min com solução a 2% do corante de Giemsa (Merck), em tampão fosfato, pH 6,8. As lâminas foram lavadas em água destilada e secas ao ar.

- ***Mapeamento dos pontos de quebra por FISH***

Para refinar o mapeamento dos pontos de quebra dos rearranjos cromossômicos foi empregada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Foram utilizados como sondas segmentos cromossômicos clonados em cromossomos artificiais de bactérias (BAC). O laboratório possui um conjunto de sondas de todos os cromossomos humanos. Uma parte foi obtida do CHORI (BACPAC Resources, CHORI - Children's Hospital Oakland Research Institute). Outras sondas clonadas em BAC fazem parte do conjunto utilizado para a confecção de um *IMb-array* produzido pela Dra. Carla Rosenberg, no Leiden University Medical Centre; esses clones foram cedidos pelo Wellcome Trust Sanger Institute, UK; informações sobre esse conjunto de clones estão disponíveis no Ensembl. Algumas sondas clonadas em BAC foram obtidas da Invitrogen. De acordo com os pontos de quebra mapeados por bandamento G, as sondas foram selecionadas para os experimentos de FISH com base nos mapas obtidos nos bancos de dados Ensembl, National Center for Biotechnology Information (NCBI) e University of California, Santa Cruz - Genome Browser (UCSC). As bactérias com os clones de interesse foram cultivadas em meio LB (1% bactotripton; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; pH 7,5), contendo o antibiótico para

Tabela III.1: Os 45 rearranjos citogeneticamente equilibrados, o fenótipo dos portadores e as técnicas utilizadas para investigá-los. Os rearranjos são esporádicos (A1-A31), familiares associados a quadros clínicos (B1-B3) ou herdados de indivíduos fenotipicamente normais (C1-C11).

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Fenótipo	Instituição de Origem	Técnicas utilizadas no estudo		
				aCGH	FISH	MPS
A1	46,XY,t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)	DI, aniridia	USP	x	x	x
A2	46,XY, t(6;18)(q13;q22)	ADNP e agnesia do corpo caloso	USP	x	x	
A3	46,XY,t(6;7)(q12;q31)	ADNP	USP	x	x	x
A4	46,XX, t(10;21)(p13;q22)	ADNP, espasticidade e microcefalia	USP	x	x	x
A5	46,XY,ins(2)(p13;q11.2q21)ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)	ADNP	USP	x		x
A6	46,XY,inv(17)(p11.2q21.3)	DI e dismorfismos faciais	USP	x	x	x*
A7	46,XX,t(2;16)(q36.1;q24.1)	Dismorfismos craniofaciais, mãos com quatro dígitos e pé torto congênito com hexadactilia	USP	x	x	x
A8	46,XX, t(10;21)(q21.2;q22.2)	DI, microcefalia e epilepsia	USP	x	x	x
A9	46,XX, t(4;18)(p15.2;q11.2)	Surdez não sindrômica	USP	x	x	x
A10	46,XY,inv(12)(q21q23)	Atraso de fala, atraso de aprendizagem, hiperatividade, deficit de atenção	USP	x	x	x
A11	46,XX,t(9;20)(q22.3;p13)	DI e obesidade	USP	x	x	x
A12	46,XX,t(X;13)(p21;q12)	DI, hipercolesterolemia e dismorfismos faciais	USP	x	x	x
A13	46,XX,t(9;20)(q21.11;q13.31)	Atraso de fala e atraso de aprendizagem	USP	x		x*
A14	46,XX,t(X;22)(q22;p11)	DI	USP	x		(Continua)

Tabela III.1: Os 45 rearranjos citogeneticamente equilibrados, o fenótipo dos portadores e as técnicas utilizadas para investigá-los. Os rearranjos são esporádicos (A1-A31), familiares associados a quadros clínicos (B1-B3) ou herdados de indivíduos fenotipicamente normais (C1-C11). (continuação)

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Fenótipo	Instituição de Origem	Técnicas utilizadas no estudo		
				aCGH	FISH	MPS
A15	46,XY,t(4;10)(q24;q22)	DI	USP	x		x
A16	46,XY,t(2;18)(q33;q21.3)	ADNP	USP	x	x	x
A17	46,XY,t(5;18)(q33.3;q21.1)	ADNP, atraso na fala, surdez sensorial e dismorfismos faciais	Rede Sarah	x		x
A18	46,XX,t(X;5)(p21.1;p13.2)	ADNP, DI e microcefalia	Rede Sarah	x		
A19	46,XY,t(1;4)(q32.3;q35),t(3;13)(p24.2;q21.2)	DI e dismorfismos faciais	Rede Sarah	x		
A20	46,XX,t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1)	Lisencefalia e dismorfismos faciais	Rede Sarah	x		x
A21	46,XX,t(4;14)(q27;q13)	Paraplegia cerebral tetraplégica e microcefalia	Rede Sarah	x		x
A22	46,XY,t(1;2)(p34.3;q31)	ADNP, DI (moderado), atraso de fala e dismorfismos faciais	Rede Sarah	x		x
A23	46,XX,t(11;18)(q13.1;q21.31)	ADNP	Rede Sarah	x		x
A24	46,XY,t(3;15)(p21.3;q15)	DI	USP	x		
A25	46,XX,t(14;15)(q13;q22.1)	Paraplegia cerebral tipo disnética	Rede Sarah	x		x
A26	46,X,t(X;17)(q21~22;p11.1)	DI, cifoese, baixa estatura e peso; pescoço curto, luxação do rádio, epilepsia e paraplegia espática	Rede Sarah	x		x*
A27	46,X,t(X;17)(q11.2;q11.2)	Atraso de aprendizado, hipotonia axial e hipomelanose de Ito	Rede Sarah	x		x* (Continua)

Tabela III.1: Os 45 rearranjos citogeneticamente equilibrados, o fenótipo dos portadores e as técnicas utilizadas para investigá-los. Os rearranjos são esporádicos (A1-A31), familiares associados a quadros clínicos (B1-B3) ou herdados de indivíduos fenotipicamente normais (C1-C11). (continuação)

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Fenótipo	Instituição de Origem	Técnicas utilizadas no estudo		
				aCGH	FISH	MPS
A28	46,XX,inv(18)(p11.2q11.2)	ADNP, hemiplegia, microcefalia e deficit auditivo	Rede Sarah	x		x*
A29	46,XY,inv(3)(p14p26)	Comprometimento intelectual associado a mudança de comportamento e marcha em equino	Rede Sarah	x		x
A30	46,XX,ins(1)(q32.1p21p34.1)	ADNP, braquicefalia, estrabismo convergente, dismorfismos faciais e ânus anteriorizado	Rede Sarah	x		
A31	46,XY,ins(16)(p13.1q23q12.1)	ADNP, deficit pânderoestatural, microcefalia, hipospádia, polegar aduzido e com implantação anômala e hipotrofia tenar e dismorfismos faciais	Rede Sarah	x		x
B1	46,XY,t(2;22)(p13;q12.2)mat	Atraso de aprendizagem e dismorfismos craniofaciais	USP	x	x	x
B2	46,XY,inv(2)(q14.3q31.1)mat	Sindactilia nas mãos e pés, luxação e displasia de quadril	Rede Sarah	x		x
B3	46,XY,inv(7)(p12q22.1)mat	Ectrodactilia em pés, hiper mobilidade de ombros; mãe com ectrodactilia e atraso de aprendizagem	Rede Sarah	x		x*
C1	46,XX,inv(12)(p11.2q24.1)mat	Hiperextensão dos ligamentos, deslocamento de quadril, oligodontia e comprometimento de aprendizagem	USP	x		x
C2	46,XY,t(6;15)(q23.1;q22.1)mat	Hipertrofia articular, pés planos, pregas transversais únicas e refluxo gastroesofágico	USP	x	x	x*
C3	46,XY,t(6;22)(q14;q11)mat	DI	USP	x	x	x*
C4	46,XY,inv(2)(q12q33)pat	DI	USP	x		(Continua)

Tabela III.1: Os 45 rearranjos citogeneticamente equilibrados, o fenótipo dos portadores e as técnicas utilizadas para investigá-los. Os rearranjos são esporádicos (A1-A31), familiares associados a quadros clínicos (B1-B3) ou herdados de indivíduos fenotipicamente normais (C1-C11). (continuação)

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Fenótipo	Instituição de Origem	Técnicas utilizadas no estudo		
				aCGH	FISH	MPS
C5	46,XY,inv(2)(p11q13)mat	DI	USP	x		
C6	46,XY,inv(12)(q15q24.2)mat	ADNP	USP	x		x
C7	inv(17)(p11.2q21)Pat	Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor	USP	x		
C8	t(13;17)(q21.2;p13) mat	ADNP, hipotonia axial, catarata bilateral e dificuldades de alimentação	USP	x		
C9	46,XY,inv(3)(p12~13p25~26)mat	Polegar trifalângico com polidactilia preaxial	Rede Sarah	x		x
C10	46,XY,t(2;9)(q14.2;p22)pat	ADNP e microcefalia	Rede Sarah	x		x
C11	46,XY,t(1;7)(q23.1;p13)pat	DI grave, anomalias craniofaciais e não anda ou fala	Rede Sarah	x		x

BCR, rearranjo cromossômico equilibrado (*Balanced Chromosome Rearrangement*); DI, deficiência intelectual; ADNP, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

* Não foi possível caracterizar os pontos de quebra por MPS, provavelmente devido à presença, nas regiões das quebras, de sequências altamente repetitivas ou de sequências repetidas no genoma.

seleção de bactérias resistentes com os segmentos de interesse. Para a extração dos clones, utilizou-se o kit Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare, New Jersey, EUA). As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina ou digoxigenina por meio, respectivamente, da incorporação dos nucleotídeos Bio-16-dUTP ou Dig-11-dUTP, utilizando os kits de marcação Biotin-Nick Translation Mix ou Dig-Nick Translation (ambos da Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha), conforme instruções do fabricante. As sondas foram desnaturadas a 95°C em meio de hibridação (50% formamida, e 10% dextran sulfato, em 2xSSC). A supressão de sequências repetitivas foi feita com DNA humano Cot-1 (Invitrogen). O DNA dos cromossomos foi desnaturado em 70% formamida/2xSSC a 72°C. A hibridação foi realizada em câmara úmida por 48 a 72 horas a 37°C. Para a detecção das sondas marcadas com biotina, utilizamos avidina conjugada a FITC e para a detecção de sondas marcadas com digoxigenina, utilizamos anti-digoxigenina conjugada a rodamina. As lâminas foram montadas em Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Califórnia, EUA) contendo o corante DAPI (0,8 µg/mL) (Sigma, Saint Louis, EUA). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Carl Zeiss, Alemanha). Para a documentação, as imagens foram capturadas por câmara de CCD e processadas, utilizando-se o software ISIS (MetaSystem, Alemanha).

III.2.2 Busca de microdeleções e duplicações

A presença de desequilíbrios genômicos submicroscópicos foi investigada pela técnica de array-CGH. Utilizamos a plataforma *CytoSure ISCA 4x180K v2* (OGT - Oxford Gene Technology, Oxford, UK). Esse *oligoarray* contém quatro áreas com aproximadamente 180.000 oligonucleotídeos de 60 pb. Os procedimentos de purificação das amostras, hibridação e lavagem foram realizados conforme descrito pelo fabricante (OGT), com modificações. Na etapa de digestão do DNA genômico foram utilizados 800 ng de DNA, em volume final de 18 µL de reação contendo 5 U de cada uma das enzimas *Alu I* e *Rsa I*, 1,7 µg de BSA (albumina de sangue bovino) e *Buffer C* 10X (10% do volume final). As amostras foram digeridas por duas horas a 37°C em estufa, seguida da inativação das enzimas por 20 min a 65°C. Para a marcação das amostras foram utilizados os kits *CytoSure Genomic Dna labelling kit* (OGT, Oxford Gene Technology, Oxford, UK). Os procedimentos e quantidades de cada reagente seguiram as instruções dos fabricantes dos kits. Em resumo, foram adicionados *random primers* à reação da digestão, seguindo-se desnaturação do DNA por três minutos a 95°C e

incubação em gelo por cinco minutos. Para a marcação, foi adicionada uma mistura contendo tampão, dNTP, Cy3-dCTP (para a amostra teste) ou Cy5-dCTP (para a amostra referência) e enzima *Klenow*. As amostras foram mantidas por duas horas a 37°C em estufa, procedendo-se em seguida à inativação da enzima por 10 min a 65°C. As amostras marcadas foram purificadas, utilizando-se o kit *Illustra™ ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (GE Healthcare)*, de acordo com o protocolo do fabricante. Para a etapa de precipitação 50 µL do DNA teste (marcado com Cy3) e 50 µL do DNA referência (marcado com Cy5) foram adicionados 5 µg de *Human Cot-1 DNA (Invitrogen)*, para o volume final de 105 µL. Em seguida, foram adicionados NaAc (3 M, pH 5,0; 10% do volume final) e etanol 100% gelado (2,5X o volume final). As amostras foram precipitadas por 15 min a -80°C ou por duas horas a -20°C. Após centrifugação a 13.200 rpm, por 15 min a 4°C, adicionou-se etanol 70% gelado às amostras e procedeu-se a centrifugação por mais cinco minutos a 13.200 rpm, descartando-se o sobrenadante. Seguiu-se nova centrifugação por um minuto, descartando-se o sobrenadante. O DNA marcado foi então ressuspensionado em TE previamente aquecido a 72°C e mantido por dois minutos a 72°C, seguindo-se nova ressuspensão em vórtex. Foram adicionadas as soluções *blocking solution 10X* e *hybridization buffer 2X* e procedeu-se à desnaturação por três minutos a 95°C e 30 min a 37°C, em banho-maria. Adicionou-se todo o volume das amostras às lamelas da lâmina de suporte do *microarray* e colocou-se a lâmina de *microarray* sobre ela. As amostras foram então hibridadas a 65°C por 16-20h. A lâmina de *microarray* foi mergulhada em *Buffer 1* por cinco minutos (duas vezes), depois em *Buffer 2* (previamente aquecido a 37°C) por um minuto, seguindo 10s em acetonitrila (*Sigma-Aldrich*, Missouri, USA) e 30s em *Stabilization Drying Solution*. As imagens do *array* obtidas com o *Agilent High-Resolution Microarray scanner*, foram processadas e analisadas, utilizando o pacote de programas *Feature Extraction* e *Agilent Genomic Workbench* (ambos da *Agilent Technologies*), usando o algoritmo estatístico ADM-2 e limiar de sensibilidade 6,7. Apenas as alterações abrangendo no mínimo três oligonucleotídeos consecutivos com razão \log_2 alterada foram consideradas pelo programa como possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico. Usando esses critérios, os tamanhos mínimos das CNV detectadas é de 60-90 Kb.

As alterações de número de cópias identificadas nos pacientes foram comparadas às variações documentadas no banco de dados *Database of Genomic Variants* (DGV), que compila as CNV presentes em amostras de indivíduos normais. Foram comparadas também às informações do *Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER), que documenta desequilíbrios genômicos identificados em indivíduos afetados por diferentes patologias. Quando possível, no caso de detecção de variantes consideradas únicas ou raras, a validação do resultado foi feita por FISH. Uma vez confirmada, a alteração foi investigada em outros membros da família, normais ou afetados.

III.2.3 Caracterização dos rearranjos cromossômicos por *mate-pair sequencing* (MPS)

O *workflow* para identificar variantes estruturais a partir dos dados de *mate-pair sequencing* está esquematizado na Figura III.1. A etapa de sequenciamento dos pontos de quebra por *mate-pair sequencing* foi realizada na Universidade de Copenhague, sob a supervisão do Prof. Niels Tommerup.

Preparação das bibliotecas *mate-pair*

As bibliotecas *mate-pair* foram preparadas usando o *Mate Pair Library v2 kit* (Illumina, San Diego, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante com modificações (Figura III.2). Os procedimentos e quantidades de cada reagente seguiram as instruções dos fabricantes dos kits. Inicialmente, na etapa de tagmentação, o DNA genômico foi simultaneamente fragmentado e marcado com adaptadores ligados a biotina. Nessa etapa, foram utilizados 1000 ng de DNA, em volume final de 100 μ L de reação contendo 4 μ L da enzima *Mate Pair Tagment Enzyme* e *Tagment Buffer Mate Pair 10X* (20% do volume final). A etapa de tagmentação foi realizada a 55°C por 30 min. Os fragmentos foram então purificados, utilizando-se o kit *Zymo Genomic DNA Clean & Concentrator™* (Zymo Research), de acordo com o protocolo do fabricante. Na etapa seguinte, *strand displacement*, utilizou-se uma polimerase para preencher uma pequena região de fita única do DNA fragmentado, resultado da etapa de tagmentação do genoma. Nessa etapa, foram utilizados 30 μ L de DNA tagmentado, em volume final de 50 μ L de reação contendo 2,5 μ L da enzima *Strand Displacement Polymerase*,

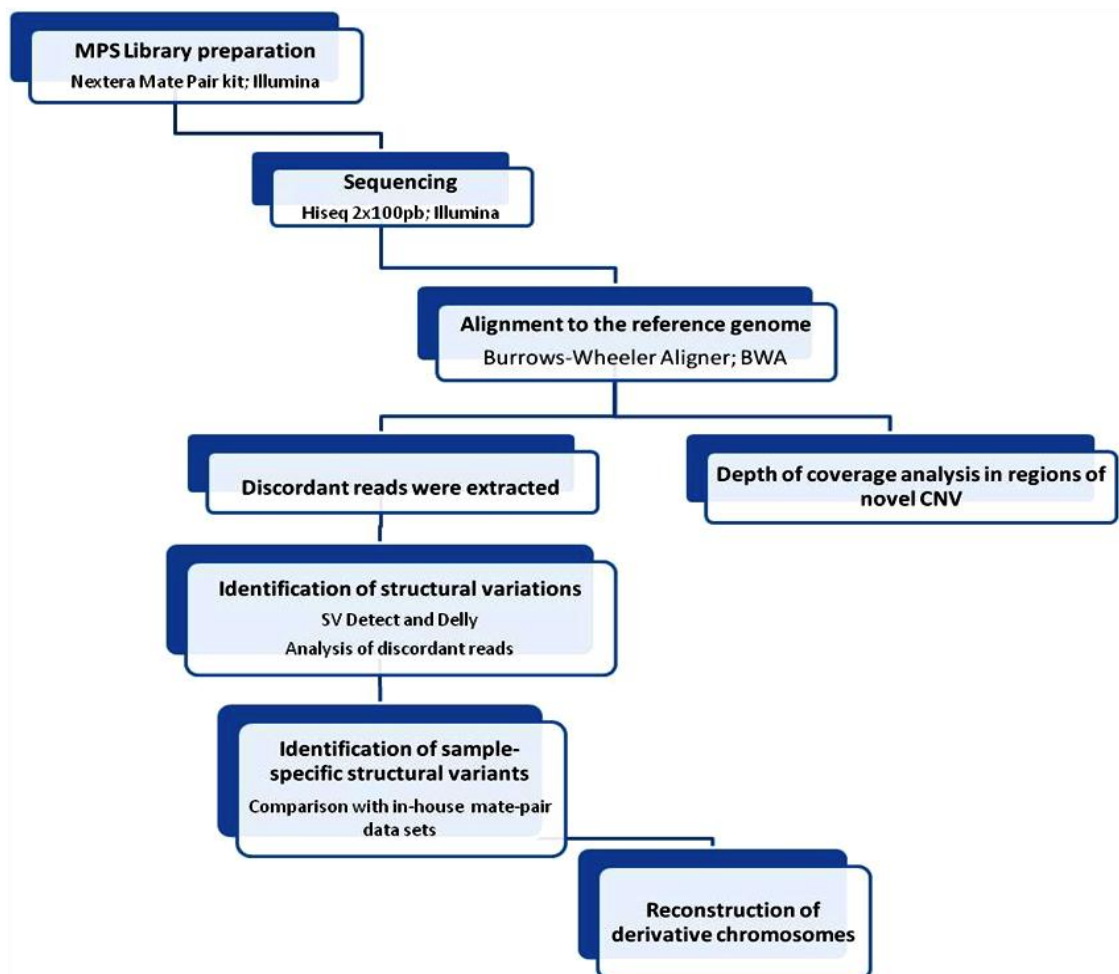


Figura III.1: *Workflow* seguido para a identificação de rearranjos cromossômicos a partir dos dados de *mate-pair sequencing* (MPS).

10x Strand Disp Buffer (10% do volume final) e 2µl de dNTPs. A etapa de tagmentação foi realizada a 20°C por 30 min. Em seguida, as amostras foram purificadas, utilizando-se o *AMPure XP Beads*, etapa na qual fragmentos de DNA de tamanho <1500 bp são removidos da reação, restando apenas fragmentos maiores que permanecem presos às *beads*. Nessa etapa, foram utilizados 50ul de DNA da etapa anterior, em volume final de 140 µL de reação, contendo 40 ul de *AMPure XP Beads*. O DNA ligado às *beads* foi incubado por 15 min a temperatura ambiente, ressuspendendo-se a mistura a cada 2 minutos. As amostras permaneceram fixadas à estrutura de apoio contendo imã por 5 minutos, removendo-se o sobrenadante. Foram adicionados 400 ul de etanol 70% e incubaram-se as amostras por 30 segundos. Após a repetição da etapa de lavagem com etanol, as amostras foram secas a temperatura ambiente por 10-15min e então,

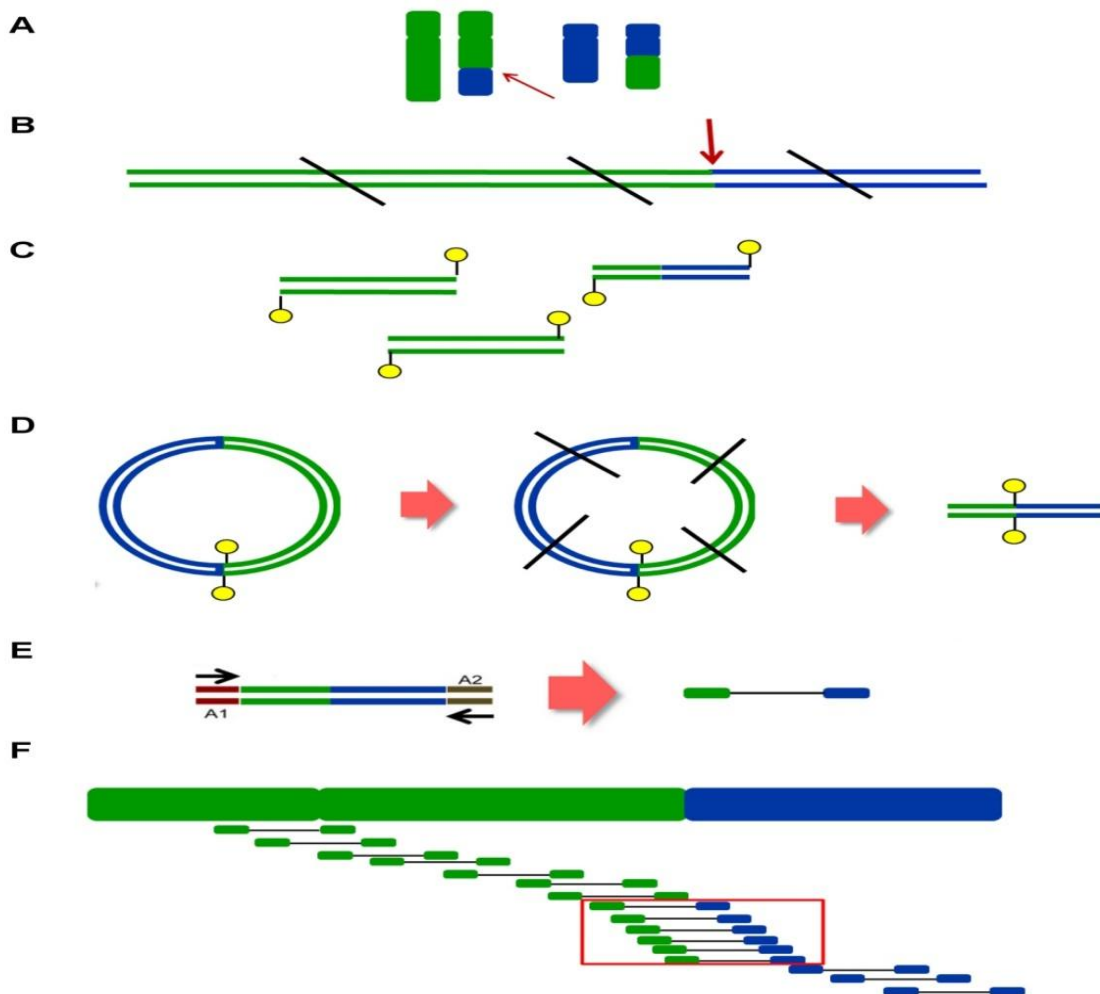


Figura III.2: Esquema do mapeamento dos pontos de quebra de uma translocação citogeneticamente equilibrada por *mate-pair sequencing*: **A.** Esquema da translocação. **B e C.** Tagmentação: para a construção da biblioteca *mate-pair*, o DNA genômico é fragmentado em segmentos de 2 a 3 Kb (**B**) e marcados com biotina (**C**). **D.** A circularização dos fragmentos é feita por uma ligase. Após nova etapa de fragmentação são produzidos segmentos com tamanhos entre 300 a 1000 pb. **E.** Adaptadores (A1 e A2) são ligados aos fragmentos, que são submetidos ao sequenciamento paired-end (2x100 bases), utilizando o HiSeq 2000 (Illumina). **F.** As *reads* produzidas são alinhadas ao genoma de referência, usando o programa BWA. *Paired reads* alinhadas a cromossomos diferentes são selecionadas (retângulo vermelho) para identificar potenciais pontos de quebras da translocação.

ressuspendidas em 30 μ l de *Resuspension Buffer*, para diluição do DNA. Na etapa de circularização, foram utilizados 600 ng de DNA purificado em *AMPure*, em volume final de 300 μ L de reação contendo 7 μ l da enzima *Circularization Ligase* e *Circularization Buffer* 10X (10% do volume final). A etapa de circularização foi realizada a 30°C por 12-16 h. Após a circularização, para remover contaminantes de DNA linear, as amostras foram tratadas com 9 μ l de *Exonuclease* por 30 min a 37° C, procedendo-se em seguida à inativação da enzima por 30 min a 70° C. Em seguida, foram acrescentados 12 μ l de *Stop Ligation Buffer*. As moléculas de DNA foram

fragmentadas em segmentos menores (aproximadamente 300-1000 pb), por sonificação e os fragmentos resultantes foram purificados, utilizando-se o kit Zymo Genomic DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, USA.), de acordo com o protocolo do fabricante. Para separar moléculas não ligadas a biotina, utilizou-se a *streptavidin magnetic beads* (M280 Dynabeads) que atuam como imãs para fragmentos de DNA marcados com biotina. Em resumo, 300 µl de DNA fragmentado e purificado da etapa anterior foram adicionados a 20 µl de *M280 Dynabeads* ressuspensos em 300 µl de *Bead Bind Buffer*. A mistura DNA-*beads* foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, resuspendendo-se a mistura a cada 2 minutos. As amostras permaneceram no imã por 1 minuto, removendo-se o sobrenadante e acrescentando-se 200 µl de *Bead Wash Buffer*. As amostras permaneceram no imã por 30 segundos, removendo-se o sobrenadante. Após a etapa de lavagem com o *Bead Wash Buffer*, realizada quatro vezes, foram adicionados 200 µl de *Resuspension Buffer*. As amostras permaneceram no imã por 30 segundos, removendo-se o sobrenadante. A etapa de lavagem com *Resuspension Buffer* foi realizada duas vezes. A etapa posterior consistiu em reparar as *overhangs* produzidas pelo processo de fragmentação (sonificação). As amostras ressuspensas em *beads* foram adicionadas a 40 µl de *End Repair Mix*, totalizando 60 µl de reação. A reação foi incubada a 30°C por 30 min. Seguiu-se nova etapa de lavagem com *Bead Wash Buffer Resuspension* e *Resuspension Buffer*, conforme descrito. Para impedir a formação de concâmeros durante a etapa de ligação, adicionou-se um nucleotídeo “A” à extremidade 3’ dos fragmentos reparados. Com as amostras fixas à estrutura de apoio contendo imã, 12,5 µl de *A-Tailing Mix* foi acrescentado a 30 µl de reação, incubando-se a 37° C por 30 min. A etapa seguinte consistiu na adição de adaptadores para realização de PCR. Na etapa de ligação, foram utilizados 30 µl DNA da etapa anterior, em volume final de 37,5 µL de reação, contendo 2,5 µl de *Ligation mix* e 1,0 µl de *TruSeq DNA Adapter Index*. A reação foi incubada a 30° C por 10 min. Procedeu-se a nova etapa de lavagem com *Bead Wash Buffer* e *Resuspension Buffer*, conforme descrito. Na etapa de PCR, os fragmentos que continham adaptadores TruSeq DNA em ambas as extremidades foram amplificados. Com as amostras fixas ao imã e ressuspendidas em *beads*, a reação de PCR foi realizada em volume final de 50 µL de reação, contendo 25 µl da enzima *PCR Master Mix* e *PCR Primer Cocktail*. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 30s a 98° C, seguida de 10-15 ciclos de 10s a 98° C, hibridação a 60° C por 30s, extensão a 72° C por 30s, seguidos de extensão final a 72° C, por 5 min. Os produtos amplificados foram purificados por

AMPure, etapa em que ocorre também a remoção de fragmentos <300pb. Nessa etapa, as amostras amplificadas permanecem no imã por 1 min. A 45 ul do sobrenadante, foram adicionados 30ul de *AMPure XP beads*, incubando-se por 5 min a temperatura ambiente. As amostras foram fixadas a imã magnético por 5 min e o sobrenadante foi removido da amostra. Procedeu-se à lavagem com etanol 70% e, após as amostras secarem a temperatura ambiente, entre 10 a 15 min, o DNA foi ressuspendido em 20 ul de *Resuspension Buffer*. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 5 min e permaneceram fixadas a imã magnético por 5 min adicionais. O sobrenadante contendo a biblioteca final de cada amostra foi separado e utilizado para determinação da concentração final de DNA da biblioteca, usando o kit *GeneRead Library Quant Kit* (Quiagen, Hilden, Germany). À preparação das bibliotecas *mate-pair*, seguiu-se o sequenciamento *paired-end* dos fragmentos produzidos (2×100 pares de bases), no sequenciador HiSeq2000 (Illumina).

Processamento de dados e interpretação dos resultados

Após a remoção das sequências dos adaptadores adicionados na preparação das bibliotecas *mate-pair*, as *reads* selecionadas pelo filtro Illumina Chastity (>0.6) foram alinhadas em relação ao genoma de referência hg19 usando o Burrows-Wheeler Aligner (BWA; Li et al., 2009). Sequências com mais de dois *mismatches* foram excluídas do alinhamento, assim como duplicatas de PCR. As *reads* alinhadas a mais de uma região do genoma foram excluídas da análise. *Paired reads* alinhadas a cromossomos diferentes, com orientações inesperadas ou pares de *reads* com distâncias aberrantes foram selecionadas para identificar potenciais rearranjos. Só foram considerados pontos de quebra confirmados por, pelo menos, seis *paired-reads* mapeados em uma região de no máximo 6 kb de extensão. Essas *reads* discordantes foram utilizadas pelos programas SVDetect (Zeitouni et al., 2010) para identificar os diferentes tipos de rearranjos e delimitar os segmentos dos pontos de quebra. O programa Integrative Genomics Viewer (IGV; Robinson et al., 2011) foi utilizado para a análise e visualização dos dados obtidos pelo sequenciamento. Todos os pontos de quebra e rearranjos cromossômicos identificados pelo SVDetect foram confirmados pela análise manual de *paired-end* das *reads* discordantes, por meio da visualização dos dados no IGV. Os rearranjos cromossômicos identificados foram comparados aos dados do banco *in-house* do laboratório do Prof. Niels Tommerup, que reúne variantes estruturais detectadas em indivíduos normais da população. Rearranjos presentes em indivíduos da

população foram excluídos da análise. Para a análise de rearranjos cromossômicos complexos, os resultados obtidos por aCGH e FISH foram utilizados para reconstruir os cromossomos derivativos. As deleções e duplicações detectadas por MPS também foram confirmadas pela análise da cobertura de *reads* normais (*reads* “concordantes”) nas regiões correspondentes. Diminuição e aumento da cobertura das *reads* normais, correspondem respectivamente, a regiões de deleções e duplicações.

II.2.4 Sequenciamento de Sanger dos segmentos de junção dos rearranjos

Os segmentos contendo os pontos de quebra foram amplificados por PCR e sequenciados pelo método de Sanger, para obter os fragmentos de junção das quebras nos cromossomos derivativos, no nível de pares de bases. Os *primers* foram desenhados nas regiões que flanqueiam os pontos de quebra delimitados por MPS, evitando-se regiões repetitivas, usando o programa *RepeatMasker*. As regiões de interesse foram extraídas do UCSC Genome Browser e, para o desenho dos *primers*, foi utilizado o Primer 3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3>). A especificidade dos oligonucleotídeos foi avaliada, usando o programa BLAST do NCBI. Caso a região de ponto de quebra delimitada por MPS fosse >1kb, no mínimo dois pares de *primers* foram desenhados. Para a PCR foram utilizados cerca de 100 ng de DNA genômico, em volume final da reação de 25 µL, na presença de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ iniciadores *forward* e *reverse* e 1,5 U de Taq polimerase. As condições de amplificação iniciais foram: desnaturação inicial por 1 min a 94° C, seguida de 34 ciclos de 45 s a 94° C, hibridação a 58° C por 45s, extensão a 72° C por 1 min, seguidos de extensão final a 72° C, por 10 min. Quando necessário, foram utilizadas diferentes condições de amplificação: desnaturação por 4 min a 94°C, 14 ciclos (-0,5°C a cada ciclo) de desnaturação por 30 s a 94°C, hibridação a 69°C por 40s e extensão final a 72°C por 60s, 23 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, hibridação a 62°C por 40s, extensão a 72°C por 60s e extensão final a 72° por 10 minutos. Para determinar se os *primers* desenhados permitiram a amplificação do fragmento de junção, os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose. A reação de sequenciamento foi realizada conforme o protocolo do fabricante do sequenciador ABI-3730 (*Applied Biosystems*), em volume final de reação de 10 µL, contendo entre 10 e 30 ng de DNA, 0,5 µM do iniciador *forward* ou *reverse*, 1µL de *BigDye Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer* e 2µL de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix* (ambos da *Applied*

Biosystems). Os produtos amplificados foram separados por meio de eletroforese em capilar, no aparelho ABI-3730 (*Applied Biosystems*). As sequências contendo os fragmentos de junção dos rearranjos cromossômicos foram comparadas com o genoma de referência, usando a ferramenta BLAT do UCSC Genome Browser e também o programa *Sequencher*TM (*Gene Codes*, Michigan, USA).

III.2.5 Padrão de inativação do cromossomo X

Determinamos o padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico de quatro portadoras de translocações entre o cromossomo X e um autossomo, com base na metilação do gene *AR*.

- **Metilação do gene *AR***

O estudo do padrão de inativação foi realizado, analisando-se a metilação da repetição polimórfica CAG do gene *AR* (*Androgen Receptor Gene*; Xq11-12), conforme descrito por Allen et al. (1992), com modificações. Próximo à repetição CAG existe um sítio de restrição da enzima *HpaII*, que se encontra metilado apenas no X inativo. A análise do padrão de inativação do cromossomo X é realizada amplificando-se a repetição CAG a partir de DNA genômico submetido ou não a digestão com a enzima *HpaII*. Como a enzima *HpaII* apenas corta os sítios de restrição desmetilados, ou seja dos alelos do gene *AR* localizados no cromossomo X ativo, esses alelos não são amplificados. Duas amostras de 1.000 ng de DNA foram tratadas simultaneamente: uma amostra foi submetida à digestão com 20 U da enzima *HpaII* (Invitrogen), em volume final de 20 µl de reação, por 16 h a 37° C; após a digestão, a enzima foi inativada, incubando-se as amostras a 95°C por cinco minutos; a outra amostra foi incubada, na ausência da enzima *HpaII*. A amplificação foi realizada em um volume de 30 µl de reação de PCR com 4 µl do produto digerido ou não digerido, 1,5 U de Taq polymerase, Buffer 1X, 250 µM de cada deoxiribonucleotídeo, 2,5 mM MgCl₂, 10% DMSO e 15 pmoles de cada primer (*forward*-FAM: 5' gct gtg aag gtt gct gtt cct cat 3' e *reverse*: 5' tcc aga atc tgt tcc aga gcg tgc 3'). As condições de ciclagem foram: um ciclo de 95°C (cinco min), 28 ciclos de 95°C (45 s), 60°C (30 s), 72°C (30 s), extensão final a 72°C (10 min). Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese no aparelho *ABI 310 DNA Analyzer* e analisados com o *software GeneMapper* (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA). A razão de inativação foi determinada utilizando-se os valores dos picos de amplificação dos alelos digeridos e não digeridos:

(phd1/phu1)/(phd1/phu1)+(phd2/phu2), em que phd1 = alelo menor após digestão, phu1 = alelo menor não digerido, phd2 = alelo maior após digestão e phu2 = maior alelo não digerido (Bittel et al., 2008).

III.2.6 Análise da expressão dos genes *LMNB1*, *MARCH3* e *FBN2*

- **PCR quantitativo em tempo REAL (qt-PCT)**

A expressão dos transcritos dos genes *LMNB1*, *MARCH3* e *FBN2*, na família portadora da t(2;22)(p13;q12.2) (BCR B1), foi avaliada por PCR-quantitativo em tempo real. O RNA foi extraído a partir de linfócitos de sangue periférico do probando, sua mãe afetada e controles fenotipicamente normais, usando o NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), de acordo as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA total foi utilizado como molde para a geração de cDNA em reação de RT-PCR, utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Os *primers* para os genes *LMNB1*, *MARCH3* e *FBN2* e o gene de referência *housekeeping ACTB* (actin, beta) foram desenhados, usando o Primer 3. As sequências dos transcritos foram obtidas no banco de dados UCSC. Os *primers* usados para amplificar segmentos do cDNA estão relacionados na Tabela III.2.

As curvas padrão para cada *primer*, para verificar sua eficiência, foram geradas a partir de diluições seriadas. As reações de qRT-PCR foram realizadas no ABI 7500 real-time PCR machine, usando o SYBR® green PCR master mix (Applied Biosystems). Dentre os três genes de referência, o *ACTB* mostrou-se o mais estável, e foi selecionado como gene para normalização dos resultados do qRT-PCR. Todas as amostras foram testadas em triplicatas e a expressão do gene *ACTB* foi usada para calcular os níveis normalizados e relativos de expressão dos genes *LMNB1*, *MARCH3* e *FBN2*.

Tabela III.2: Primers utilizados na amplificação de segmentos de cDNA dos genes *ACTB*, *LMNB1*, *MARCH3* e *FBN2*

Gene	Forward primer (sequências de bases 5'-3')	Reverse Primer (sequências de bases 5'-3')
<i>ACTB</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	AGGACTCCATGCCAGGAA
<i>LMNB1</i>	TGCAAGGCGGAACACGACCA	AGGCTTCCAACCTGGGCAATCTGA
<i>MARCH3</i>	CCAGAGCCCCTTCAATGAC	CCCAAGGTCCCTGTACATTC
<i>FBN2</i>	ACTGGAGCTTGCCAAGATGT	GGGCATCTGCATTCAAAAAGA

**IV. CARACTERIZAÇÃO DE REARRANJOS
CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE
EQUILIBRADOS: DO CARIÓTIPO AO
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

IV. CARACTERIZAÇÃO DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS: DO CARIÓTIPO AO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

IV.1 Introdução

Nos últimos anos avanços técnicos na área de citogenética molecular e, mais recentemente, a aplicação do sequenciamento de nova geração no estudo de rearranjos equilibrados tem permitido estabelecer correlações genótipo-fenótipo mais precisas e contribuído para elucidar os mecanismos de formação desses rearranjos. A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi um avanço importante em comparação ao bandamento para o mapeamento dos pontos de quebra. No entanto, a delimitação dos pontos de quebra por FISH é frequentemente limitada pelo tamanho e espaçamento das sondas utilizadas. Apesar de esses rearranjos serem classificados como “equilibrados”, a aplicação de aCGH evidenciou a presença de desequilíbrios submicroscópicos em cerca de 25% deles (Gribble et al., 2005, De Gregori et al., 2007; Baptista et al., 2008; Fantes et al., 2008; Higgins et al., 2008, Sismani et al., 2008, Schluth-Bolard et al., 2009). A aplicação de aCGH tem permitido não somente detectar alterações submicroscópicas nos pontos de quebra, mas também alterações distantes deles (Gribble et al., 2005; Sismani et al., 2008), uma vantagem em relação à técnica alvo-específica de FISH. Nos últimos anos várias técnicas de sequenciamento denominadas de *next generation sequencing* (NGS) têm sido desenvolvidas (Kloosterman et al., 2012; Talkowski et al., 2011; Scouarnec e Gribble, 2012). A aplicação de NGS no estudo de rearranjos equilibrados aumentou o poder de resolução do mapeamento dos pontos de quebra do nível de megabase (cariótipo) ou de dezenas a centenas de kilobases (FISH e aCGH) para o nível de pares de bases. A caracterização precisa dos rearranjos por NGS tem revelado também a grande complexidade de uma proporção desses rearranjos, com a presença de pontos de quebra adicionais que não são detectadas por cariótipo, FISH ou aCGH (Talkowski et al., 2011; Kloosterman et al., 2012). A identificação desses rearranjos complexos tem propiciado a elaboração de novos mecanismos para explicar a formação desses rearranjos, como o *chromothripsis*. A alta resolução dos pontos de quebra definidos por NGS também tem tornado factível o sequenciamento dos segmentos de junção das quebras pelo método de Sanger, evidenciando os mecanismos de reparo das quebras que originaram o rearranjo.

No presente trabalho aplicamos as técnicas de aCGH, FISH e MPS no estudo de 45 rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos. A comparação dos resultados obtidos usando as três técnicas permitiu determinar sua eficiência na caracterização desse tipo de alteração cromossômica.

IV.2 Metodologia

A metodologia utilizada foi descrita no Capítulo III – Pacientes e Métodos.

IV.3 Resultados e discussão

IV.3.1 Investigação dos rearranjos por aCGH

Todos os 45 pacientes foram avaliados quanto à presença de variações de números de cópias por aCGH. Em 14 dos 45 pacientes foram detectadas variações no número de cópias em regiões nas quais há poucas variações ou não há variações documentadas no *Database of Genomic Variants* (DGV) (Tabela IV.1). Basendo-se em seu tamanho (>500 kb, em sua maioria) e conteúdo gênico (regiões contendo genes sensíveis à dosagem ou regiões ricas em genes), a maioria dessas CNV podem ser consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas.

Em 12 dos 45 pacientes foram detectadas deleções ou duplicações patogênicas ou provavelmente patogênicas localizadas nos cromossomos rearranjados (Tabela IV.1). Em sua maioria os desequilíbrios submicroscópicos estavam localizados nos pontos de quebra citogenéticos ou próximos a eles; no entanto deleções e duplicações também foram encontradas a grandes distâncias desses pontos de quebra, evidenciando a complexidade dos rearranjos. O tamanho das deleções ou duplicações variou entre 2,2 Kb a 6,6 Mb. O número de desequilíbrios por rearranjo variou entre um e oito. Com exceção de dois rearranjos (BCR A31: ins(16)(p13.1q23q12.1); BCR B1 t(2;22)(p13;q12.2)mat), nos quais foram detectados perdas e ganhos, os rearranjos continham apenas deleções. Os rearranjos complexos estavam mais frequentemente associados a desequilíbrios (83%; cinco dentre seis rearranjos) do que as translocações (25%; sete de 27 translocações). Não foram identificados perdas ou ganhos associados a inversões. Os desequilíbrios detectados por aCGH foram importantes tanto para identificar a causa dos quadros clínicos, como também para elucidar os mecanismos de formação dos rearranjos, conforme discutido adiante. A alta frequência de desequilíbrios associados a rearranjos citogeneticamente equilibrados (27%) e a

prevalência de deleções também foram observadas na investigação de 216 rearranjos equilibrados analisados por aCGH em estudos anteriores (Gribble et al., 2005, Sismani et al., 2008, Baptista et al., 2008, Higgins et al., 2008, De Gregori et al., 2007, Schluth-Bolard et al., 2009, Gijsbers et al., 2010, Feenestra et al., 2011). A predominância de deleções em relação a ganho de segmentos seria resultado do mecanismo de formação desses rearranjos, levando preferencialmente à perda de material, conforme será discutido adiante. Por outro lado, a predominância de deleções também pode refletir a menor impacto clínico das duplicações que, assim, não estariam presentes nos indivíduos selecionados para os estudos (Schluth-Bolard et al., 2009).

Apesar de, na maioria dos rearranjos de nossa amostra, os desequilíbrios se localizarem em cis aos pontos de quebra, o rearranjo de fato pode estar equilibrado e o fenótipo ser causado por perda ou ganho de segmentos de cromossomos que não participam dele (Morales et al., 2009). Em dois de nossos pacientes, deleções não associadas aos rearranjos foram identificadas, sendo elas a causa do quadro clínico: BCR A6: inv(17)(p11.2q21.3); BCR C1: inv(12)(p11.2q24.1)mat. Essa é uma vantagem da análise por *microarrays*, que realiza a investigação global do genoma, permitindo detectar, em portadores de rearranjos equilibrados, alterações patogênicas em cromossomos que não participam desses rearranjos.

IV.3.2 Investigação dos rearranjos por FISH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram os rearranjos, realizamos hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC, mapeados nas regiões dos pontos de quebra que foram determinados pela análise após bandamento G, em 15 dos 45 rearranjos cromossômicos analisados (Tabela IV.2). Em 11 rearranjos, os pontos de quebra mapeados por FISH foram posteriormente refinados por MPS. A técnica de FISH também foi utilizada para confirmar desequilíbrios submicroscópicos identificados por aCGH, naqueles pacientes nos quais suspensões celulares estavam disponíveis para análise.

Tabela IV.1: 14 pacientes portadores de rearranjos citogeneticamente equilibrados, nos quais a análise por aCGH revelou variações de número de cópias patogênicas ou provavelmente patogênicas localizadas nos cromossomos rearranjados (12 pacientes) ou em outras regiões do genoma (2 pacientes).

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Tipo de CNV	Banda	Localização (hg19)	Tamanho kb	Genes mapeados nos segmentos deletados ou duplicados
A1	t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)	Del	7q33	chr7:135994754-138144754	2150	<i>CHRM2, PTN, DGKI, CREB3L2, AKR1D1, TRIM24</i>
		Del	7q34	chr7:138222963-138273080	50	<i>TRIM24</i>
		Del	7q34	chr7:138562762-140107065	1544	<i>KIAA1549, ZC3HAV1L, ZC3HAV1, TTC26, UBN2, C7orf55, LUC7L2, KLRG2, CLEC2L, HIPK2, TBXAS1, PARP12, JHDM1D, LOC100134229, RAB19</i>
		Del	7q34	chr7:140274928-140982607	707	<i>DENND2A, ADCK2, LOC100134713, NDUFB2, BRAF, MRPS33, TMEM17B</i>
		Del	7q35	chr7:144738971-145349495	610	Não há
		Del	11p14.1p13	chr11:28964028-31926058	2962	<i>KCNA4, FSHB, C11orf46, MPPED2, DCDC1, AJC24, IMMP1L, ELP4, PAX6</i>
A2	t(6;18)(q13;q22)	Del	18q21.1q21.2	chr18:47555744-50276170	2720	<i>MYO5B, CCDC11, MBD1, CXXC1, SKA1, MAPK4, MRO, ME2, ELAC1, SMAD4, MEX3C, DCC</i>
		Del	18q21.2	chr18:50600596-50976024	375	Não há
A3	t(6;7)(q12;q31)	Del	6q14.3	chr6:84942016-88040620	3098	<i>TBX18, NT5E, SNX14, SYNCRIP, HTR1E, CGA, ZNF292, C6orf162, GJB7</i>
A4	t(10;21)(p13;q22) ⁽¹⁾	Del	10p14	chr10:10221542-11194881	973	<i>CUGPQ2</i>
		Del	10p13	chr10:13107142-14257936	1150	<i>OPTN, MCM10, C10orf49, PHYH, SEPHS1, BFIM7, PRPF18, FMRD4A</i>
		Del	10q26.2	chr10:125067151-125767527	700	<i>GPR26, CPXM2</i>
		Del	10q26.2q26.3	chr10:129741203-131399691	1660	<i>PTPRE, MKI67, MGMT</i>

(Continua)

Tabela IV.1: 14 pacientes portadores de rearranjos citogeneticamente equilibrados, nos quais a análise por aCGH revelou variações de número de cópias patogênicas ou provavelmente patogênicas localizadas nos cromossomos rearranjados (12 pacientes) ou em outras regiões do genoma (2 pacientes). (continuação)

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Tipo de CNV	Banda	Localização (hg19)	Tamanho (kb)	Genes mapeados nos segmentos deletados ou duplicados
A5	ins(2)(p13;q11.2q21)ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)	Del	2q31.1	chr2:170424322-171125070	700	<i>FASTKD1</i> , <i>PPIG</i> , <i>CCDC173</i> , <i>PHOSPHO2</i> , <i>PHOSPHO2-KLHL2</i> , <i>KLHL23</i> , <i>SSB</i> , <i>METTL5</i> , <i>UBR3</i> , <i>MYO3B</i>
A6	inv(17)(p11.2q21.3)	Del	2q23.1	chr2:148727194-149151523	424	<i>ORC4</i> , <i>MBD5</i>
A17	t(5;18)(q33.3;q21.1)	Del	5q33.2 -q33.3	chr5:154051805-156530618	2478	<i>LARPI</i> , <i>C5orf4</i> , <i>CNOT8</i> , <i>GEMIN5</i> , <i>MRPL22</i> , <i>KIF4B</i> , <i>SGCD</i> , <i>PPP1R2P3</i> , <i>TIMD4</i> , <i>HAVCR1</i> , <i>HAVCR2</i> , <i>LOC100286948</i> .
A20	t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1)	Del	1p36.12	chr1:20555399-20599305	43.9	Não há
		Del	17p13.3	chr17:2589516-2591714	2.2	<i>CLUH</i>
A22	t(1;2)(p34.3;q31)	Del	1p34.3	chr1:34686140-37703728	3017	<i>GJB5</i> , <i>GJB4</i> , <i>GJB3</i> , <i>GJA4</i> , <i>C1orf212</i> , <i>DLGAP3</i> , <i>ZMYM6</i> , <i>ZMYM1</i> , <i>SFPQ</i> , <i>ZMYM4</i> , <i>KIAA0319L</i> , <i>NC</i> , <i>TFAP2E</i> , <i>PSMB2</i> , <i>C1orf216</i> , <i>CLSPN</i> , <i>EIF2C4</i> , <i>EIF2C1</i> , <i>EIF2C3</i> , <i>TEKT2</i> , <i>ADPRHL2</i> , <i>COL8A2</i> , <i>TRAPPC3</i> , <i>MAP7D1</i> , <i>THRAP3</i> , <i>C1orf113</i> , <i>FAM176B</i> , <i>STK40</i> , <i>LSM10</i> , <i>OSCP1</i> , <i>MRPS15</i> , <i>CSF3R</i> , <i>GRIK3</i>
		Del	1p34.3	chr1:38591421-39403409	811	<i>RRAGC</i> , <i>MYCPQ</i> , <i>GJA9</i> , <i>RHBDL2</i>
		Del	2q31.1	chr2:172676240-173760787	1084	<i>SLC25A12</i> , <i>HAT1</i> , <i>MAP1D</i> , <i>DLX1</i> , <i>DLX2</i> , <i>ITGA6</i> , <i>PDK1</i> , <i>LOC91149</i> , <i>RAPGEF4</i>
A26	t(X;17)(q21~22;p11.1)	Del	Xq25	chrX:121781004-121871066	90	Não há

(Continua)

Tabela IV.1: 14 pacientes portadores de rearranjos citogeneticamente equilibrados, nos quais a análise por aCGH revelou variações de número de cópias patogênicas ou provavelmente patogênicas localizadas nos cromossomos rearranjados (12 pacientes) ou em outras regiões do genoma (2 pacientes). (continuação)

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Tipo de CNV	Banda	Localização (hg19)	Tamanho (kb)	Genes mapeados nos segmentos deletados ou duplicados
A30	ins(1)(q32.1p21p34.1)	Del	1p21.2	chr1:100104421-100699040	494	<i>PALMD, MIR548D1, FRRS1, AGL, SLC35A3, HIAT1, SASS6, CCDC76, LRRC39, DBT</i>
A31	ins(16)(p13.1q23q12.1)	Dup	16p13.3	chr16:4753026-4931019	178	<i>ANKS3, C16orf71, ZNF500, SEPT12, LOC440335, ROGD1, GLYR1, UBN1</i>
		Dup	16p12.3	chr16:17339544-17560685	221	<i>XYLT1</i>
		Dup	16p11.2-p11.1	chr16:34482131-34727365	245	<i>LOC283914, LOC146481</i>
		Del	16q22.1	chr16:70322823-70809280	486	<i>AARS, DDX19B, DDX19A, ST3GAL2, FUK, COG4, SF3B3, SNORD111B, SNORD111, IL34, MTSS1L, VAC14</i>
		Del	16q22.1-q23.1	chr16:71205541-76989164	5783	<i>HYDIN, FTSJD1, CALB2, ZNF23, ZNF19, CHST4, TAT, MARVELD3, PHLPP2, APIG1, SNORD71, ATXN1L, ZNF821, KIAA0174, PKD1L3, DHODH, HTA, PSMD7, LOC283922, CLEC18B, GLG1, RFWD3, MLKL, FA2H, WDR59, ZNRF1, LDHD, ZFP1, CTRB2, CTRB1, BCAR1, CFDP1, TMEM170A, CHST6, CHST5, TMEM231, GABARAPL2, ADAT1, KARS, TERF2IP, CNTNAP4</i>
		Dup	16q23.1	chr16:77671477-77890426	219	<i>NUDT7, VAT1L</i>
		Dup	16q24.1	chr16:85282361-85312181	29.8	Não há
		Dup	16q24.1	chr16:85541469-86011888	470	<i>KIAA0182, GINS2, C16orf74, MIR1910, COX4NB, COX4I1, IRF8</i> (Continua)

Tabela IV.1: 14 pacientes portadores de rearranjos citogeneticamente equilibrados, nos quais a análise por aCGH revelou variações de número de cópias patogênicas ou provavelmente patogênicas localizadas nos cromossomos rearranjados (12 pacientes) ou em outras regiões do genoma (2 pacientes). (continuação)

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Tipo de CNV	Banda	Localização (hg19)	Tamanho (kb)	Genes mapeados nos segmentos deletados ou duplicados
B1	t(2;22)(p13;q12.2)mat	Del	5p15.1	chr5:15097402-16551445	1400	<i>FBXL7, MARCH11, ZNF622, FAM134B</i>
		Del	5q23.2q23.3	chr5:123798118-130432974	6634	<i>ALDH7A1, PHAX, MARCH3, LMNB1, FBN2, SLC12A2, SLC27A6, ADAMTS19, CTXN3, CHSY3, MEGF10, ZNF608, GRAMD3, C5orf48, ISOC1</i>
B1(1)*	t(2;22)(p13;q12.2)mat	Del	5q23.2q23.3	chr5:123798118-130432974	6634	<i>ALDH7A1, PHAX, MARCH3, FBN2, C5orf48, LMNB1, SLC12A2, SLC27A6, ADAMTS19, CTXN3, CHSY3, ISOC1, MEGF10, ZNF608, GRAMD3</i>
		Del	2p14	chr2:65237764-66484321	1246	<i>CEP68, RAB1A, ACTR2, ARP2, SPRED2, SLC1A4</i>
C1	inv(12)(p11.2q24.1)mat	Del	8p22p21.2	chr8:15460343-24215797	8700	<i>TUSC3, MSRI, FGF20, EFHA2, CNOT7, ZDHHC2, VPS37A, MTMR7, SLC7A2, PDGFRL, MTUS1, FGL1, PCMI, ASAH1, NAT1, NAT2, PSD3, SH2D4A, CSGAL, NACT1, INTS10, LPL, SLC18A1, ATP6V1B2, LZTS1, GFRA2, DOK2, XPO7, NPM2, FGF17, EPB49, REEP4, FAM160B2, NUDT18, HR, LGI3, SFTPC, BMP1, PHYHIP, POLR3D, PIWIL2, SLC39A1, PPP3CC, SORBS3, PDLIM2, C8orf58, KIAA1967, BIN3, EGR3, PEPQ4, RHOTB2, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF10A, CHMP7, R3HCC1, LOXL2, ENTPD4, SLC25A37, NKX3-1, NKX2-6, STC1, ADAM28</i>

* B1(1) refere-se ao irmão do probando (B1) (Capítulo VII). B1(1) também é portador da translocação t(2;22)(p13;q12.2)mat.

Tabela IV.2: Mapeamento por FISH dos pontos de quebra de 15 rearranjos citogeneticamente equilibrados.

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho kb	Genes nos pontos de quebra
A1	46,XY,t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)	chr7:146,808,760-146,922,794	114	<i>CNTNAP2</i>
		chr10:27897058-28081590	184	<i>MKX</i>
		chr11:27718086-27929856	212	
		chr11:37068735-38957367	1888	
A2	46,XY, t(6;18)(q13;q22)	chr6:70302791-71064771	761	<i>LMBRD1, COL19A1, COL9A1</i>
		chr18:68777622-69739381	961	<i>LOC100505776</i>
A3	46,XY,t(6;7)(q12;q31)	chr6:66964875-68156447	1191	Não há
		chr7:124891133-125077116	186	Não há
A4	46,XX, t(10;21)(p13;q22)	chr10:14474313-14912604	438	<i>FAM107B, HSPA14, CF</i>
		chr21:45848265-46022489	174	<i>LRR3, KRTAP, C21orf90</i>
A6	46,XY,inv(17)(p11.2q21.3)	chr17:18093660-18172954	79	<i>ALKBH5, LLGL1, FLII, DQ596932, piR-34998</i>
		chr17:20192547-20289787	97	<i>SPECC1, CCDC144CP</i>
		chr17:47586370-47753071	166	<i>NGFR, NXPH3</i>
A7	46,XX,t(2;16)(q36.1;q24.1)	chr2:220983218-220987674	4	Não há
		chr16:86140084-86192535	52	Não há
A8	46,XX, t(10;21)(q21.2;q22.2)	chr10:11053430-11766246	712	<i>CELF2, USP6NL</i>
		chr10:53399422-53454988	56	<i>PRKG1</i>
		chr21:38014818-38618318	603	<i>SIM2, HLCS, DSCR6, PIGP, DSCR9, TTC3, DSCR3</i>
		chr21:38803589-38887895	84	<i>DYRK1A</i>

(Continua)

Tabela IV.2: Mapeamento por FISH dos pontos de quebra de 15 rearranjos aparentemente equilibrados. (Continuação)

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho (kb)	Genes nos pontos de quebra
A9	46,XX, t(4;18)(p15.2;q11.2)	chr4:25499481-25669385	169	<i>SLC34A2</i>
		chr18:19115875-19117522	2	<i>ESCO1</i>
A10	46,XY,inv(12)(q21q23)	chr12:69342257-70156079	814	<i>CPSF6, MIR1279, LYZ, YEATS4, FRS2, MIR3913-1, MIR3913-2, CCT2, LRRC10, BEST3, BC042465, RAB3IP</i>
		chr12:110194667-110317566	123	<i>FAM222A, TRPV4, GLTP</i>
A11	46,XX,t(9;20)(q22.3;p13)	chr9:95492745-95674924	182	<i>BICD2, ANKRD19P, ZNF484</i>
		chr20:2493424-2652594	159	<i>TMC2, NOP56, IDH3B</i>
A12	46,XX,t(X;13)(p21;q12)	chr13:20323995-20408526	84	<i>PSPC1, ZMYM5</i>
		chrX:14191254-14347028	155	
A16	46,XY,t(2;18)(q33;q21.3)	chr2: 165273419-197680881	32400	138 genes
		chr18: 52551089-56838036	4200	16 genes
B1	46,XY,t(2;22)(p13;q12.2)mat	chr2:65209004-65305471		<i>SLC1A4</i>
		chr22:28644093-28666303		
C2	46,XY,t(6;15)(q23.1;q22.1)mat	chr6:121522541-122575840	1053	<i>C6orf170, GJA1</i>
		chr15:43804629-43858317	53	<i>MAP1A, PPIPSK1</i>
C3	46,XY,t(6;22)(q14;q11)mat	chr6:73218079-75892199	2674	<i>KCNQ5, MIR4282, KCNQ5-AS1, KHDC1L, KHDC1, AL832252, DPPA5, KHDC3L, OOEP, DDX43, MB21D1, MTO1, EEF1A1, SLC17A5, AK124950</i>
		chr22:14700000-17242248	2542	<i>POTEH, OR11H1, TPTEP1, CCT8L2</i>

IV.3.3 Investigação dos rearranjos por MPS

Dentre os 45 rearranjos equilibrados, 35 foram submetidos a sequenciamento por MPS. A análise de 27 rearranjos permitiu a caracterização dos pontos de junção das quebras (Tabela IV.3). Nove desses rearranjos estavam associados a desequilíbrios submicroscópicos previamente identificados por aCGH. Em oito rearranjos, não foi possível caracterizar os pontos de quebra, provavelmente devido à presença de sequências altamente repetitivas ou de sequências repetidas no genoma (por exemplo, *Low Copy Repeats*/duplicações segmentares) nas regiões das quebras: inv(17)(p11.2q21.3); t(9;20)(q21.11;q13.31); t(X;17)(q21~22;p11.1); t(X;17)(q11.2;q11.2); inv(18)(p11.2q11.2); inv(7)(p12q22.1)mat; t(6;15)(q23.1;q22.1)mat; t(6;22)(q14;q11)mat (Tabela III.1). Durante o alinhamento das *reads* em relação ao genoma de referência, são alinhadas apenas aquelas que mapeiam em uma única região do genoma e, conseqüentemente, as *reads* que mapeiam em regiões repetitivas são descartadas.

Três dos quatro rearranjos mais complexos, com 17-20 quebras [BCRA1: t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35;p14p13); BCRA20: t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1); BCR A4:t(10;21)(p13;q22)], apresentaram indícios de formação a partir do mecanismo de *chromothripsis*. Outro rearranjo complexo com 24 quebras - BCR A31: ins(16)(p13.1q23q12.1), apresentou sinais de formação a partir de mecanismo baseado em erros de replicação de DNA.

Considerando os 27 rearranjos que tiveram a análise concluída, MPS expandiu o número de pontos de quebra, detectados por análise do cariótipo ou aCGH, de 114 para 156 (em resolução < 2kb, na maioria dos casos; Tabela IV.4). Os 42 pontos de quebra adicionais foram detectados em oito rearranjos. O número de pontos de quebra/rearranjo variou de 2 a 20. Os 156 pontos de quebra resultaram em 86 variantes estruturais equilibradas e outras 32 variantes não equilibradas. Entre as 118 variantes estruturais identificadas por MPS, 28 não equilibradas e 33 equilibradas haviam sido detectadas, respectivamente, por aCGH e análise do cariótipo. A taxa de detecção de variantes estruturais detectadas exclusivamente por MPS diferiu entre os diferentes tipos de variantes: deleções (4/25), inversões (1/7), inserção intracromossômica direta (18/20) e inserção intracromossômica invertida (13/15), translocações (3/25), inserção intercromossômica direta (8/10) e inserção intercromossômica invertida (10/13) (Tabela IV.4).

A maioria das variantes estruturais identificadas exclusivamente por MPS (49/57) foram as inserções inter e intracromossômicas (Tabela IV.4). Como discutido no Capítulo IX sobre mecanismos de formação, o elevado número de inserções inter e intracromossômicas nos rearranjos reflete a extensa reorganização cromossômica associada aos rearranjos complexos, principalmente aqueles com perdas e ganhos de segmentos cromossômicos. As inserções identificadas não foram detectadas por aCGH por serem variantes equilibradas que não alteram o número de cópias de segmentos. As inserções crípticas também não foram detectadas por bandamento G já que não houve mudança no padrão de bandamento, devido ao tamanho dos fragmentos inseridos. O mapeamento dos pontos de quebra por FISH pode detectar inserções crípticas, como ocorreu no estudo da translocação $t(10;21)(q21.2;q22.2)$ (BCR A8). No entanto, determinar a posição precisa do fragmento inserido no cromossomo derivativo usando FISH é processo laborioso e, frequentemente inconclusivo, devido à resolução das sondas utilizadas. Ressalta-se também que essas inserções foram detectadas em sua maioria em rearranjos associados a extensa reorganização cromossômica, tornando a identificação e a caracterização ainda mais complexa.

A grande maioria das alterações não equilibradas nos cromossomos rearranjados já havia sido identificada por meio de aCGH; em apenas uma translocação $-t(5;18)(q33.3;q21.1)$ (BCR A17), quatro deleções nos cromossomos rearranjados foram identificadas apenas por MPS. Nesse caso, as deleções incluíam um a dois oligonucleotídeos e, assim, não foram detectadas por aCGH, já que a resolução da lamina 180K requer alteração de, no mínimo, três oligos para identificar a presença de variação de número de cópia no genoma. Esses resultados indicam que a aplicação de um *array* com a resolução da plataforma de 180K que utilizamos, é suficiente para detectar a maioria das perdas e ganhos associados a rearranjos citogeneticamente equilibrados.

A interpretação dos dados de MPS diferiu de acordo com a complexidade dos rearranjos. Os pontos de quebras de inversões e translocações simples foram identificadas, usando o programa SVDetect e, posteriormente, os resultados foram confirmados pela análise independente de *paired-reads* e visualizados no IGV browser. A análise independente de *reads* foi importante para redefinir alguns pontos de quebra que não haviam sido corretamente delimitados pelo SVDetect.

Tabela IV.3: Resumo da análise por *mate-pair sequencing* dos segmentos de junção de 27 rearranjos citogeneticamente equilibrados.

BCR	Cariótipo (Bandamento G)	Dados do <i>Mate-pair sequencing</i>												
		VS*	PQ	VS exclus por MPS ⁽¹⁾	PQ exclus por MPS ⁽²⁾	Transl	Ins dir Inter	Ins inv Inter	Inver	Ins dir Intra	Intra inv ins	Del	Dup	Genes
A1	t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)	18	20	10	4	1	2	4	0	4	1	6	0	9
A3	t(6;7)(q12;q31)	2	4	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	3
A4	t(10;21)(p13;q22)	17	18	12	8	1	1	2	0	6	3	4	0	8
A5	ins(2)(p13;q11.2q21)ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)	7	10	4	1	0	0	1	1	3	1	1	0	3
A7	t(2;16)(q36.1;q24.1)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A8	t(10;21)(q21.2;q22.2)	4	5	3	3	1	0	1	0	1	1	0	0	3
A9	t(4;18)(p15.2;q11.2)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A10	inv(12)(q21q23)	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
A11	t(9;20)(q22.3;p13)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A12	t(X;13)(p21;q12)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A15	t(4;10)(q24;q22)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A16	t(2;18)(q33;q21.3)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
A17	t(5;18)(q33.3;q21.1)	11	12	9	9	1	1	0	0	3	1	5	0	3
A20	t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1)	17	17	10	7	7	4	4	0	0	0	2	0	7
A21	t(4;14)(q27;q13)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A22	t(1;2)(p34.3;q31)	5	6	1	0	1	0	0	0	0	1	3	0	3
A23	t(11;18)(q13.1;q21.31)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
A25	t(14;15)(q13;q22.1)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
A29	inv(3)(p14p26)	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
A31	ins(16)(p13.1q23q12.1)	13	20	4	6	0	0	0	0	0	5	2	6	9

*VS, número total de variantes estruturais que formam o rearranjo; **PQ, número total de pontos de quebra que formam o rearranjo;
 (1) VS, variantes estruturais e (2) PQ, pontos de quebra identificados exclusivamente por MPS.

(Continua)

Tabela IV.3: Resumo da análise por *mate-pair sequencing* dos segmentos de junção de 27 rearranjos citogeneticamente equilibrados. (continuação).

BCR*	Carótipo (Bandamento G)	Dados do <i>Mate-pair sequencing</i>												
		VS*	PQ**	VS Exclus por MPS ⁽¹⁾	PQ exclus. por MPS ⁽²⁾	Transl	Ins dir Inter	Ins inv Inter	Inver	Ins dir Intra	Intra inv ins	Del	Dup	Genes
B1	t(2;22)(p13;q12.2)mat	7	10	4	4	1	1	0	0	2	1	1	1	4
B2	inv(2)(q14.3q31.1)	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C1	inv(12)(p11.2q24.1)mat	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
C6	inv(12)(q15q24.2)mat	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
C9	inv(3)(p12~13p25~26)mat	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2
C10	t(2;9)(q14.2;p22)pat	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
C11	t(1;7)(q23.1;p13)	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
TOTAL		118	156	57	42	25	9	12	7	19	14	25	7	71

*VS, número total de variantes estruturais que formam o rearranjo; **PQ, número total de pontos de quebra que formam o rearranjo; (1) VS, variantes estruturais e (2) PQ, pontos de quebra identificados exclusivamente por MPS

Tabela IV.4: Comparação das análises por bandamento G, aCGH e MPS na identificação dos diferentes tipos de variantes estruturais identificadas nos 27 rearranjos citogeneticamente equilibrados cuja análise por MPS foi concluída.

Tipo de variante estrutural (VS)	Bandamento G	aCGH	MPS	Exclusivamente por MPS
Translocação	22	0	25	3
Inserção intercromossômica direta	1	0	9	8
Inserção intercromossômica invertida	2	0	12	10
Inversão	6	0	7	1
Inserção intracromossômica direta	1	0	19	18
Inserção intracromossômica invertida	1	0	14	13
Deleção	0	21	25	4
Duplicação	0	7	7	0
Número total de variantes estruturais	33	28	118	57

Os resultados obtidos com o uso do SVDetect na análise dos rearranjos complexos não foram conclusivos, porque a ferramenta interpretou erroneamente os dados de MPS, ao deixar de identificar pontos de quebra, estabelecer *links* incorretos entre os fragmentos de junção ou interpretar incorretamente o tipo de variante estrutural associada a *paired-reads* discordantes. Dentre os tipos de variantes estruturais não detectadas pelo SVDetect, houve predominância de ganhos e perdas de segmentos. O SVDetect, como a maioria das ferramentas disponíveis, não é capaz de analisar a profundidade da cobertura de *reads*, análise essencial para identificação de variações no número de cópias a partir dos dados de NGS. Diminuições e aumentos da cobertura das *reads* normais correspondem, respectivamente, a regiões de deleções e duplicações. As deleções e duplicações são identificadas pelo SVDetect com base em pares de *reads* com distâncias aberrantes e na orientação dessas *reads*. No estudo de rearranjos equilibrados, esse método só detecta deleções ou duplicações que não estão mapeadas nos pontos de quebra. Por exemplo, a deleção em 6q14.3 associada à translocação t(6;7)(q12;q31) (BCR A3) foi identificada pelo SVDetect. A deleção, que está localizada a 17 Mb do ponto de quebra da translocação no cromossomo 6 foi detectada pela diminuição da distância entre as *reads* que flanqueiam a deleção em relação a genoma de referência. Por outro lado, nenhuma das três deleções (duas no cromossomo 1 e uma deleção no cromossomo 2) associadas à translocação t(1;2)(p34.3;q31) (BCR A22) foram detectadas pelo SVDetect. As três deleções estão localizadas nos pontos de quebra da translocação. Assim o SVDetect identificou a translocação entre os cromossomos 1 e 2, baseada nos pares de *reads* em que uma alinha no cromossomo 1 e a outra do cromossomo 2, mas não foi capaz de detectar as deleções, porque não há pares de *reads* com distâncias aberrantes nesse caso. Em nosso estudo, primeiramente investigamos a presença de deleções ou duplicações por aCGH e os dados de MPS foram usados para confirmar esses desequilíbrios cromossômicos e refinar seus pontos de quebra. Caso o MPS seja a única ferramenta para detectar deleções/duplicações associadas a rearranjos equilibrados, é necessário desenvolver *pipeline* capaz de identificar alteração da cobertura total das *reads*, uma vez que as ferramentas disponíveis (SVDetect, Delly, BrakeDancer) não são capazes de fazer esse tipo de análise. Assim, a reconstrução dos cromossomos derivativos de rearranjos complexos foi baseada na análise manual das *reads* discordantes visualizadas no IGV browser, auxiliada pelos resultados do SVDetect. Os dados prévios de FISH e, principalmente, de aCGH, uma vez que a maioria dos rearranjos complexos estavam associados a

microdeleções e duplicações, foram essenciais para identificar *paired-reads* “perdidas”, necessárias para reconstruir os cromossomos derivativos.

IV.4. Conclusões

Nossos resultados ilustram a importância de aliar-se a análise de variações de número de cópias detectadas por aCGH ao mapeamento dos pontos de quebra por MPS, na investigação de rearranjos equilibrados citogeneticamente. Enquanto o aCGH consegue de forma eficiente e rápida identificar desequilíbrios submicroscópicos frequentemente associados aos rearranjos, o MPS permite determinar a estrutura precisa dos cromossomos derivativos, ao identificar variantes estruturais equilibradas e não equilibradas, incluindo aquelas que não são detectadas pelas técnicas de citogenética clássicas (cariótipo) e molecular (FISH).

Nossos dados evidenciam assim também a eficiência do MPS para caracterizar a estrutura precisa dos rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados, especialmente aqueles associados à microdeleções ou duplicações crípticas, já que nossos dados mostram que esses rearranjos estão frequentemente associados a variantes estruturais equilibradas (translocações, inversões e inserções) que não são detectadas por cariótipo, FISH e aCGH. Apesar de alguns desses rearranjos já terem sido classificados como complexos na análise por bandamento G, (BCR A1, A5, A20, A31), outros rearranjos foram inicialmente identificados como translocações simples (BCR A8, A4, A17, B1). Um exemplo, é a translocação t(10;21) (BCR A4), que foi identificada inicialmente como uma translocação simples, mas a análise por MPS revelou ser um dos rearranjos mais complexos de nossa amostra com 18 quebras (BCR A4). Os dados do MPS revelaram que os rearranjos complexos aparentemente equilibrados tendem a conter pontos de quebras adicionais que não foram identificados no cariótipo. A análise revelou também que rearranjos aparentemente simples também podem ser mais complexos, principalmente aqueles cuja análise por aCGH revelou a presença de microdeleções ou duplicações. Baseando-se nesses dados propomos que todos os rearranjos equilibrados, simples e complexos, devem ser investigados usando MPS ou outras técnicas baseadas em *next generation sequencing*. Outra vantagem do MPS em relação às técnicas usadas anteriormente em nosso estudo é o mapeamento dos pontos de quebras em segmentos <1kb, na maioria dos casos. O posterior refinamento dos pontos de quebra por meio do sequenciamento Sanger, permite a localização precisa das quebras no nível de pares de bases, análise essencial para a compreensão do

mecanismo de formação desses rearranjos. Caso tivéssemos aplicado apenas a técnica de FISH no mapeamento dos pontos de quebra, seria necessário o uso de técnicas laboriosas, como *chromosome walking*, *long range-PCR* e *Southern blotting*, para localizar precisamente as quebras. Na resolução oferecida por MPS também é possível determinar se ocorreu quebra gênica, ao contrário da análise por FISH na qual mais de um gene estava contido no segmento delimitado para o ponto de quebra ou não havia certeza da quebra gênica.

**V. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS
CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS
ASSOCIADOS A QUADROS CLÍNICOS:
MECANISMOS PATOGÊNICOS**

V. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS ASSOCIADOS A QUADROS CLÍNICOS: MECANISMOS PATOGÊNICOS

V.1 Introdução

A maioria dos portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados são clinicamente normais, mas 7% desses rearranjos estão associados a alterações fenotípicas. Vários mecanismos têm sido identificados para explicar a associação entre os rearranjos e fenótipos alterados: interrupção de genes pelas quebras cromossômicas; modificação da expressão de gene próximo aos pontos de quebra devido a alteração de regiões reguladoras de genes próximos a quebra, efeito de posição e formação de gene híbrido. A dissomia uniparental também pode ser a causa do fenótipo, principalmente no caso de rearranjos herdados. A aplicação de técnicas como aCGH e NGS no estudo de rearranjos citogeneticamente equilibrados associados a quadros clínicos têm sido fundamentais para evidenciar mecanismos causadores de doenças. A aplicação de *microarrays* de DNA revelou que duplicações e, principalmente, deleções nos cromossomos rearranjados podem explicar os fenótipos alterados em cerca de 30% dos casos. O mapeamento de pontos de quebra em alta resolução obtido pela aplicação de NGS no estudo desses rearranjos tem permitido identificar genes candidatos de forma rápida e eficiente.

V.2 Metodologia

No presente trabalho aplicamos as técnicas de aCGH, FISH e MPS no estudo de 45 rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos, com o objetivo de identificar mecanismos responsáveis pelas alterações fenotípicas (Tabela III.1). Vinte sete rearranjos foram investigados por MPS e aCGH; 18 rearranjos foram analisados apenas por aCGH. A metodologia utilizada foi descrita no Capítulo III – Pacientes e Métodos.

V.3 Resultados e discussão

V.3.1 Perdas e ganhos de segmentos cromossômicos

Verificamos que 12 dos 45 rearranjos citogeneticamente equilibrados estavam associados a desequilíbrios submicroscópicos em cis aos pontos de quebra, em segmentos não descritos como variações de números de cópias no DGV (Tabela IV.1). O número de genes deletados ou duplicados por rearranjo variou entre um e 72. Em um

rearranjo, gene sensível a dosagem, já relacionado a doença está localizado nas regiões de deleções - gene *PAX6*, BCRA1: t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13); no entanto, outros genes afetados pelo rearranjo também podem contribuir para o fenótipo nesse caso. Nos segmentos deletados de duas translocações foram identificados genes (*SYNCRIP* e *GRIK3*) cujas mutações foram anteriormente consideradas como candidatas a causar comprometimento intelectual, fornecendo assim evidência adicional de que esses genes estejam relacionados a deficiência intelectual. Nos outros nove rearranjos, desconhece-se o efeito clínico da perda ou do ganho em heterozigose dos genes mapeados nas regiões das deleções. Apesar da ausência de genes candidatos, a complexidade desses rearranjos sugere relação causal dos desequilíbrios com o quadro clínico dos portadores. Conforme discutido adiante, mesmo regiões de desequilíbrios, que não contêm genes, podem ter relação causal com o fenótipo. Por exemplo, a deleção próxima ao gene *GRIA3* detectada na portadora de translocação t(X;17)(q21~22;p11.1) (BCR A26) está provavelmente associada a alteração da região reguladora do gene. Por outro lado, perdas ou ganhos de segmentos, cujo efeito é provavelmente patogênico, podem não ser a principal causa do quadro clínico. Em uma inserção do cromossomo 16 - ins(16)(p13.1q23q12.1) (BCR A31), associada a seis duplicações e duas deleções que incluíram 88 genes, a principal causa do fenótipo parece ser a interrupção da região reguladora do gene *SALL1*, mapeado a 180 kb 5' de um dos pontos da inserção.

Como a análise por *microarray* permite a investigação global do genoma, pode detectar, em portadores de rearranjos equilibrados, alterações patogênicas em cromossomos que não participam desses rearranjos. Um exemplo é o paciente portador de inversão *de novo* no braço longo do cromossomo 17, inv(17)(q21.12q34) (BCR A6). Por meio de aCGH foi identificada uma deleção no braço longo do cromossomo 2 - del(2)(q31). As manifestações clínicas da paciente sobrepõem-se às de outros portadores de deleções nesse segmento cromossômico, apontando para a haploinsuficiência do gene *MBD5*, mapeado no segmento deletado do cromossomo 2, como causa da deficiência intelectual (Talkowski et al., 2011). A inversão do cromossomo 17 parece ser uma variante benigna. Em outro caso, (BCR C1) a paciente é portadora de uma deleção de 8,7 Mb no cromossomo 8, em decorrência da segregação de um cromossomo derivativo herdado de sua genitora fenotipicamente normal, portadora de translocação t(X;19), no nível de bandamento G; na verdade, o cromossomo derivativo der(X) contém um segmento do cromossomo 8. A paciente foi incluída em nossa amostra por possuir uma inversão do cromossomo 12, também

herdada via materna. A investigação da translocação mostrou tratar-se de rearranjo complexo, com a participação dos cromossomos 8, X e 19, sendo a inversão do cromossomo 12 um rearranjo independente. Portanto, essa inversão aparenta ser uma variante sem impacto clínico.

V.3.2 Genes truncados pelos pontos de quebra

Os dados de MPS revelaram que a maioria dos rearranjos estudados (23 dentre 27) interrompiam genes. O número de genes truncados por rearranjo variou entre um e nove, totalizando 71 genes. Dos 23 rearranjos nos quais identificamos genes truncados, em oito, esses genes já foram reconhecidamente relacionados a doenças, explicando-se, assim, o fenótipo dos portadores (Figura V.1, Tabela V.1). Dentre esses oito rearranjos, quatro são translocações equilibradas e quatro são rearranjos associados também a perdas de segmentos nos cromossomos rearranjados (Figura V.1). Assim, mesmo no caso de rearranjos nos quais a análise por aCGH revela a presença de desequilíbrios patogênicos, é importante investigá-los por MPS, pois genes truncados nos pontos de quebra podem contribuir ou ser o principal responsável pelo quadro clínico. As doenças ou síndromes já relacionadas a esses genes conhecidos não haviam

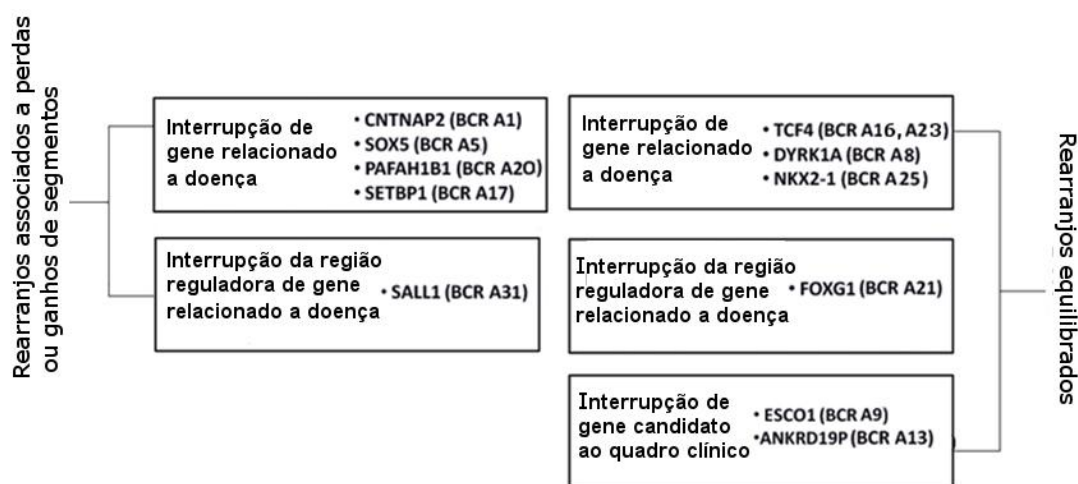


Figura V.1: Genes truncados nos pontos de quebra possivelmente associados aos quadros clínicos dos portadores dos rearranjos. Os dados de MPS revelaram que dez rearranjos equilibrados interromperam genes relacionados a doença ou suas regiões reguladoras. Em outros dois rearranjos, os pontos de quebra truncaram novos genes, que são candidatos aos quadros clínicos dos portadores.

sido suspeitadas na avaliação clínica inicial, demonstrando a importância do mapeamento de alta resolução dos pontos de quebra para identificar genes responsáveis pelos quadros clínicos.

Em dois outros rearranjos os pontos de quebra truncaram genes (*ESCO1* e *ANKRD19P*) não relacionados a doença, mas que não estão mapeados em regiões de CNV descritas no DGV (Figura V.1, Tabela V.2). A relação desses genes candidatos com os fenótipos clínicos permanece interrogada. Os outros genes truncados nos pontos de quebra se localizam em regiões de variações no número de cópias (CNV). Dois estudos anteriores, que mapearam por FISH os pontos de quebra de rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados em indivíduos fenotipicamente normais, evidenciaram que quebras gênicas são frequentes nesse grupo, ao contrário de desequilíbrios em cis aos pontos de quebras que são identificados apenas em indivíduos afetados (Baptista et al., 2008. Schluth-Bolard et al., 2009).

V.3.3 Alteração da região reguladora de genes

As quebras cromossômicas podem também truncar elementos reguladores, levando à alteração na expressão gênica (por exemplo, Fonseca et al., 2013). O estudo de rearranjos com pontos de quebra 3' ou 5' desses genes tem contribuído para elucidar a complexidade das regiões reguladoras de genes que atuam no desenvolvimento em mamíferos (Kleinjan e Lettice, 2008). No entanto, devido à complexidade de regiões reguladoras de genes, são necessários laboriosos estudos funcionais para avaliar o impacto de rearranjos na expressão gênica.

A recente descoberta da divisão do genoma em domínios (TAD) (Dixon et al., 2012) demonstra que as interações entre elementos reguladores e gene devem ocorrer preferencialmente dentro dos limites dos domínios. Essa hipótese é confirmada por translocações equilibradas associadas a quadros clínicos previamente descritas (Jamieson et al., 2002; Lettice et al., 2002; Goubau et al., 2013; Fonseca et al., 2013). As quebras dessas translocações ocorrem nos mesmos domínios topológicos dos genes cuja expressão foi alterada, mesmo quando há grandes distâncias (~1Mb) entre os genes e as quebras, como no caso dos genes *SHH* e *SOX9*. Assim barreiras-fronteiras dos domínios podem ser utilizadas para estabelecer quais genes poderiam ter tido suas regiões reguladoras afetadas pelos rearranjos. Comparamos as 156 quebras dos 27 rearranjos que investigamos por MPS com os domínios definidos por interações de cromatina baseadas em HiC, em células tronco humanas (hESC) e fibroblasto humanos

(IMR90) (Dixon et al., 2012), para identificar possíveis genes candidatos localizados no mesmo domínio, cujas regiões codificadoras não foram diretamente afetadas pelos rearranjos. Os dados das regiões de fronteiras-barreiras dos domínios e os pontos de quebra foram transformados em arquivos BED e analisados no UCSC genome Browser. Essa análise revelou três rearranjos que não afetaram a região codificadora do gene candidato, mas cujos pontos de quebra se localizaram no mesmo domínio do gene, sugerindo interrupção de região reguladora.

A translocação equilibrada $t(4;14)(q27;q13)$ (BCR A21) pode ter afetado a expressão do gene *FOXG1* (4q27). Outras translocações próximas a $t(4;14)$ foram detectadas em pacientes com uma variante congênita da Síndrome de Rett, que é causada por mutações de perda de função no *FOXG1* (Goubau et al., 2013). Elementos reguladores teriam sido truncados ou afastados do gene em decorrência dessas translocações, levando à alteração da expressão gênica e ao quadro clínico

A separação de elementos reguladores do gene *SALL1* aparece como possível mecanismo proposto para explicar o quadro clínico do portador da inserção $ins(16)(p13.1q23q12.1)$ (BCR A31). O gene está mapeado a 180 kb 5' de um dos pontos de quebra da inserção. A avaliação clínica da paciente levantou a suspeita de Síndrome de Townes-Brocks, causada pela haploinsuficiência do gene *SALL1*. A análise por aCGH identificou também oito microdeleções e duplicações nessa inserção. Deleções e duplicações de genes localizados nesses segmentos podem explicar o quadro mais grave do portador da inserção, em relação a outros afetados pela Síndrome de Townes-Brocks. Esse caso ilustra a importância da aplicação de MPS, na análise de rearranjos citogeneticamente equilibrados. Caso tivéssemos investigado esse rearranjo apenas por aCGH, os 71 genes deletados ou duplicados seriam considerados a principal causa do quadro clínico. No entanto, um ponto de quebra identificado apenas por MPS, que pode afetar a expressão do gene *SALL1*, aparece como a principal causa do quadro sindrômico.

Embora a maioria dos casos de rearranjos equilibrados associados a alteração da região reguladora de genes interromperem elementos reguladores ou os separem do alvo, deleções e duplicações distantes dos pontos de quebra também podem afetar a expressão de genes. Na translocação $t(X;17)(q21\sim22;p11.1)$ (BCR A26), uma deleção de 100 kb distante ao ponto de quebra em Xq25 pode ter afetado a expressão do gene *GRIA3*, localizado a aproximadamente 500 kb da deleção, removendo elemento regulador.

Tabela V.1: Rearranjos cromossômicos que interromperam genes já relacionados a doenças, sendo responsáveis pelo fenótipo dos portadores.

Rearranjo	BCR	Gene	Localização	Fenótipo associada à perda de função do gene
t(10;21)(q21.2;q22.2)	A8	<i>DYRKYA</i> (<i>Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A</i>)	21q22.13	Deficiência intelectual associada a microcefalia e epilepsia
t(2;18)(q33;q21.3); t(11;18)(q13.1;q21.31)	A16; A23	<i>TCF4</i> (<i>Transcription factor 4</i>)	18q21.3	Síndrome de Pitt-Hopkins
t(14;15)(q13;q22.1)	A25	<i>NKX2-1</i> (<i>NK2 homeobox 1</i>)	14q13	Paralisia cerebral tetraplégica e microcefalia
ins(2)(p13;q11.2q21)ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)	A5	<i>SOX5</i> (<i>SRY sex determining region Y-box 5</i>)	12p12.1	Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor
t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)	A1	<i>CNTNAP2</i> (<i>contactin associated protein-like 2</i>)	7q35	Alterações de fala
t(5;18)(q33.3;q21.1)	A17	<i>SETBP1</i> (<i>SET binding protein 1</i>)	18q21.1	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
t(1;17;3;1;12;16)t(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1)	A20	<i>PAFAH1B1</i> (<i>Platelet-activating factor acetylhydrolase 1b,regulatory subunit 1 (45kDa)</i>)	17p13.3	Lisencefalia

Tabela V.2: Translocações que interroperam genes candidatos a serem responsáveis pelo fenótipo dos portadores.

Rearranjo	BCR	Gene	Localização	Fenótipo dos portadores
t(4;18)(p15.2;q11.2)	A9	<i>ESCO1</i> (Establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1)	18q11.2	Surdez não sindrômica
t(9;20)(q22.3;p13)	A11	<i>ANKRD19P</i> (Ankyrin repeat domain-containing protein)	9q22.31	Deficiência intelectual

Apesar de fronteiras dos domínios topológicos serem consideradas como barreiras para interações entre genes e elementos reguladores, em uma translocação t(2;16)(q36.1;q24.1) (BCR A7) os genes *IHH/PAX3/WTN6*, candidatos para os defeitos de membros da portadora, estão localizados em domínios diferentes, porém vizinhos. Recentemente foi demonstrado que rearranjos que alteram as barreiras do TAD no qual a quebra da t(2;16) no cromossomo 2 ocorreu causam malformações de membros (Lupiáñez et al., 2015).

A relação dos genes alterados com o fenótipo dos portadores dos rearranjos está discutida nos Capítulos VI , VII e VIII.

V.4 Conclusões

Considerando os dados de aCGH e MPS, identificamos desequilíbrios submicroscópicos e interrupção de genes sensíveis a dosagem ou de regiões reguladoras em 17 dos 45 pacientes investigados. Em outros dois pacientes, deleções não associadas aos rearranjos foram identificadas como a causa do quadro clínico: BCR A6: inv(17)(p11.2q21.3); BCR C1: inv(12)(p11.2q24.1)mat. Em dois rearranjos, genes candidatos a causarem o quadro clínico foram identificados, mas sua relação com o fenótipo não está clara: BCR A9: t(4;18)(p15.2;q11.2) e BCR A11:t(9;20)(q22.3;p13). Uma translocação também pode ter afetado a expressão de genes vizinhos, embora estes não estejam localizados no mesmo domínio topológico das quebras: BCR A7 t(2;16)(q36.1;q24.1).

O conjunto de dados mostra a eficiência de aliar-se a análise de variações de número de cópia (aCGH) e o sequenciamento por MPS para identificar genes responsáveis pelo fenótipo clínico de portadores de rearranjos equilibrados. É importante ressaltar que, em cinco rearranjos com perdas/ganhos de segmentos provavelmente patogênicos, verificamos também a interrupção de genes sensíveis a dosagem ou de suas regiões reguladoras. Esses resultados mostram que, enquanto o fenótipo de portadores de translocações ou inversões resulta, em geral, da alteração de um único gene sensível a dosagem ou de sua região reguladora, em rearranjos complexos associados a desequilíbrios e múltiplas quebras, vários genes contribuem para o fenótipo do paciente.

Considerando os 27 rearranjos cuja análise de aCGH e MPS concluímos, em nove deles, a relação causal entre o rearranjo e o fenótipo alterado permanece incerta. Nesses casos, não há genes nos pontos de quebra ou próximos a eles que possam ter sido alterados ou os genes interrompidos nos pontos de quebra não são sensíveis à dosagem ou estão mapeados em regiões de variações de número de cópias no DGV. A análise por aCGH desse nove casos também não havia identificado microdeleções ou duplicações que não estivessem mapeadas em região de CNVs no DGV. A relação causal entre esses rearranjos e o fenótipo dos portadores permanece incerta.

Entre os 18 rearranjos que foram investigados apenas aCGH, em 14 deles, a relação causal entre o rearranjo e o fenótipo alterado também permanece incerta. A análise por aCGH desses 14 casos também não havia identificado alterações que não estivessem mapeadas em região de CNVs no DGV. Como não investigamos os pontos de quebra desses rearranjos, não foi possível verificar se houve interrupção gênica.

**VI. GENES CANDIDATOS PARA QUADROS
CLÍNICOS ASSOCIADOS A REARRANJOS
CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE
EQUILIBRADOS ESPORÁDICOS OU
HERDADOS DE GENITOR AFETADO**

VI. GENES CANDIDATOS PARA QUADROS CLÍNICOS ASSOCIADOS A REARRANJOS CROMOSSÔMICOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS ESPORÁDICOS OU HERDADOS DE GENITOR AFETADO

VI.1 Introdução

Os rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados ocorrem em um a cada 500 nascimentos (Jacobs e Hassold, 1986). Cerca de 7% dos rearranjos equilibrados estão associados a alterações fenotípicas (Warburton, 1991). O estudo desses rearranjos esporádicos tem sido importante na identificação de genes causadores de doenças mendelianas. A interrupção de genes sensíveis a dosagem ou de sua região reguladora e microdeleções ou microduplicações nos cromossomos rearranjados são as principais causas dos quadros clínicos. Recentemente a aplicação de NGS ao estudo dos rearranjos equilibrados aumentou o poder de resolução da análise para o nível de pares de bases, permitindo, assim, maior precisão na identificação de genes ou regiões reguladoras afetadas pelos rearranjos. O estudo desses rearranjos por MPS tem também desvendado a sua complexidade, revelando um grande número de genes afetados por esses rearranjos. Apesar dos avanços na caracterização dos rearranjos citogeneticamente equilibrados, a relação causal dos rearranjos com o fenótipo ainda pode ser um desafio, principalmente no caso de rearranjos que truncam genes que não foram previamente relacionados a doença. A alta frequência de interrupção gênica em rearranjos presentes em indivíduos fenotipicamente normais alerta para genes cuja haploinsuficiência não tem efeito sobre o desenvolvimento (Baptista et al., 2008; Fantes et al., 2008) e ressalta a importância de bancos de dados sobre indivíduos normais da população (Tommerup et al., 2015). Na busca de genes relacionados a doença, investigamos rearranjos citogeneticamente equilibrados associados a quadros clínicos, esporádicos ou herdados de genitores também afetados.

VI.2 Pacientes e Métodos

Neste capítulo, apresentamos a investigação (a) de 31 rearranjos citogeneticamente equilibrados, de ocorrência esporádica, detectados em indivíduos com quadros clínicos diversos (BCR A1-A31; Capítulo III – Tabela III-1) e (b) de dois rearranjos equilibrados herdados de genitores com quadros clínicos semelhantes aos dos propósitos (BCRs B2-B3; Capítulo III – Tabela III-1). A metodologia utilizada está descrita no Capítulo III. Pacientes e Métodos.

VI.3 Resultados e discussão

Dos 33 rearranjos investigados, a análise por aCGH revelou que 11, todos esporádicos, incluem desequilíbrios submicroscópicos nos cromossomos rearranjados; 10 desses 11 rearranjos estão associados a perda de segmentos cromossômicos e um resultou em perdas e ganhos (Tabela IV.1).

Em 21 rearranjos, os fragmentos de junção foram identificados por MPS (BCRs A1, A3, A4,A5, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A15, A16, A17, A20, A21, A22, A23, A25, A29, A31, B2). Dez desses rearranjos também tiveram as quebras anteriormente mapeadas por FISH (BCRs A1, A3, A4, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A16.). Os pontos de quebra de dois rearranjos foram investigados apenas por FISH (BCRs A2 e A6). Em três rearranjos (BCR A12: t(X;13); BCR A15: t(4;10) e BCR B2: inv(2)mat) não há genes mapeados nos pontos de quebra definidos por MPS e a análise por aCGH também não revelou alterações. Assim não há dados que indiquem que esses rearranjos estejam contribuindo para o fenótipo dos portadores.

Dez outros rearranjos não tiveram seus pontos de quebra caracterizados por FISH ou MPS, mas apenas por aCGH (BCR A13, A14, A18, A19, A24, A26, A27, A28, A30, B3; Tabela III.1); em quatro desses 10 rearranjos, não foi possível caracterizar os pontos de quebra por MPS, provavelmente devido à presença de sequências altamente repetitivas ou de sequências repetidas no genoma (BCR A14, A26, A27, A28, B3). Em oito desses 10 rearranjos, a aplicação de aCGH não revelou deleções ou duplicações nos cromossomos rearranjados ou em outros cromossomos (BCR A13, A14, A18, A19, A24, A27, A28, B3;Tabela VI.S1). Apesar de deleções e duplicações não serem a causa do fenótipo nesses casos, os quadros clínicos podem ter sido devido a interrupção de genes sensíveis a dosagem ou de sua região reguladora. Dois rearranjos eram translocações X;autossomo detectadas em mulheres afetadas (BCRs A18 e A27). Nessas pacientes, determinamos o padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico, com base na metilação do gene *AR*. A análise revelou desvio de inativação total na portadoras da t(X;5)(p21.1;p13.2) (Figura VI.S1), e desvio preferencial na portadora da translocação t(X;17)(q11.2;q11.2) com o mesmo cromossomo inativo em 77% das células (Figura VI.S2). Apesar de não avaliarmos qual dos cromossomos X está inativado, admitimos que o cromossomo X normal está inativo e o der(X) ativo. Esse padrão de inativação torna as células funcionalmente equilibradas quanto aos segmentos translocados e é o que se observa na maioria das portadoras de translocações equilibradas entre o cromossomo X e um

autossomo (Schmidt e Du Sart, 1992). Por outro lado o fenótipo das duas pacientes pode estar associados a doenças recessivas do cromossomo X, em decorrência da interrupção de gene nos pontos de quebra ou devido a mutação presente no cromossomo X que sofreu a translocação. Em ambos os casos o alelo normal no cromossomo X não translocado estaria sempre silenciado.

Os resultados da investigação por aCGH, FISH e MPS de 21 rearranjos e os genes candidatos aos quadros clínicos serão discutidos abaixo em detalhes; também foram incluídos nas Tabela IV.1 a IV.3 do Capítulo do IV.

VI.3.1 Rearranjos em que não foram detectadas alterações submicroscópicas na análise por aCGH

- **Translocações t(2;18)(q33;q21.3) (BCR A16) e t(11;18)(q13.1;q21.31) (BCR A23)**

Translocação t(2;18) (BCR A16)

Paciente

O paciente foi encaminhado para avaliação genética aos 15 meses de idade por apresentar atraso de desenvolvimento neuropsicomotor. Ficava sentado sem apoio desde os nove meses de idade, mas não assumia a posição sozinho. Tinha histórico de bronquites recorrentes e apresentava estrabismo. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 2 e 18. A análise cromossômica dos genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da t(2;18) por FISH, MPS e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, realizamos a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabelas VI.1 e VI.2). No cromossomo 2, o ponto de quebra foi delimitado em um segmento de 32,4 Mb em 2q32.3-2q33.1 (Tabela VI.3). No cromossomo 18 o ponto de quebra foi delimitado num segmento de 4,2 Mb em 18q21.2q21.32 (Tabela VI.3; Figura VI.1). Os pontos de quebra foram refinados por MPS em segmentos de 534 e 300 pares de bases, respectivamente, em 2q33.1 e 18q21.2 (Tabelas VI.4 e VI.5). Os segmentos de junção das quebras da translocação foram submetidos a sequenciamento de Sanger, que revelou pequenas deleções nos cromossomos 2 e 18 (Tabela VI.5).

Tabela VI.1: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra do cromossomo 2.

Clones	Posição (hg 19; Build 37)	Sinais de hibridação
RP11-218M2	chr2:165207449-165273419	der(2)
RP11-115H23	chr2:197680881-197725386	der(18)
RP11-325M10	chr2:206,346,113-206,534,174	der(18)

Tabela VI.2: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra do cromossomo 18.

Clones	Posição (hg 19; Build 37)	Sinais de hibridação
RP11-729G3	chr18:48478296-48634480	der(18)
RP11-2503	chr18:49686873-49865504	der(18)
RP11-99A1	chr18:52387206-52551089	der(18)
RP11-383D22	chr18:56838036-57049501	der(2)
RP11-35G9	chr18:57579067-57743469	der(2)
RP11-13L22	chr18:60,257,985-60,427,541	der(2)

Tabela VI.3: Pontos de quebra da translocação t(2;18) (BCR A16) mapeados por FISH

Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho	Genes nos pontos de quebra
chr2:165,273,419-197,680,881	32.4 Mb	138 genes
chr18:52551089-56838036	4.2 Mb	16 genes

Tabela VI.4: Segmentos dos pontos de quebra da t(2;18) (BCR A16) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
2	2q33.1	chr2:197989212-197989746	534	chr2:197989283	<i>ANKRD44</i>
18	18q21.2	chr18:52895297-52895597	300	chr18:52895525-52895527	<i>TCF4</i>

Tabela VI.5: Segmentos de junção das quebras da t(2;18) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
2/18	2	+	18	-	chr2:del (T)
18/2	18	+	2	-	Chr8: del(AGG)

Genes afetados pela translocação cromossômica

O gene *ANKRD44* (*ankyrin repeat domain 44*) e o gene *TCF4* (*transcription factor 4*) foram interrompidos, respectivamente, nos pontos de quebra dos cromossomos 2 e 18 (Tabela VI.4; Figura VI.1).

Translocação t(11;18) (BCR A23)

Paciente

O paciente foi encaminhada para avaliação genética aos 2 anos e 6 meses por apresentar atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e deficiência intelectual grave. Não falava e se comunicava predominantemente por gritos. Também não andava e se locomovia arrastando-se. Sentou-se sem apoio aos 2 anos e 2 meses. Tem histórico de infecções de vias aéreas superiores e constipação intestinal. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 11 e 18. A análise cromossômica dos genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da t(11;18) por MPS e aCGH

Os pontos de quebra foram mapeados por MPS. O ponto de quebra no cromossomo 11 foi delimitado num segmento de 137 pb localizado em 11q13.1 (Tabelas VI.6 e VI.7). O ponto de quebra no cromossomo 18 foi delimitado num segmento de 186 pb localizado em 18q21.2 (Tabela VI.6 e VI.7; Figura VI.2). Os segmentos de junção das quebras foram submetidos a sequenciamento Sanger, que revelou substituição de um nucleotídeo no cromossomo 18 (Tabela VI.7).

Tabela VI.6: Segmentos dos pontos de quebra da t(11;18) (BCR A23) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
11	11q13.1	chr11:65166957-65167094	137	chr11:65167008	<i>FRMD8</i>
18	18q21.2	chr18:52940433-52940619	186	chr18:52940666	<i>TCF4</i>

Tabela VI.7: Segmentos de junção das quebras da t(11;18) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
11/18	11	+	18	-	
18/11	18	+	11	-	A>T

Genes afetados pela translocação cromossômica

O gene *FRMD8* (*FERM domain containing 8*) e o gene *TCF4* (*transcription factor 4*) foram interrompidos, respectivamente, nos pontos de quebra dos cromossomos 11 e 18 (Tabela VI.6; Figura VI.2).

As translocações t(2;18) e t(11;18) e o quadro clínico dos portadores

O gene *TCF4* (*Transcription factor 4*) no cromossomo 18 foi interrompido em duas translocações, t(2;18) e t(11;18). As quebras ocorreram no exon 20 e no intron 6 do gene, respectivamente, nas translocações t(2;18) e t(11;18). O gene *TCF4* possui 21 exons, sendo os exons 1 e 21 não são codificadores. Várias isoformas do gene já foram identificadas, estando os exons 10 a 21 presentes em todas. Esse gene codifica um fator de transcrição de *helix-loop-helix* (*transcription factor 4*). O gene é ubiquamente expresso (de Pontual et al., 2009), e pode ter papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso. A haploinsuficiência do gene *TCF4* causa a síndrome de Pitt–Hopkins (MIM 602272), caracterizada por atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual grave, sinais faciais típicos (nariz com base nasal alta, curva acentuada no lábio superior ou “arco de Cupido” e boca grande com lábios grossos), constipação intestinal e hiperventilação intermitente seguida por apnea (Zweier et al., 2007; Sweatt et al., 2013). Não havia suspeita da doença na avaliação clínica inicial de ambos os pacientes, ilustrando a importância do mapeamento dos pontos de quebra para identificar a relação causal entre o rearranjo e o fenótipo do paciente. O paciente portador da t(2;18) apresenta quadro clínico mais brando, o que poderia estar relacionado à formação de um transcrito híbrido *ANKRD44-TCF4*. A manutenção de parte da função da proteína TCF4 em um transcrito híbrido foi responsável pelo quadro mais brando da síndrome em um paciente portador de uma translocação (Kalscheuer et al., 2008). Entretanto, para que ocorra a formação de transcrito híbrido, ambos os genes precisam estar orientados na mesma direção e o quadro de leitura deve ser preservado. O mapeamento dos pontos de quebra da translocação t(2;18) revelou que a quebra no gene *ANKRD44* ocorreu em região intrônica. A quebra no gene *TCF4* ocorreu no exon 20 interrompendo, portanto, o quadro de leitura do gene, e sendo improvável a formação de gene híbrido nesse caso. Alternativamente, o gene truncado *TCF4* contendo 19 dos 21 exons pode codificar uma proteína funcional capaz de manter a função parcial da proteína TCF4 selvagem, explicando o quadro clínico mais brando do portador da t(2;18).

Os genes *FRMD8* e *ANKRD44* também foram interrompidos pelos pontos de quebra. Não há relatos de associação desses genes com doença ou que sejam genes sensíveis a dosagem. Assim, a contribuição dos genes *FRMD8* e *ANKRD44* para o fenótipo dos portadores das t(11;18) e t(2;18) permanece incerta.

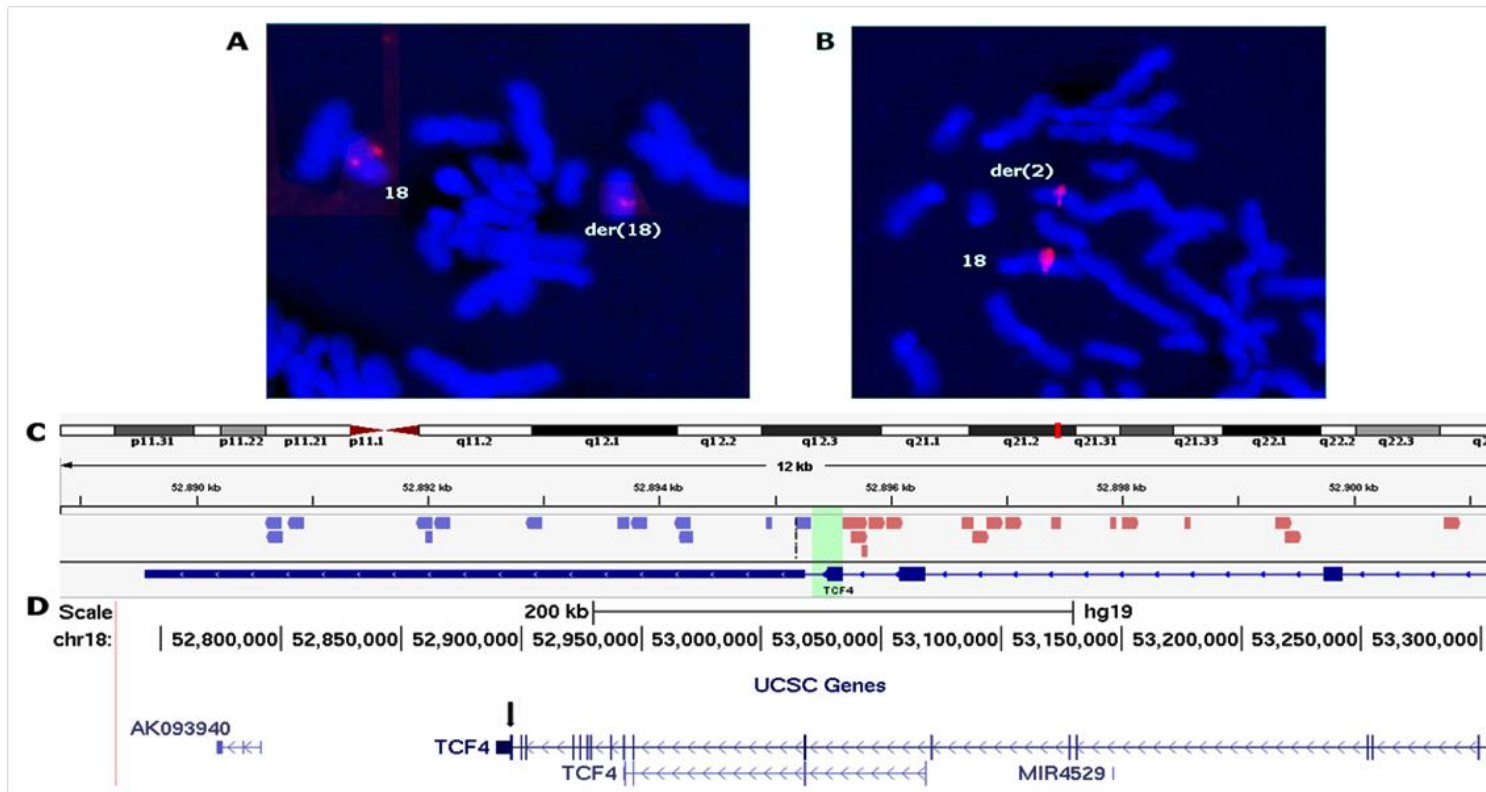


FIGURA VI.1: t(2;18)(q33;q21.3) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 18 por FISH e MPS. **A e B.** A hibridação *in situ* fluorescente dos clones do cromossomo 18 (**A**) RP11-99A1 e (**B**) RP11-383D22 revelou sinais de hibridação (em vermelho) nos cromossomos der(18) e der(2), respectivamente. O ponto de quebra ocorreu, portanto, no segmento de 4,2 Mb delimitado pelos dois clones. **C.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes em 18q21.2, cujo par se localiza no cromossomo 2 em 2q33.1, confirmando a translocação t(2;18). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativa e positiva do DNA. O segmento de 300 pares de bases que contém o ponto de quebra (em verde) foi delimitado pelas *reads* discordantes da t(2;18) mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *TCF4* foi interrompido no ponto de quebra. **D.** O mapa do segmento 18q21.2 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu o gene *TCF4*, localizando-se no exon 20 (UCSC genes). (Adaptado de UCSC, hg 19).

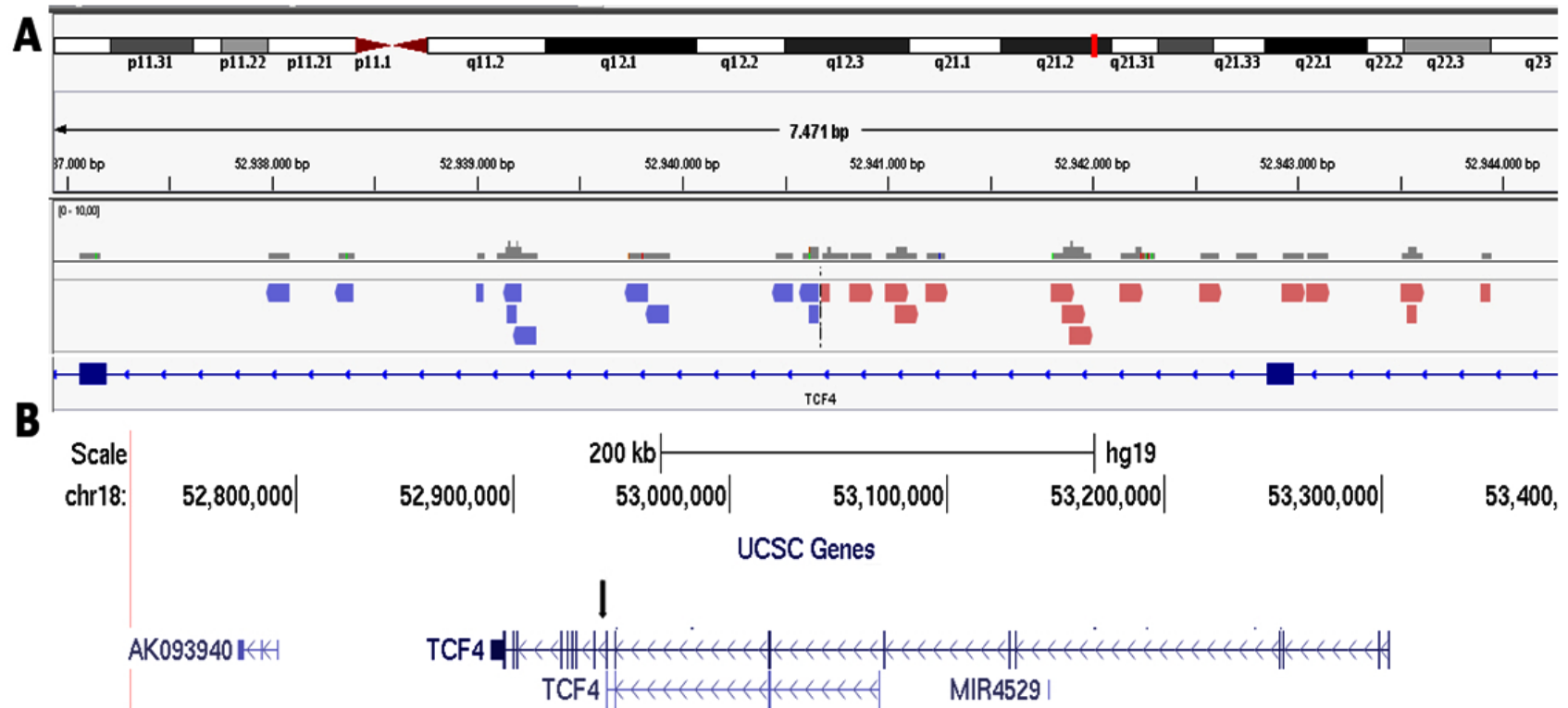


FIGURA VI.2: t(11;18)(q13.1;q21.31) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 18 por MPS. **A.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes mapeadas na região 18q21.2, cujo par se localiza no cromossomo 11, em 11q13.1, confirmando a translocação t(11;18). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 186 pares de bases que contém o ponto de quebra foi delimitado pelas *reads* discordantes da t(11;18) mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *TCF4* foi interrompido no ponto de quebra. **D.** O mapa do segmento 18q21.2 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu o gene *TCF4*, localizando-se no intron 6. (UCSC genes) (Adaptado de UCSC, hg 19).

- **Translocação t(14;15)(q13;q22.1) (BCR A25)**

Paciente

A paciente foi encaminhada aos 2 anos e 6 meses de idade para avaliação genética, por apresentar paraplegia cerebral tipo disnética e fala disártrica. Apresentou atraso no desenvolvimento: sentou-se sem apoio com 1 ano de idade, engatinhou com 1 ano e 6 meses e adquiriu marcha independente com 1 ano e 11 meses de idade. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 14 e 15. O exame cromossômico de seus genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da t(14;15) por MPS e aCGH

Os pontos de quebra foram mapeados por MPS (Tabelas VI.8 e VI.9; Figura VI.3). O ponto de quebra no cromossomo 14 foi delimitado num segmento de 552 pb localizado em 14q13.3. O ponto de quebra no cromossomo 15 foi delimitado num segmento de 133 pb localizado em 15q21.3. Os fragmentos de junção foram sequenciados pelo método de Sanger, revelando a presença de pequenas deleções nos cromossomos 14 e 15 (Tabela VI.9).

Genes afetados pela translocação cromossômica

O gene *NKX2-1* (*NK2 homeobox 1*) e o gene *LIPC* (*hepatic triacylglycerol lipase precursor*) foram interrompidos, respectivamente, nos pontos de quebra dos cromossomos 14 e 15 (Tabela VI.8 e Figura VI.3).

A translocação t(14;15) e o quadro clínico do portador

A translocação t(14;15) interrompeu o gene *NKX2-1* mapeado em 14q13.3. O *NKX2-1* codifica uma fator de transcrição (*transcription factor-1*) fundamental no desenvolvimento do pulmão, da tireoide e do cérebro. A haploinsuficiência do gene *NKX2-1* causa uma forma benigna de coréia hereditária (BHC, MIM 118700), um distúrbio de movimento com herança autossômica dominante. A BHC é caracterizada por coréia não progressiva ou de progressão lenta, sem perda cognitiva (Breedveld et al., 2002). O distúrbio de movimento pode ser acompanhado por hipotireoidismo congênito, síndrome de estresse e infecção de pulmão recorrente, refletindo a importância do gene no desenvolvimento da tireoide e do pulmão (Thorwarth et al.,

2014). A portadora da t(14;15) recebeu diagnóstico de paraplegia cerebral tipo disnética. Essa forma de paraplegia é caracterizada por movimento involuntário, atetose ou distonia e tônus muscular variado (Rosenbaum et al., 2007). No entanto, o diagnóstico de BHC pode ser confundido com o de paraplegia cerebral disnética ou atáxica, principalmente no início da infância, idade na qual os movimentos coreiformes característicos ainda não são aparentes (McMichael et al., 2013). Um exemplo da dificuldade de diagnóstico diferencial entre as duas doenças é o de uma família, na qual os afetados foram inicialmente diagnosticados com paralisia cerebral discinética atáxica, e posteriormente, após reavaliação confirmou-se o diagnóstico de BHC; nessa família o quadro clínico segregava com uma mutação em heterozigose no gene *NKX2-1* (McMichael et al., 2013). No mesmo estudo os autores sequenciaram 60 pacientes que apresentavam paraplegia cerebral e não identificaram mutações no gene, indicando que não há correlação entre paraplegia cerebral e o gene *NKX2-1* (McMichael et al., 2013). A investigação da translocação t(14;15) foi essencial não somente para identificar a interrupção do gene *NKX2-1* como causa do quadro clínico, mas também para estabelecer um novo diagnóstico clínico para a criança portadora da translocação. Não há relatos de associação do gene *LIPC*, truncado no ponto de quebra do cromossomo 15, com doença ou de que o gene seja sensível a dosagem. Assim, a contribuição dos genes *LIPC* para o fenótipo do paciente portadora da t(14;15) permanece incerta.

Tabela VI.8: Segmentos dos pontos de quebra da t(14;15) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
14	14q13.3	chr14:36986702:36987254	552	chr14:36987151-36987153	<i>NKX2-1</i>
15	15q21.3	chr15:58813615-58813748	133	chr15:58813620-58813620	<i>LIPC</i>

Tabela VI.9: Segmentos de junção das quebras da t(14;15) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
14/15	14	-	15	-	chr14: del(TCA)
15/14	15	+	14	+	

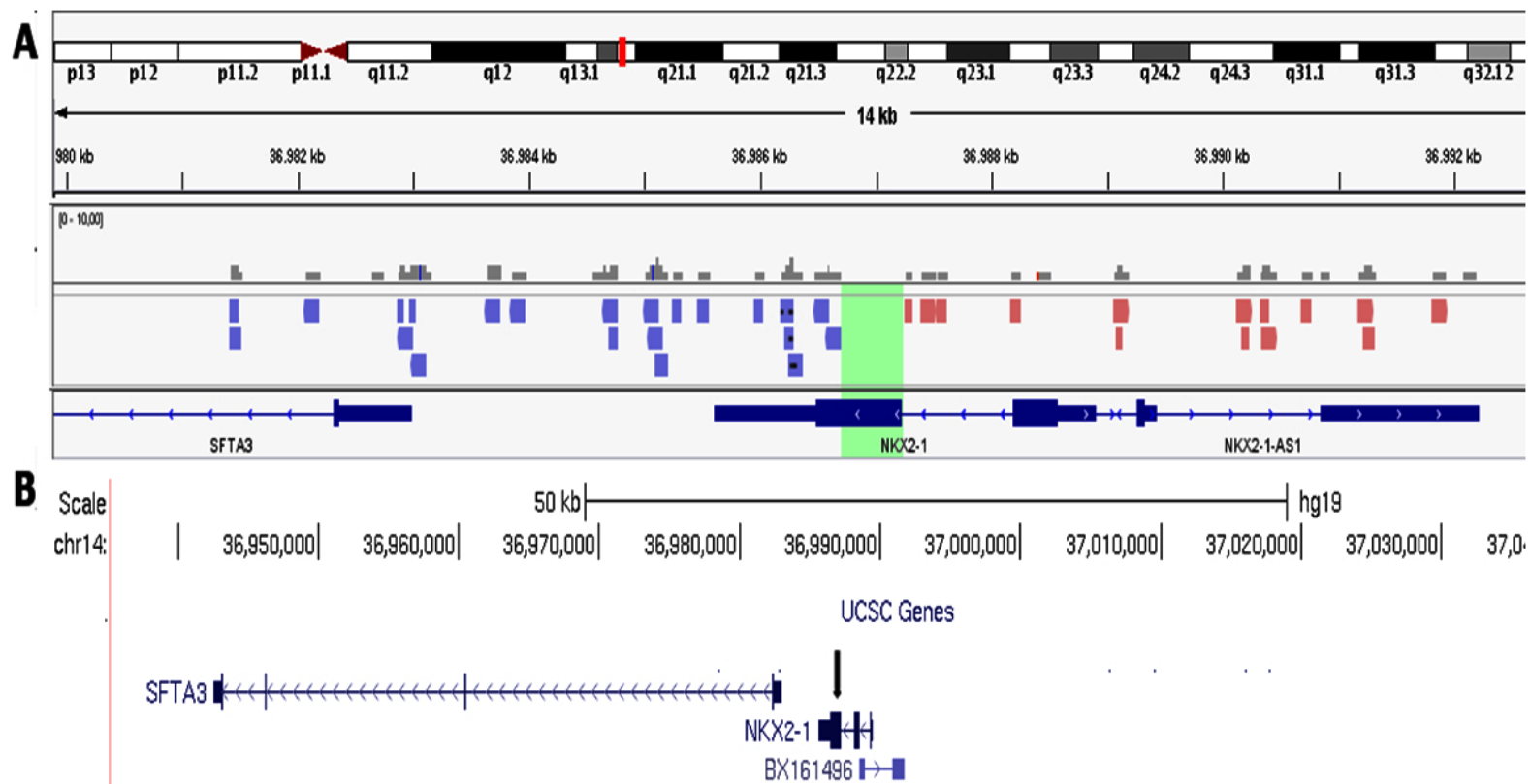


FIGURA VI.3: t(14;15)(q13;q22.1) (BCR A25) - Mapeamento do pontos de quebra no cromossomo 14 por MPS. **A.** Após alinhamento dos dados de MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as reads mapeadas em 14q13.3, cujo par se localiza no cromossomo 15 em 15q21.3, confirmando a presença da translocação t(14;15). As reads em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 552 pares de bases (em verde), que contém o ponto de quebra, foi delimitado pelas reads discordantes da t(14;15) mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *NKX2-1* foi interrompido no ponto de quebra. **B.** O mapa do segmento 14q13.3 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu o *NKX2-1*, no exon 2. (UCSC genes) (Adaptado de UCSC, hg 19).

- **Translocação t(10;21)(q21.2;q22.2) (BCR A8)**

Paciente

A paciente foi encaminhada aos 16 anos de idade para avaliação genética, por apresentar deficiência intelectual profunda associada a microcefalia primária, retardo de crescimento intrauterino, dificuldade de alimentação neonatal, micrognatia e convulsões febris. A fala tinha articulação comprometida. Ambos os pés apresentavam polidactilia (pré-axial). A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 10 e 21. A análise cromossômica da genitora da paciente revelou cariótipo normal. O pai da paciente havia falecido.

Investigação da t(10;21) por FISH, MPS e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, realizamos hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nos segmentos dos pontos de quebra, determinados na análise após bandamento G (Tabelas VI.10 e VI.11). A análise por FISH revelou que, além da translocação, ocorrera também uma inversão pericêntrica no cromossomo 10 e uma inserção de um fragmento do cromossomo 21 no braço curto do cromossomo der(10) (Tabela VI.12; Figuras VI.4 e VI.5). Para compreender a complexidade do rearranjo, a localização dos pontos de quebra foi delimitada por MPS. A análise confirmou os resultados obtidos por FISH e refinou a localização dos quatro pontos de quebra, dois no cromossomo 10 (10p14 e 10q21.1) e dois no cromossomo 21 (21q22.13), em segmentos de 150 pb a 1514 pb, respectivamente (Tabelas VI.13 e VI.14; Figura VI.6). Um ponto de quebra adicional em 10q21.1 associado a uma inserção críptica nesse segmento também foi identificado por MPS. Dois fragmentos de junção desse rearranjo foram submetidos a sequenciamento de Sanger revelando a presença de pequenas duplicações (Tabela VI.14). A figura VI.7 ilustra a estrutura dos cromossomos derivativos, após a análise por MPS e FISH.

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

O gene *PRKG1* (*Protein Kinase, CGMP-Dependent, Type I*) mapeado em 10q21.1 e os genes *HLCS* (*holocarboxylase synthetase*) e *DYRK1A* (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A), localizados em 21q22.13, foram interrompidos por quebras do rearranjo complexo (Tabela VI.14 e Figura VI.6).

Tabela VI.10: Clones utilizados no mapeamento por FISH dos pontos de quebra do cromossomo 10.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-154P11	chr10:4,332,078-4,507,156	der(10) braço curto
RP11-298K24	chr10:6,238,668-6,435,633	der(10) braço curto
RP11-189M8	chr10:9,995,827-10,161,417	der(10) braço curto
RP11-566K1	chr10:10,791,781-10,979,028	der(10) braço curto
RP1-251M9	chr10:10,915,523-11,053,430	der(10) braço curto
RP11-401F24	chr10:11,766,246-11,970,786	der(10) braço longo+
RP11-730A19	chr10:13,019,504-13,213,671	der(10) braço longo+
RP11-2K17	chr10:14,912,604-15,100,762	der(10) braço longo+
RP11-472N13	chr10:31,810,332-32,000,141	der(10) braço longo+
RP11-479G22	chr10:33,135,820-33,331,761	der(10) braço longo+
RP11-505N10	chr10:33,682,592-33,871,457	der(10) braço longo+
RP11-22G4	chr10:34,432,744-34,597,990	der(10) braço longo+
RP13-404M3	chr10:34,504,818-34,709,565	der(10) braço longo+
RP11-124O11	chr10:34,504,818-34,709,565	der(10) braço curto*
RP11-38B21	chr10:44,545,781-44,703,284	der(10) braço curto*
RP11-432I13	chr10:45,836,428-45,837,145	der(10) braço curto*
RP11-292F22	chr10:47,530,175-47,688,660	der(10) braço curto*
RP11-463P17	chr10:48,277,408-48,481,919	der(10) braço curto*
RP11-13E1	chr10:49,298,292-49,450,499	der(10) braço curto*
RP11-47O13	chr10:53,229,348-53,398,422	der(10) braço curto*
RP11-42E22	chr10:53,454,988-53,601,387	der(21)
RP11-67O23	chr10:53,680,634-53,835,573	der(21)
RP11-556E13	chr10:54,243,337-54,430,546	der(21)
RP11-548F5	chr10:55,100,826-55,267,906	der(21)
RP11-313B15	chr10:55,925,990-56,129,242	der(21)
RP11-430K23	chr10:57,039,817-57,212,184	der(21)
RP11-183D3	chr10:57,884,198-58,038,600	der(21)
RP11-371O16	chr10:59,335,945-59,336,678	der(21)
RP11-79I23	chr10:60,425,343-60,600,666	der(21)
RP11-357A18	chr10:61,143,485-61,306,617	der(21)
RP11-166B18	chr10:62,232,191-62,399,016	der(21)
RP11-13A2	chr10:64,111,493-64,284,329	der(21)
RP11-176H12	chr10:66,039,948-66,231,753	der(21)

+ clones do braço curto do cromossomo 10 com sinal de hibridação no braço longo do cromossomo der(10)

*clones do braço longo do cromossomo 10 com sinal de hibridação no braço curto do cromossomo der(10)

Tabela VI.11: Clones utilizados no mapeamento por FISH dos pontos de quebra do cromossomo 21.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP1-245P17	chr21:35,563,090-35,680,068	der(21)
RP11-102E10	chr21:37,843,758-38,014,818	der(21)
RP11-101D8	chr21:38,618,318-38,803,589	der(10) braço curto
RP11-777J19	chr21:38,719,389-38,887,895	der(10) braços curto e longo
RP11-98O13	chr21:38,994,036-39,157,079	der(10) braço longo
RP11-164E1	chr21:39,679,150-39,818,509	der(10) braço longo
RP1-128M19	chr21:40,646,493-40,780,000	der(10) braço longo
RP1-171F15	chr21:41,708,551-41,709,112	der(10) braço longo
RP1-265B9	chr21:42,638,513-42,794,051	der(10) braço longo

Tabela VI.12: Pontos de quebra da translocação t(10;21) (BCR A8) mapeados por FISH.

Localização dos pontos de quebra	Tamanho kb	Genes nos pontos de quebra
chr10:11053430-11766246	712	<i>CELF2, USP6NL</i>
chr10:53398422-53454988	56	<i>PRKG1</i>
chr21:38014818-38618318	603	<i>SIM2, HLCS, DSCR6, PIGP, DSCR9,</i>
chr21:38803589-38887895	84	<i>DYRK1A</i>

Tabela VI.13: Segmentos dos pontos de quebra da t(10;21) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
10(1)	10p14	chr10: 11766338-11766488	150	chr10:11766440-11766442	
10(2)	10q21.1	chr10: 53430651-53431305	654	*	<i>PRKG1</i>
10(3)	10q21.1	chr10: 53432988-53433202	214	*	<i>PRKG1</i>
21(1)	21q22.13	chr10: 38338397-38339911	1514	*	<i>HLCS</i>
21(2)	21q22.13	chr10: 38809249-38809741	492	chr10:38809417-38809418	<i>DYRK1A</i>

*Segmentos de junção das quebras não foram sequenciados pelo método de Sanger

Tabela VI.14: Segmentos de junção das quebras da t(10;21) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 1	Fita	Modificação no segmento de junção
10(1)/21(2)	10(1)	-	21(2)	-	Dup AAT
21(1)/10(2)	21(1)	+	10(2)	+	*
10(3)/10(2)	10(3)	-	10(2)	-	*
10(1)/21(2)	10(1)	+	21(2)	+	Dup TA
21(1)/10(3)	21(1)	-	10(3)	+	*

**segmentos de junção não foram sequenciados pelo método de Sanger

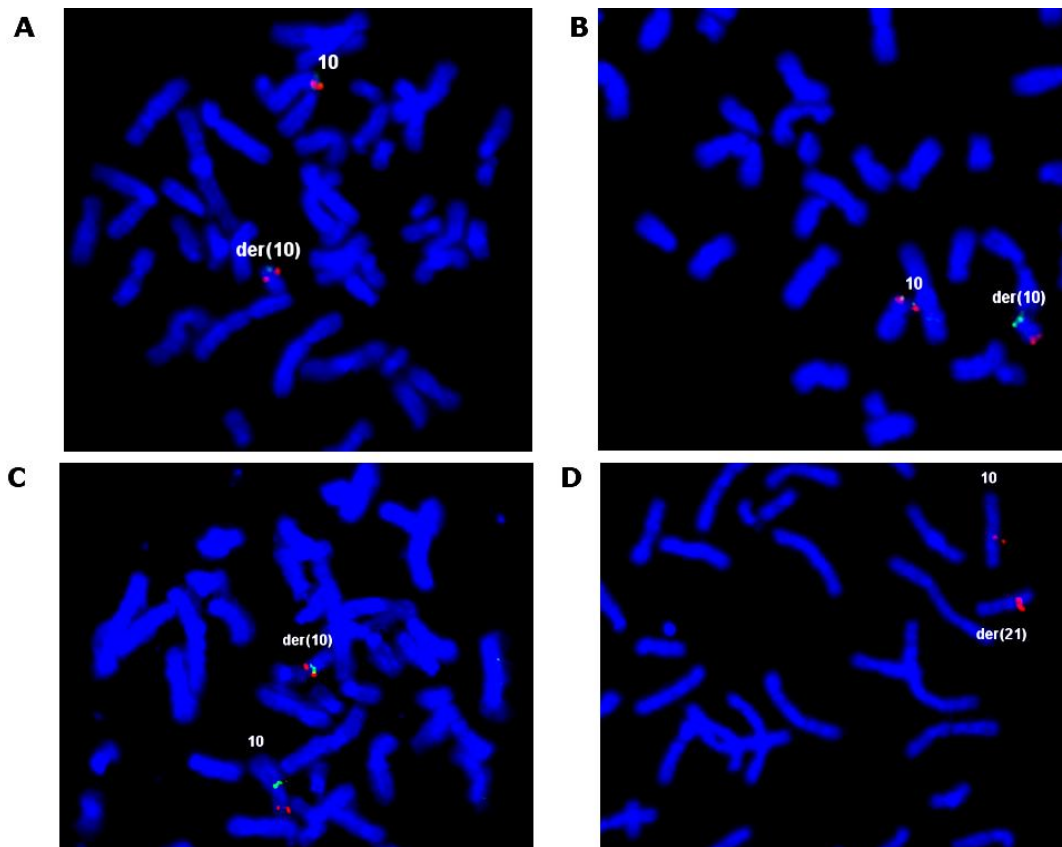


FIGURA VI.4: t(10;21)(q21.2;q22.2)- Mapeamento dos pontos de quebra do cromossomo 10 por FISH. A e B: A hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-251M9 (A) e RP11-401F24 (B), mapeados em 10p14, revelou sinais de hibridação (vermelhos), nos braços curto e longo do cromossomo der(10), respectivamente. Uma sonda subteloamérica do braço curto do cromossomo 10 foi usada como controle (B;sinal verde). Esses resultados indicaram a maior complexidade do rearranjo, tendo ocorrido também inversão pericêntrica no cromossomo 10. O ponto de quebra do braço curto do cromossomo 10 ocorreu, portanto, no segmento de 712 Kb delimitado pelos dois clones. **C e D.** A hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-47O13 (C; sinal verde) e RP11-42E22 (D; sinal vermelho), mapeados em 10q21.1 revelou sinais de hibridação, no braço curto do cromossomo der(10) e no cromossomo der(21), respectivamente. Esses resultados indicam que o segmento distal à quebra do braço longo do cromossomo 10 foi translocado para o cromossomo 21. O ponto de quebra do braço longo do cromossomo 10 ocorreu, portanto, no segmento de 55 kb delimitado pelos dois clones em 10q21.1.

A translocação t(10;21) e o quadro clínico do portador

No ponto de quebra distal do cromossomo 21, em 21q22.13, está mapeado o gene *DYRK1A* (*Dual-specificity tyrosine-(Y) phosphorylation regulated kinase1A*). O *DYRK1A* contém 13 exons e o *splicing* alternativo resulta em vários transcritos que diferem na região 5' UTR ou na região codificadora 3'. A quebra ocorreu em região intrônica, entre os exons 3 e 4. Os quatro principais transcritos foram afetados pela quebra. Como consequência do rearranjo, a porção do gene proximal ao ponto de quebra foi inserida no braço curto do cromossomo der(10), e a porção do gene distal ao

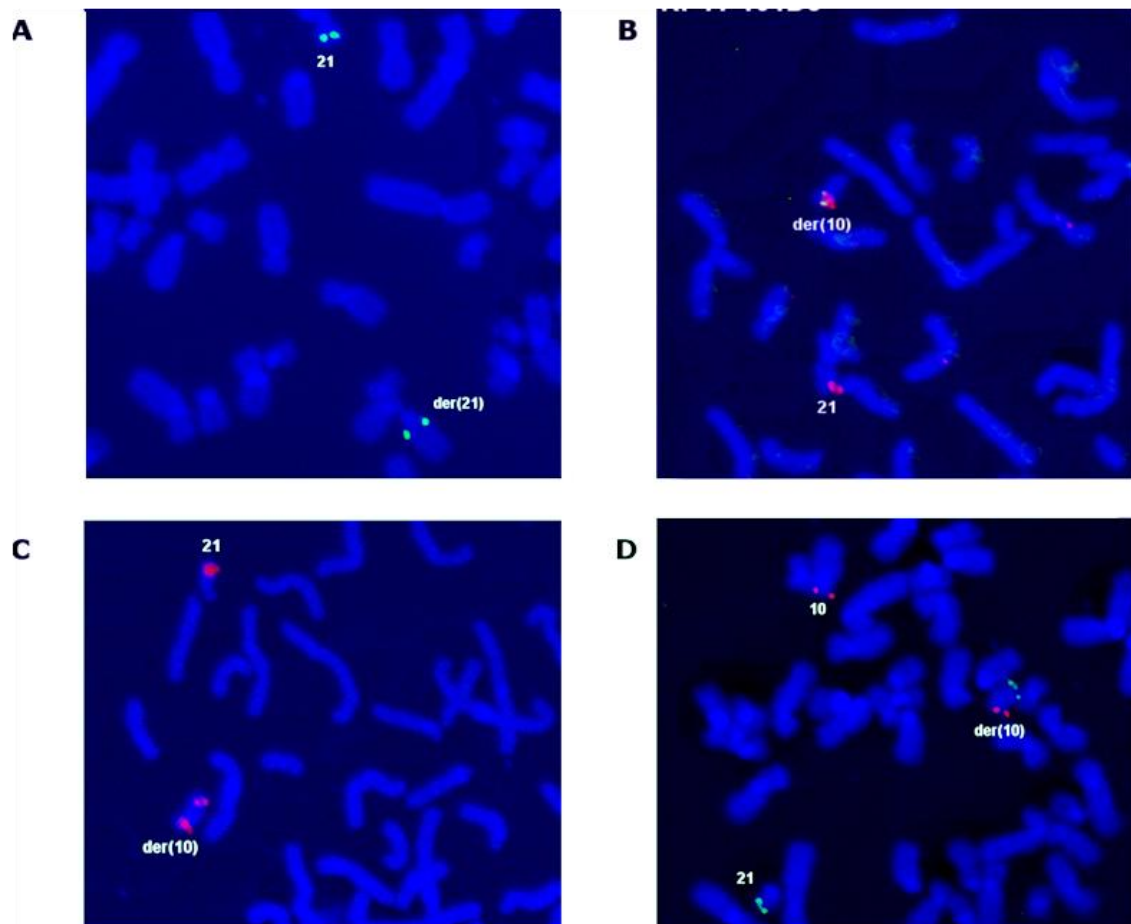


FIGURA VI.5: t(10;21)(q21.2;q22.2) - Mapeamento dos pontos de quebra do cromossomo 21 por FISH. A e B. Hibridação in situ fluorescente de clones do cromossomo 21 mapeados em 21q22.13. **A.** O sinal do clone RP11-102E10 (sinal verde) foi detectado no cromossomo der(21). **B.** O sinal do clone RP11-101D8 (sinal vermelho) foi detectado no braço curto do cromossomo 10; uma sonda subtelo mérica do braço curto do cromossomo 10 foi usada como controle (sinal verde). Um dos pontos de quebra do cromossomo 21 situa-se, portanto, no segmento entre os clones RP11-102E10 e RP11-101D8. **C e D.** Hibridação in situ fluorescente de clones do cromossomo 21 mapeados em 21q22.13 e teloméricos aos clones RP11-102E10 e RP11-101D8. **C.** Sinais de hibridação do clone RP11-777J19 (vermelhos) foram visualizados nos braços longo e curto do cromossomo der(10), indicando que um dos pontos de quebra está contido na sequência do clone. **D.** O sinal de hibridação do clone RP11-9803 (sinal verde) foi visualizado no braço longo do cromossomo der(10); uma sonda subtelo mérica do braço curto do cromossomo 10 foi usada como controle (sinal vermelho). Os resultados indicam que outro ponto de quebra do cromossomo 21 situa-se no segmento que se sobrepõe ao clone RP11-777J19, delimitado pela porção do clone RP11-101D8 que não se sobrepõe ao clone RP11-777J19. Assim, ocorreram duas quebras no cromossomo 21 e o fragmento resultante foi inserido no braço curto do cromossomo der(10). O segmento distal à inserção foi translocado para o braço longo do cromossomo 10.

ponto de quebra foi translocada para o braço longo do cromossomo der(10). Os genes *DYRK* codificam proteína quinases que catalisam a sua autofosforilação de resíduos de tirosina e a fosforilação de resíduos serina/treonina em substratos exógenos (Becker et al., 1998; Himpel et al., 2001). Os substratos da *DYRK1A* incluem alvos nucleares e

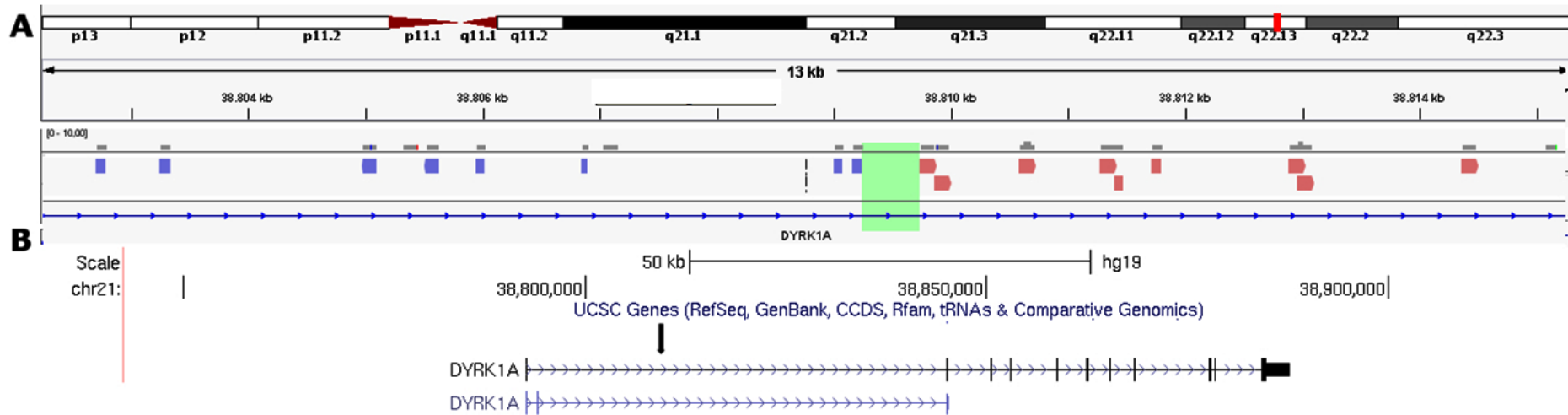


FIGURA VI.6. t(10;21)– Delimitação por MPS do ponto de quebra distal em 21q22.13 do segmento inserido em 10p14: **A.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes mapeadas no segmento 21q22.13, cujo par se localiza em 10p14. As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 492 pares de bases (em verde) que contém o ponto de quebra foi delimitado pelas *reads* discordantes mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *DYRK1A* foi interrompido no ponto de quebra. (IGV Browser). **B.** O mapa do segmento 21q22.13 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu o *DYRK1A* no intron 3. (UCSC genes) (Adaptado de UCSC, hg 19).

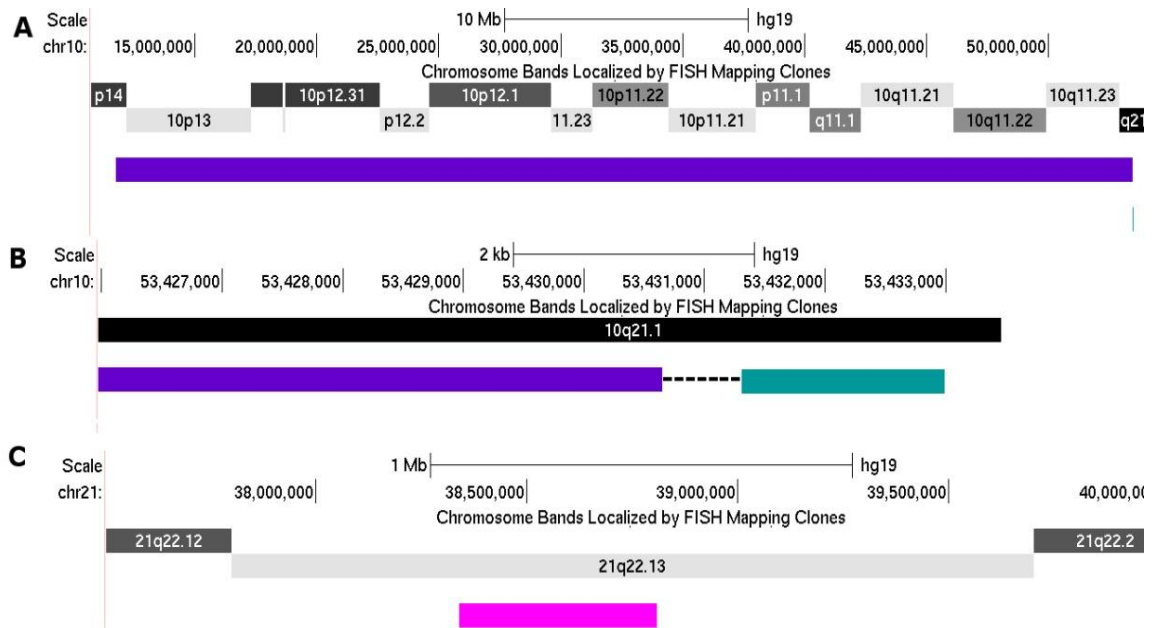


FIGURA VI.7: t(10;21)(q21.2;q22.2) – Esquema da estrutura dos cromossomos derivativos 10 e 21 após análise por FISH e MPS. A e B. No cromossomo 10 ocorreram três quebras, uma em 10p14 e duas em 10q21.1. O segmento 10p14q21.1 (em roxo) encontra-se invertido no cromossomo der(10) e o fragmento resultante das duas quebras em 10q21.1 (em verde) foi inserido também no der(10), distal ao segmento invertido 10p14q21.1, no braço curto do der(10). O segmento distal à inserção foi translocado para o cromossomo der(21). Em (B) destaca-se o segmento 10q21.1; a região delimitada para o ponto de quebra é representado por linhas pontilhadas. C. No cromossomo 21 ocorreram duas quebras em 21q22.13 e o fragmento resultante das quebras foi inserido invertido no braço curto do cromossomo der(10) (em rosa); o segmento 21.22.13q-qtel, distal à inserção, foi translocado para o braço longo do cromossomo der(10).

citossólicos, compreendendo fatores de transcrição (*CREB*, *NFAT*, *STAT3*, *FKHR*, *Gli1*), fatores de *splicing* (*cyclin L2*, *SF2*, *SF3*), e fatores de tradução (*eIF2Bε*), proteínas sinápticas (*dynamin I*, *amphiphysin I*, *synaptojanin I*) e outras proteínas com múltiplas funções (*glycogensynthase*, *caspase-9*, *Notch*) (Park et al., 2009). Essa diversidade de substrato demonstra a ação pleiotrópica da *DYRK1A* (Galceranet et al., 2003; Hammerle et al., 2003; Skurat et al., 2004; Laguna et al., 2008). Em *Drosophila* o gene é expresso ubiquamente em tecidos fetais e em adultos, tendo sido detectada sua expressão em tecidos não-neurais e no sistema nervoso central. Estudos em camundongos e humano também sugerem que o gene atue no desenvolvimento do sistema nervoso central. Em embriões de camundongo, o gene é altamente expresso no tubo neural e na vesícula óptica, o que indica sua importância durante os estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso (Fotaki et al., 2002). Camundongos portadores de mutações nulas do gene *DYRK1A* em homozigose apresentam atraso de crescimento intrauterino e morrem

durante a gestação (Fotaki et al., 2002). Animais heterozigóticos têm viabilidade neonatal reduzida e diminuição do tamanho corporal do nascimento até a idade adulta. Houve redução também de cerca de 30% no tamanho do cérebro dos camundongos heterozigóticos, no entanto, a citoarquitetura e os componentes neurais, na maioria das regiões, não mostrou alteração. Os autores concluíram que, no sistema nervoso central, o gene *Dyrk1A* atua na determinação do tamanho do cérebro. O papel do gene durante o desenvolvimento do cérebro estaria relacionado a neurogênese e diferenciação neuronal (Hämmerle et al., 2003). A similaridade fenotípica produzida pela haploinsuficiência do gene em camundongos e em seu ortólogo em *Drosophila* (Tejedoret al., 1995) indica sua função conservada e revela a importância biológica da proteína em diferentes filos. Em camundongos modelo da síndrome de Down e em pacientes com a síndrome foram detectados aumentos de uma vez e meia nos níveis da DYRK1A, indicando que a expressão da proteína é dependente de dosagem gênica (Dowjat, et al., 2007). A hipótese de que o gene *DYRK1A* possa ser o principal candidato para o comprometimento intelectual em pacientes com a síndrome de Down (Ronanet al., 2007) foi apoiada por estudos posteriores que mostraram que a perda de função do gene também pode causar deficiência intelectual em pacientes que não são afetados pela síndrome de Down. Moller et al. (2008) descreveram duas translocações equilibradas que interrompem o gene *DYRK1A* em dois pacientes com deficiência intelectual, microcefalia e retardo de crescimento. Em outro paciente com quadro clínico similar, foi identificada uma mutação de perda de função no gene *DYRK1A*, o que levou à caracterização de uma nova síndrome devida à haploinsuficiência de *DYRK1A*, cujos sinais principais são deficiência intelectual, microcefalia, atraso ou ausência de fala e dismorfismos faciais característicos (van Bon et al. 2011). Outros sinais típicos observados em 2/3 dos afetados incluem retardo de crescimento intrauterino, convulsões febris, anomalias estruturais no cérebro, anomalias esqueléticas leves e dificuldade de alimentação. A semelhança dos sinais clínicos de nossa paciente com os dos outros três pacientes portadores de mutação ou interrupção do *DYRK1A* evidencia a contribuição da haploinsuficiência do gene para seu quadro clínico (Tabela VI.15).

O gene *PRKG1* (*proteinkinase, cGMP-dependent, type I*) está contido nos dois pontos de quebras do braço longo do cromossomo 10, em 10q21.1. A deficiência de *PRGKI* em camundongos resulta em anemia e esplenomegalia (Foller et al., 2008). No *Database of Genomic Variants* existem várias deleções descritas na região codificadora

Tabela VI.15: Características clínicas de pacientes portadores de translocações que interrompem o gene *DYRK1A* ou portador de mutação no gene *DYRK1A* (adaptada de van Bon et al., 2011)

Estudo	Moller et al. (2008)	Moller et al. (2008)	van Bon et al. (2011)	Nossa paciente
Genótipo	t(9;21)(p12;q22)	t(2;21)(q22;q22)	Mutação no gene	t(10;21)(q21.2;q22.2)
Sexo	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino
Idade no exame clínico	2 anos	12 anos	33 anos	15 anos
Deficiência mental	Moderada	Grave	Grave	Grave
Retardo de crescimento	+	+	+	+
Convulsões febris	+	+	+	+
Habilidade espacial limitada	+	?	+	?
Ausência de fala	+	?	+	(Fala comprometida)
Microcefalia primária	+	+	+	+
Dificuldade de alimentação neonatal	+	+	+	+
Estreitamento bitemporal	-	-	+	+
Orelha grande e simples	+	+	+	-
Olhos fundos	+	-	+	+
Nariz pontudo	-	+	+	+
Micrognatia	+	+	-	-
Aplasia mamária	NA	?	+	(Hipoplasia)
Escoliose/cifose/	-	+	-	-
Ressonância magnética do cérebro	Hipoplasia corpo caloso	?	Atrofia moderada	?
Hérnia inguinal	+	-	-	-
Defeitos cardíacos	-	+	-	-
Falanges distais curtas	-	+	-	-

NA, não aplicável; + e - presença ou ausência do sinal no paciente; ? não pesquisado.

do gene. O gene *HLCS* (*holocarboxylasesynthetase (biotin-(propionyl-CoA-carboxylase (ATP-hydrolysing)) ligase*) codifica uma enzima que atua na gliconeogênese, na síntese de ácidos graxos e no catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada. Mutações em homozigose nesse gene são responsáveis pela deficiência da síntese de holocarboxilase; a ausência da enzima causa acidose láctica, alopecia, queratoconjuntivite e erupção cutânea (MIM 253270; Suzuki et al., 1994). Assim, parece improvável que os genes *PRKG1* e *HLCS* estejam contribuindo para o fenótipo de deficiência intelectual, microcefalia e atraso de crescimento da portadora da t(10;21).

- **Translocação t(4;18)(p15.2;q11.2) (BCR A9)**

Paciente

A paciente foi encaminhada para avaliação genética por apresentar deficiência auditiva. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação entre o braço curto do cromossomo 4 e o braço longo do cromossomo 18. O exame cromossômico de seus genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da t(4;18) por FISH, MPS e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, realizamos hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nos segmentos dos pontos de quebra determinados pela análise após bandamento G (Tabelas VI.16 e VI.17). O ponto de quebra do cromossomo 4 foi mapeado em um segmento de

Tabela VI.16: Clones utilizados no mapeamento por FISH dos pontos de quebra do cromossomo 4.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-441O12	chr4:18,419,916-18,603,668	der(18)
RP11-10G12	chr4:22,554,689-22,700,147	der(18)
RP11-406E22	chr4:22,554,689-22,700,147	der(18)
RP11-660M5	chr4:25,086,714-25,276,320	der(18)
RP11-797J21	chr4:25,286,015-25,499,481	der(18)
RP11-326A17	chr4:25,669,385-25,891,390	der(4)
RP11-239C17	chr4:26,391,470-26,502,680	der(4)
RP11-415C15	chr4:4: 27,137,510-27,138,335	der(4)
RP11-478O20	chr4: 31,521,664-31,676,133	der(4)

169 kb em 4p15.2 (Tabela VI.18; Figura VI.8). O ponto de quebra do cromossomo 18 foi mapeado em um segmento de 2 kb em 18q11.2 (Tabela VI.18; Figura VI.9). Os pontos de quebra foram delimitados por MPS em segmentos de 7 pb e 326 pb em 4p15.2 e 18q11.2, respectivamente (Tabelas VI. 19 e VI.20; Figura VI.9). Os segmentos de junção das quebras foram sequenciados pelo método de Sanger e a análise revelou duas deleções nos segmentos das quebras (Tabela VI.20).

Tabela VI.17: Clones utilizados no mapeamento por FISH dos pontos de quebra do cromossomo 18.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-380C8	chr18:18,973,956-18,974,532	der(18)
RP11-296E23	chr18:18,863,284-19,023,838	der(18)
RP11-1112A2	chr18:18,953,620-19,115,875	der(18)
RP11-13N13	chr18:19,117,522-19,295,468	der(4)
RP11-446A4	chr18:19,197,594-19,388,586	der(4)
RP11-535A5	chr18: 19,819,988-19,967,635	der(4)
RP11-17J14	chr18:20,837,128-20,840,318	der(4)
RP11-20A14	chr18:27,345,596-27,509,885	der(4)

Tabela VI.18: Pontos de quebra da translocação t(4;18) (BCR A9) mapeados por FISH .

Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho (kb)	Genes nos pontos de quebra
chr4:25499481-25669385	169	<i>SLC34A2</i>
chr18:19115875-19117522	2	<i>ESCO1</i>

Tabela VI.19: Segmentos dos pontos de quebra da t(4;18) (BCR A9) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
4	4p15.2	chr4:25625622-25626074	7	chr4:25625622-25626074	
18	18q11.2	chr18:19176234-19176560	326	chr18:19176209-19176676	<i>ESCO1</i>

Tabela VI. 20: Segmentos de junção das quebras da t(4;18) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
4/18	4	-	18	-	Chr4: 453 pb
18/4	18	+	4	+	Ch18: 468pb

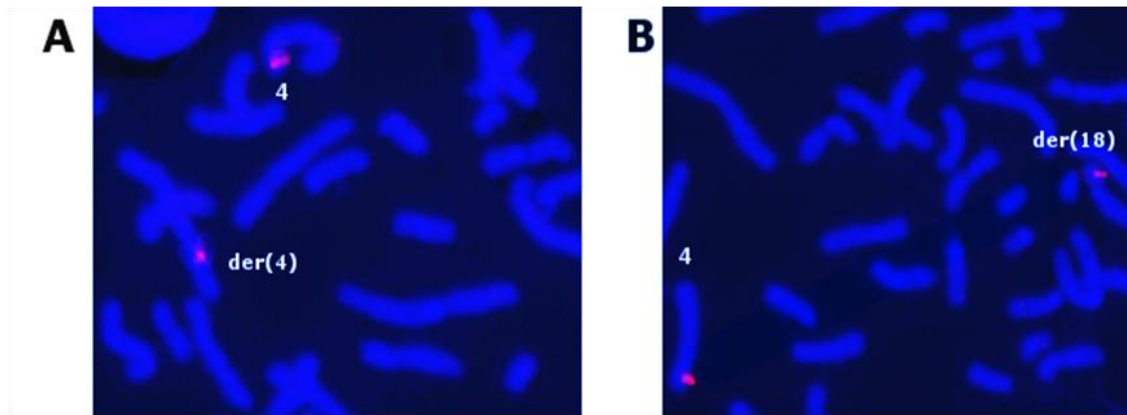


FIGURA VI.8: t(4;18)(p15.2;q11.2)- Mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 4. A hibridação *in situ* fluorescente de clones do cromossomo 4 revelou (A) sinal do clone RP11-326A17 (sinal vermelho) no braço curto do cromossomo der(4) e (B) sinal do clone RP11-797J21 (sinal vermelho) no braço longo do cromossomo der(18). O ponto de quebra do cromossomo 4 ocorreu, portanto, no segmento de 169 kb delimitado pelos dois clones.

Genes afetados pela translocação cromossômica

Não há genes mapeados no segmento da quebra do cromossomo 4. O gene *ESCO1* (*establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1*) foi interrompido pela quebra no cromossomo 18 (Tabela VI.19 e Figura VI.9).

A translocação t(4;18) e o quadro clínico do portador

A quebra do cromossomo 18 interrompeu o gene *ESCO1* no intron 1. O *ESCO1* é altamente expresso em testículo, placenta, pulmão, próstata e cérebro. Junto com *ESCO2*, a *ESCO1* tem atividade de acetiltransferase, função essencial para manter a estabilidade do complexo de coesina. Além de manter as cromátides-irmãs unidas durante a segregação dos cromossomos na divisão celular, o complexo de coesina atua em outros eventos celulares, tais como replicação do DNA, compactação da heterocromatina, reparo de quebra da dupla fita do DNA e controle da expressão gênica. Apesar de pouco afetar a segregação dos cromossomos, mutações em genes que codificam subunidades do complexo de coesina ou codificam cofatores do complexo de coesinas causam doenças denominadas coesinopatias (Barbero et al, 2011). Incluem-se nessa categoria a síndrome de Cornelia de Lange (mutações dominantes nos genes *NIPBL* e *RAD21*), síndrome de Roberts (mutações recessivas no gene *ESCO2*) e a síndrome de Warsaw breakage (mutações recessivas no gene *DDX11*). Apesar de anomalias esqueléticas serem a principal característica das coesinopatias, o espectro

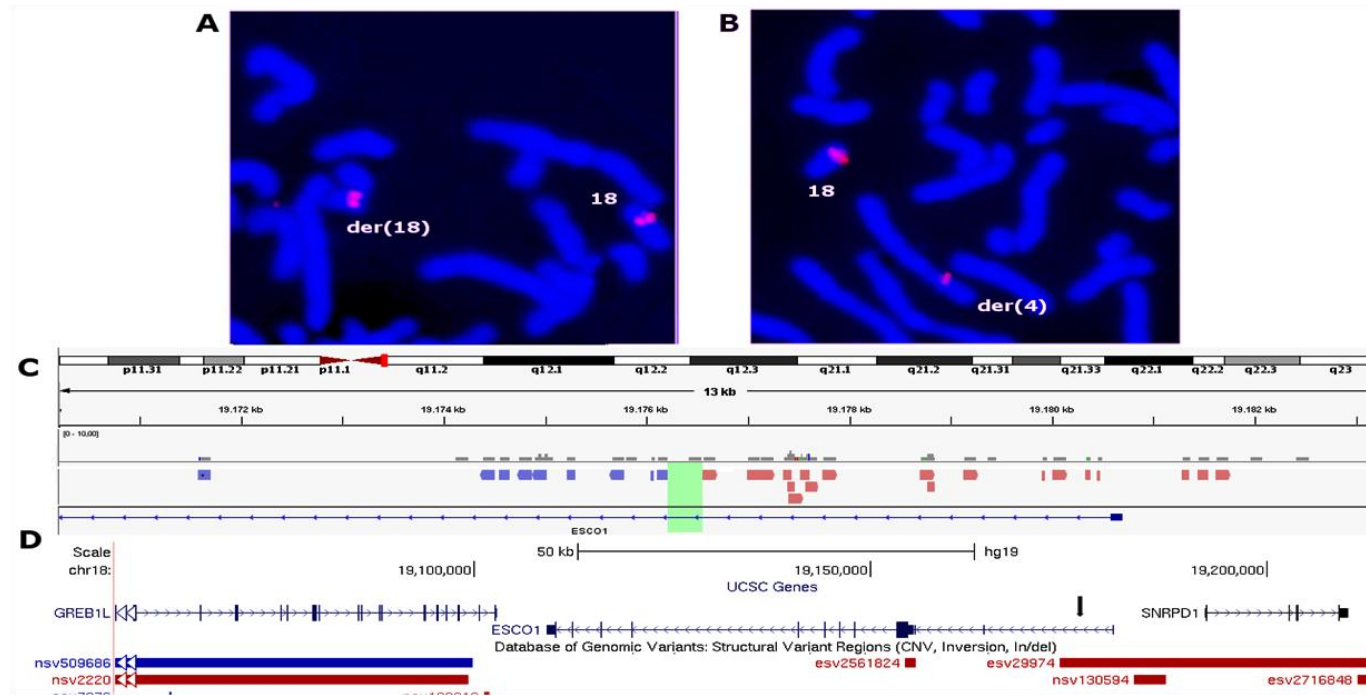


FIGURA VI.9: $t(4;18)(p15.2;q11.2)$ - Mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 18. A e B. A hibridação *in situ* fluorescente de clones do cromossomo 18 revelou (A) sinal do clone RP11-1112A2 (sinal vermelho) no braço longo do cromossomo der(18) e (B) sinal do clone RP11-13N13 (sinal vermelho) no braço curto do cromossomo der(4). O ponto de quebra do cromossomo 18 ocorreu, portanto, no segmento de 2 kb delimitado pelos dois clones. C. Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes mapeadas em 18q11.2, cujo par se localiza em 4p15.2, confirmando a translocação $t(4;18)$. As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 326 pb (em verde) que contém o ponto de quebra foi delimitado pelas *reads* discordantes mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *ESCO1* foi interrompido no ponto de quebra. D. O mapa do segmento 4p15.2 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu o gene *ESCO1* no intron 1. (UCSC genes). As variações no número de cópias (CNV) descritas no DGV e mapeadas na região estão indicadas em vermelho (deleções) e azul (duplicações). Há apenas duas deleções que se sobrepõem parcialmente ao *ESCO1*. (Adaptado de UCSC, hg 19).

clínico dessas doenças pode incluir deficiência auditiva.

A síndrome de Roberts, causada por homozigose quanto a mutação no gene *ESCO2*, é caracterizada por retardo de crescimento prenatal, anomalias craniofaciais, incluindo microcefalia e palato ou lábio fendido, e encurtamento grave e simétrico dos membros (Vega et al., 2005). Nas células de pacientes com a síndrome de Roberts, observa-se ausência de coesão de segmentos heterocromáticos pericentroméricos e do braço longo do cromossomo Y, resultado da perda da atividade de acetiltransferase da *ESCO2* (Vega et al., 2005). O gene *ESCO1* não está associado à síndrome e não há deleções descritas no cromossomo 18 que incluam o gene, no banco de dados Decipher. No entanto, há duas microdeleções descritas no DGV que incluem o exon 1 e o intron 1 do gene (DGV esv29974 e ssv84213). Apesar de não haver indícios de que o *ESCO1* seja sensível a dosagem, uma microduplicação do segmento 18p11.21q11.2 e de outros cinco genes em um anel supernumérico do cromossomo 18 (*GATA6*, *MC2R*, *MC5R*, *RBBP8*, e *ROCK1*) foi detectada em um paciente com anomalias de vértebras (Slavin et al., 2011). Diante das informações disponíveis, a contribuição do gene *ESCO1* para o quadro de deficiência auditiva observado na portadora da t(4;18) permanece incerta.

- **Translocação t(9;20)(q22.3;p13) (BCR A11)**

Paciente

A paciente foi encaminhada para avaliação genética por apresentar deficiência intelectual associada a obesidade. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação entre o braço longo do cromossomo 9 e o braço curto do cromossomo 20. O exame cromossômico de seus genitores recebeu cariótipos normais.

Investigação da t(9;20) por MPS e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, em estudo anterior do laboratório (Fontes, Dissertação de Mestrado, 2007) foi realizada a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G. O ponto de quebra do cromossomo 9 foi mapeado em um segmento de 182 kb em 9q22.31 (Tabela VI.21). O ponto de quebra do cromossomo 20 foi mapeado em um segmento de 159 kb em 20p13. Os limites dos pontos de quebra foram refinados por MPS em segmentos de 171pb e 597 pb, em 9q22.31 e 20p13, respectivamente (Tabelas VI.21 e VI.22; Figura VI.10). O

intervalo da quebra identificado por MPS no cromossomo 20 não estava incluído no segmento delimitado por FISH, sugerindo que a localização dos clones no banco de dado não estava correta.

Genes afetados pela translocação cromossômica

O pseudogene *ANKRD19P* (*ankyrin repeat domain 19*) foi interrompido pela quebra no cromossomo 9. Não há genes mapeados na região da quebra do cromossomo 20.

Tabela VI. 21: Pontos de quebra da translocação t(9;20) (BCR A11) mapeados por FISH.

Localização dos pontos de quebra	Tamanho (kb)	Genes nos pontos de quebra
chr9:95492745-95674924	182	<i>BICD2, ANKRD19P, ZNF484</i>
chr20:2493424-2652594	159	<i>TMC2, NOP56, IDH3B</i>

Tabela VI.22: Segmentos dos pontos de quebra da t(9;20) delimitados por MPS.

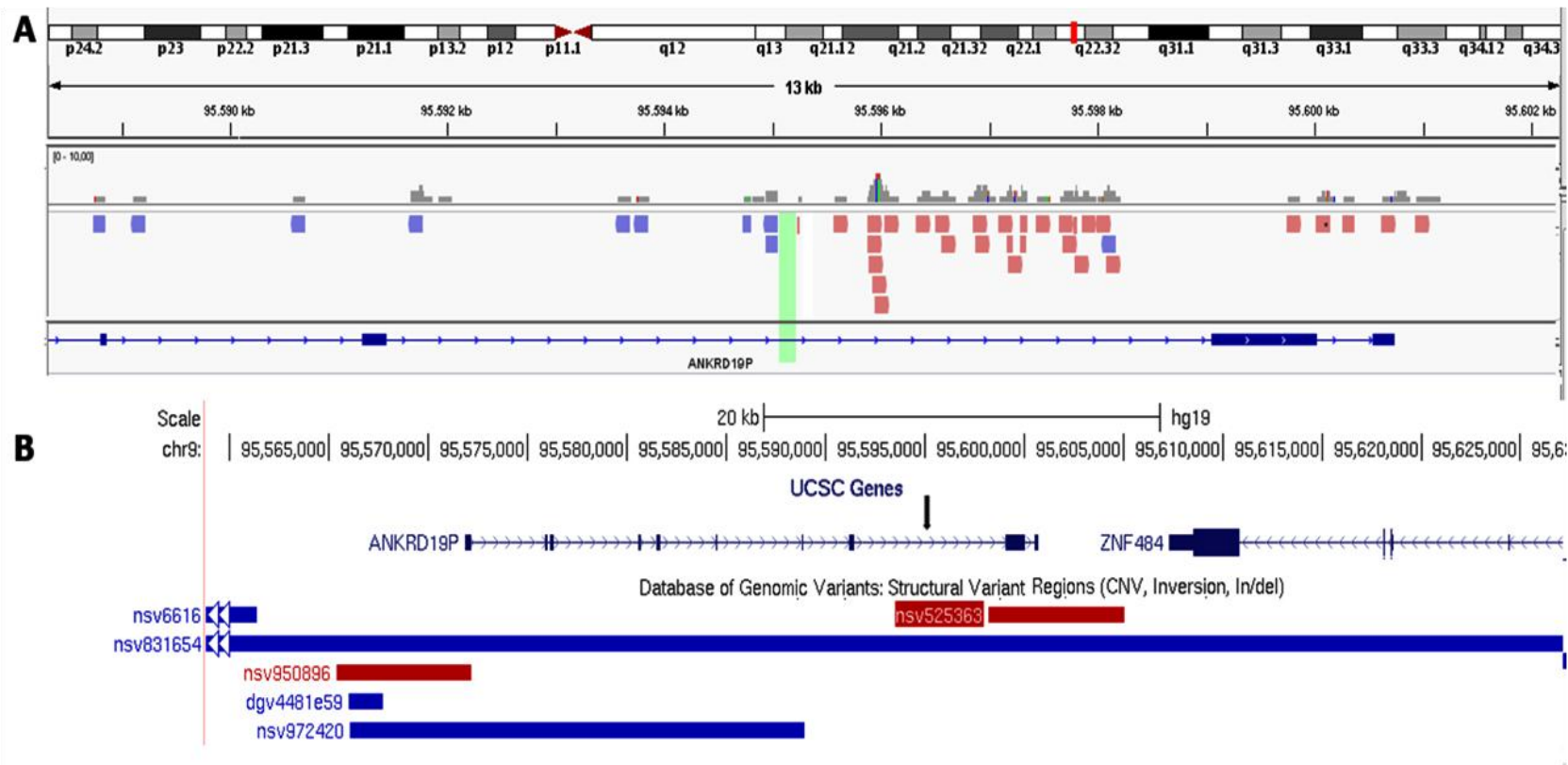
Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tam. pb	Gene truncado
9	9q22.31	chr9:95595064-95595235	171	<i>ANKRD19P</i>
20	20p13	chr20:1795348-1795945	597	

Tabela VI.23: Junções das quebras da t(9;20) identificadas por MPS.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita
9/20	9	-	2	-
20/9	20	+	9	+

A translocação t(9;20) e o quadro clínico do portador

O pseudogene *ANKRD19P* (*Ankyrin Repeat Domain 19*), foi interrompido pelo ponto de quebra do cromossomo 9. O *ANKRD19P* é expresso no cérebro e no testículo, mas sua função é desconhecida. Há apenas uma deleção e uma duplicação que incluem o *ANKRD19P* (Figura VI.10). As deleções descritas no Decipher incluem outros genes, dificultando correlações genótipo-fenótipo. Com exceção da expressão no cérebro, não há outros dados que apoiem a interrupção do *ANKRD19P* como causa do quadro clínico da portadora da translocação t(9;20). Considerando as fronteiras dos domínios topológicos, também não há genes próximos que poderiam ser considerados candidatos nos cromossomo 9 e 20.



IGURA VI.10: t(9;20)(q22.3;p13) - Mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 9 por MPS. **A.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes mapeadas em 9q22.31, cujo par se localiza em 20p13, confirmando a translocação t(9;20). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 171 pb (em verde) que contém o ponto de quebra foi delimitada pelas *reads* discordantes mapeadas em fitas diferentes do DNA. O pseudogene *ANKRD19P* foi interrompido no ponto de quebra. **B.** O mapa do segmento 9q22.31 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu o *ANKRD19P* no intron 8. (UCSC genes). As variações no número de cópias (CNV) descritas no DGV e mapeadas na região estão indicadas em vermelho (deleções) e azul (duplicações). Há apenas uma deleção e uma duplicação que se sobrepõem ao *ANKRD19P*. (Adaptado de UCSC, hg 19).

- **Inversão inv(12)(q21q23) (BCR A10)**

Paciente

O paciente foi encaminhada aos 14 anos de idade para avaliação genética por apresentar atraso na aquisição da fala, dificuldade de aprendizado e déficit de atenção e hiperatividade. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 12, inv(12)(q21q23). O exame cromossômico de seus genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da inversão por FISH, aCGH e MPS

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, realizamos a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabela VI.29 e VI.30). Os pontos de quebra distal e proximal do cromossomo 12 foram mapeados por FISH em segmentos de 814 kb e 123 Kb, respectivamente, em 12q15 e 12q24.11 (Tabela VI.31; Figuras VI.11 e VI.12). Os segmentos contendo os pontos de quebra foram refinados por MPS para 285pb e 46 pb, respectivamente, em 12q15 e 12q24.11 (Tabelas VI.32 e VI.33; Figura VI.12). Os intervalos das quebras identificados por MPS não estavam incluídos nos segmentos delimitados por FISH, indicando que a localização em bancos de dados de clones utilizados não estava correta.

Tabela VI. 29: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra proximal do cromossomo 12.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-444B24	não invertido	chr12: 68,455,635-68,644,461
Cancer_3A4	não invertido	chr12:69,195,682-69,342,257
RP11-21I1	invertido	chr12:70,156,079-70,341,377
RP11-11G4	invertido	chr12:70,432,114-70,593,764
RP11-101K2	invertido	chr12:71,459,471-71,598,511
RP11 186F10	invertido	chr12: 71,905,836-72,048,917
RP11 181D11	invertido	chr12: 72,339,191-72,478,314
RP11-255I14	invertido	chr12:74,780,462-74,909,270
RP11 25J3	invertido	chr12:75,892,543-76,047,496
RP1-97G4	invertido	chr12:77,725,135-77,831,129
RP11-362A1	invertido	chr12:82,302,829-82,400,823

Tabela VI. 30: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra distal do cromossomo 12.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-285E23	invertido	chr12: 102,067,275-102,226,944
RP11-205I24	invertido	chr12:102,490,342-102,647,694
RP11-415D21	invertido	chr12: 105,027,186-105,189,013
RP11-90N16	invertido	chr12:106,096,623-106,265,244
RP11-101A9	invertido	chr12: 106,545,823-106,546,574
RP11-1C11	invertido	chr12:106,899,826-107,062,279
RP11-256L11	invertido	chr12: 109,695,428-109,875,519
RP11-825G24	invertido/não invertido	chr12:110,194,667-110,423,183
RP11-137H19	não invertido	chr12:110,317,566-110,497,067
RP1-305I20	não invertido	chr12:110,679,236-110,799,763
RP1-46F2	não invertido	chr12:111,315,701-111,464,938

Tabela VI.31: Pontos de quebra da inversão inv(12) mapeados por FISH.

Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho kb	Genes nos pontos de quebra
chr12:69342257-70156079	814	<i>CPSF6, MIR1279, LYZ, YEATS4, FRS2, MIR3913-1, MIR3913-2, CCT2, LRRC10, BEST3, BC042465, RAB3IP.</i>
chr12:110194667-110317566	123	<i>FAM222A, TRPV4, GLTP.</i>

Tabela VI.32: Segmentos dos pontos de quebra da inv(12) delimitados por MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tam. pb	Gene Truncado
12(1)	12q15	Chr12:70180536-70180820	285	<i>RAB3IP</i>
12(2)	12q24.11	Chr12:110319921-110319966	46	

Tabela VI.33 : Segmentos de junção das quebras da inv(12) delimitados por MPS.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 1	Fita
12(1)/ 12(2)	12(1)	+	12(2)	+
12(1)/ 12(2)	12(2)	-	12(1)	-

Gene afetado pela inversão cromossômica

O gene *RAB3IP* (*Rab-3A-interacting protein*) foi interrompido no ponto de quebra proximal (Tabela VI.29). Não há genes mapeados na região da quebra em 12q23.

A inversão *inv(12)* e o quadro clínico do portador

Não há genes mapeados no segmento que contém o ponto de quebra distal do cromossomo 12. O ponto de quebra proximal interrompeu o gene *RAB3IP* no intron 4. Na literatura há duas deleções que incluem o gene *RAB3IP*, em indivíduos que apresentam deficiência intelectual e dismorfismo faciais; no entanto, essas deleções incluem outros genes dificultando correlações genótipo-fenótipo (Schluth et al., 2008; Vergult et al., 2011). Em outra inversão de nossa amostra o gene *RAB3IP* foi interrompido (BCR C6); contudo, essa inversão está presente na genitora clinicamente normal do paciente, sugerindo que a interrupção de *RAB3IP* não seja patogênica; a presença de uma deleção que inclui os exons 5 e 6 do *RAB3IP* no DGV (nssv71107) vem apoiar essa conclusão. Considerando as fronteiras dos domínios topológicos, não há outros genes próximos aos pontos de quebra que possam ser considerados candidatos. Assim, não há dados que indiquem que a inversão do cromossomo 12 esteja contribuindo para o fenótipo do portador.

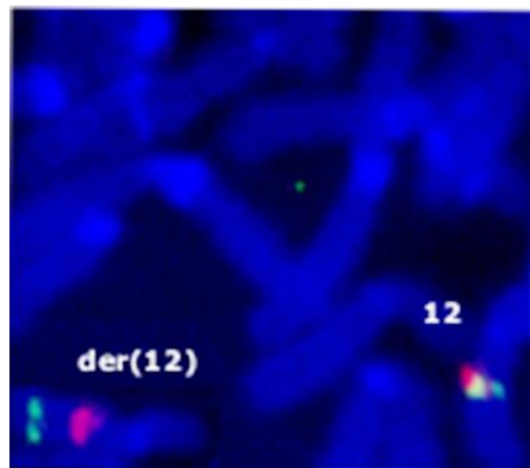


FIGURA VI.11: *inv(12)(q21q23)* - Mapeamento do ponto de quebra proximal da inversão do cromossomo 12 por FISH. A hibridação *in situ* fluorescente dos clones Cancer_3A4 (sinal vermelho) e RP11-2111 (sinal verde), mapeados em 12q15, revelou sinais de hibridação, respectivamente, nos segmentos normal e invertido do cromossomo der(12). O ponto de quebra proximal da inversão ocorreu, portanto, no segmento de 814 kb delimitado pelos dois clones.

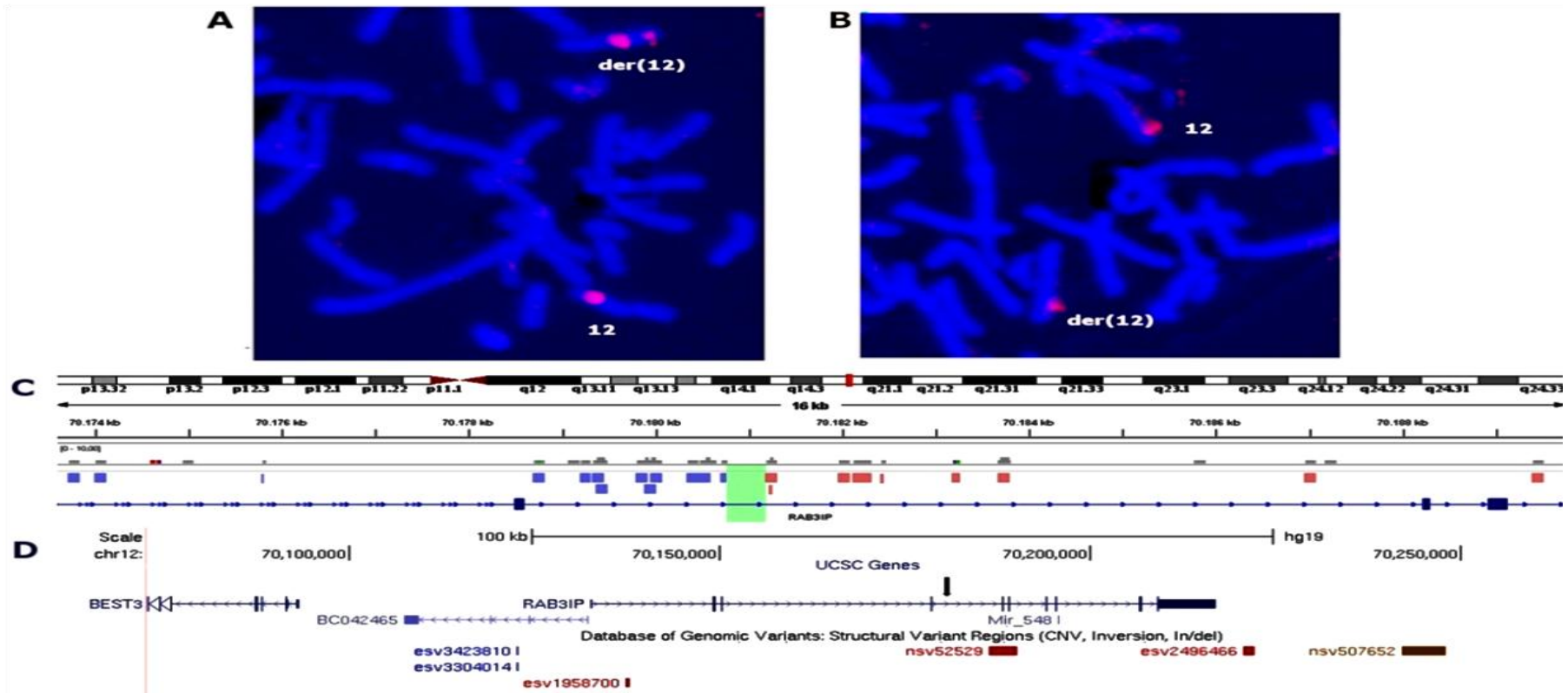


FIGURA VI.12: *inv(12)(q21q23)* - Mapeamento do ponto de quebra distal da inversão por FISH e MPS: **A.** FISH do clone RP11-825G24 (sinal vermelho) mapeado em 12q24.11 revelou sinais de hibridação nos segmentos normal e invertido do cromossomo der(12), indicando que o ponto de quebra distal da inversão está contido na sequência do clone. **B.** O sinal de hibridação do clone RP11-137H19, que se sobrepõem ao RP11-825G24 em sua região proximal, não estava no segmento invertido. Esses resultados indicam que o ponto de quebra distal da inversão situa-se no segmento de 123 kb que se sobrepõe ao clone RP11-825G24, delimitado pela porção do clone RP11-137H19 que não se sobrepõe ao clone RP11-825G24. **C.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes em 12q15, cujo par se localiza em 12q24.11, confirmando a *inv(12)*. As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 285 pb, que contém o ponto de quebra (em verde) foi delimitado pelas *reads* que mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *RAB3IP* foi interrompido pelo ponto de quebra. **D.** O mapa do segmento 12q15 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu o gene *RAB3IP* no intron 4. (UCSC genes). As variações no número de cópias (CNV) descritas no DGV e mapeadas na região estão indicadas em vermelho (deleções) e azul (duplicações). Há três deleções que se sobrepõem ao *RAB3IP*, apenas um delas incluindo exons do gene. (Adaptado de UCSC, hg 19).

- **Inversão inv(17)(p11.2q21.3) (BCR A6)**

Paciente

A paciente foi encaminhada para avaliação genética, por apresentar deficiência intelectual e dismorfismos faciais. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 17: inv(17)(p11.2q21.3). O exame cromossômico de seus genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da inv(17) por FISH, MPS e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a inversão, realizamos a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nos segmentos dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabelas VI.34 e VI.35). Os pontos de quebra foram delimitados por FISH em segmentos de 79 kb e 166 kb, em 17p11.2 e 17q21.33 (Tabela VI.36). Para refinar a localização dos pontos de quebra da inversão, foi realizado MPS. No entanto, não foi possível caracterizar os pontos de quebra por MPS, devido provavelmente à presença de elementos repetidos (LCRs ou sequências repetitivas dispersas) nos segmentos das quebras.

A análise por aCGH não detectou desequilíbrios submicroscópicos no cromossomo 17. No entanto, no cromossomo 2 foi identificada uma deleção de 424 kb, em 2q23.1 (Figura VI.13). A deleção foi confirmada por MPS e sua extensão foi redefinida para um segmento de ~463 kb a 458 kb (chr2:148,698,068-149,156,582). O ponto de quebra proximal da deleção foi delimitado em segmento de aproximadamente 4 kb (chr2:148,693,937-148,698,068) e o distal, em segmento de aproximadamente 776 pb (149,156,582-149,157,358).

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Sete genes estão mapeados nos intervalos dos pontos de quebra determinados por FISH (*ALKBH5*, *LLGL1*, *FLII*, *SPECC1*, *CCDC144CP*, *NGFR* e *NXPH3*), mas não conseguimos determinar quais genes foram interrompidos (Tabela VI.36).

Tabela VI.34: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra do braço curto cromossomo 17

Clone	Coordenada (hg 19)	Sinal	Posição
RP11-219A15	chr17:16,587,021-16,777,061	braço curto	não invertido
RP11-524F11	chr17:17,398,429-17,579,737	braço curto	não invertido
RP11-258F1	chr17:17,929,235-18,093,660	braço curto	não invertido
RP11-189D22	chr17: 18,000,668-18,172,954	braços curto e longo	não invertido / invertido
RP1-162E17	chr17:19,186,942-19,310,086	braço longo	invertido
RP11-78O7	ch17:19,674,485-19,807,021	braço longo	invertido
RP5-836L9	ch17:20,073,751-20,192,547	braço longo	invertido
RP11-363P3	chr17:20,071,976-20,245,026	braço longo	invertido

Tabela VI.35: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra do braço longo do cromossomo 17.

Clone	Coordenada (hg 19)	Sinal	Posição
RP11-392O1	chr17:41,576,520-41,736,049	braço curto	invertido
RP5-905N1	chr17:41,826,877-41,827,638	braço curto	invertido
RP11-361K8	chr17:46,603,678-46,769704	braço curto	invertido
RP11-81K2	chr17:47,400,368-47,586,370	braço curto	invertido
RP11-962N5	chr17:47,753,071-47,926,184	braço longo	não invertido
RP11-1145p17	chr17:47,819,905-47,980,404	braço longo	não invertido
RP5-875H18	chr17:48,137,780-48,232,903	braço longo	não invertido

Tabela VI.36: Segmentos dos pontos de quebra da inv(17) mapeados por FISH

Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho kb	Genes nos pontos de quebra
chr17:18093660-18172954	79	<i>ALKBH5, LLGL1, FLII, DQ596932, piR-34998</i>
chr17:47586370-47753071	166	<i>NGFR, NXP3</i>

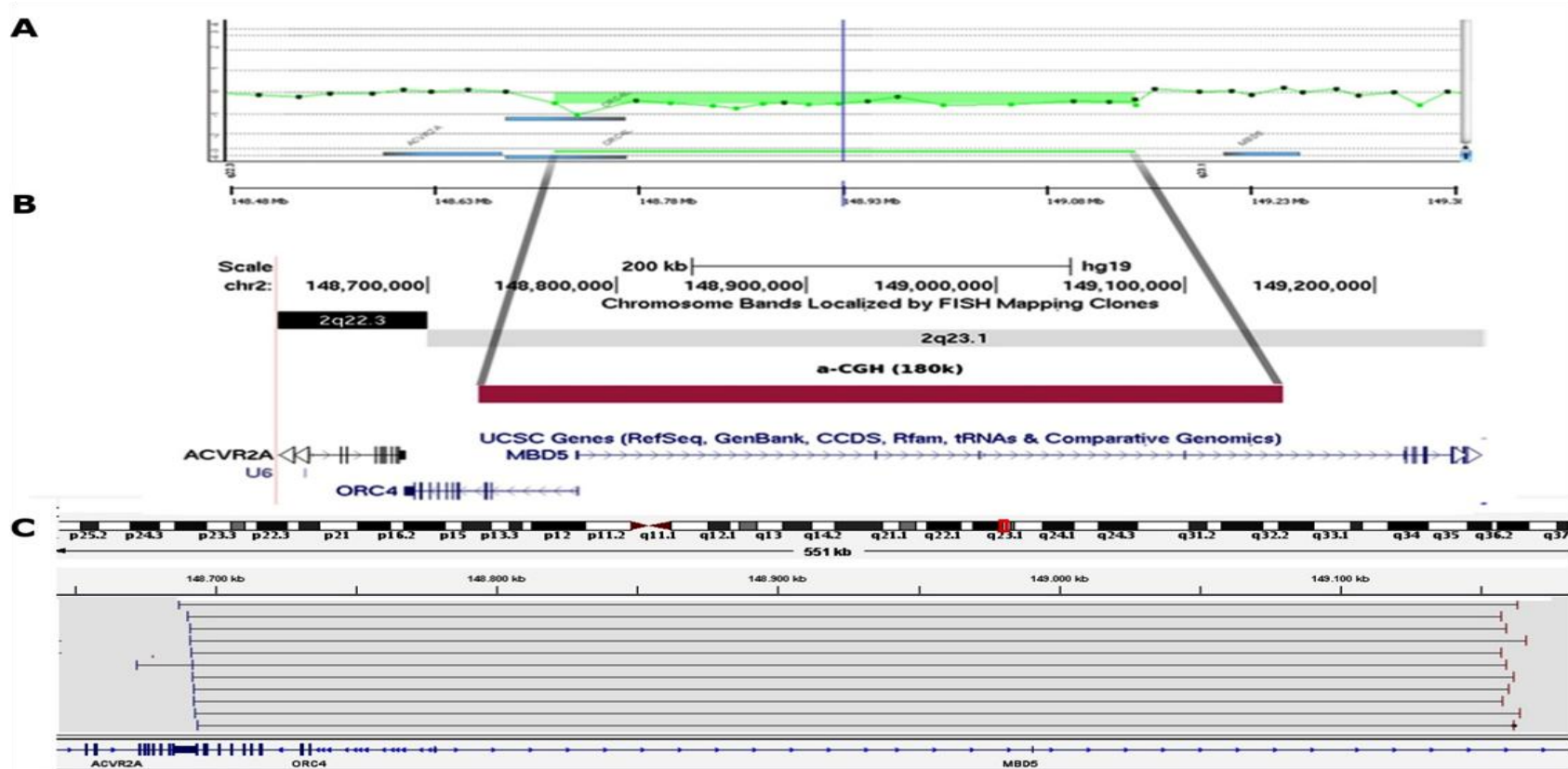


FIGURA VI.13: inv(17)(p11.2;q21.3) – Deleção no cromossomo 2 identificada por aCGH e confirmada por MPS. **A.** O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do segmento 2q23.1 evidencia o mínimo segmento deletado de ~423 kb (oligonucleotídeos mapeados no segmento da deleção, em verde). **B.** Os genes *ORC4* e *MBD5* estão localizados no segmento da deleção (em vermelho). **C.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser em 2q23.1 mostra os pares de *reads* com distância diminuída em relação ao genoma de referência. As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. As linhas horizontais indicam a distância no genoma de referência entre os pares de *reads*. Esses dados confirmam a deleção, que com base na distância entre os pares de *reads* tem uma extensão de ~463 kb a 458 kb.

Genes mapeados nos segmentos da deleção em 2q23.1

Os genes *ORC4* e *MBD5* estão mapeados na região da deleção do cromossomo 2 (Figura VI.13).

A inversão inv(17) e o quadro clínico do portador

Por meio de aCGH foi identificada uma deleção no braço longo do cromossomo 2 - del(2)(q23.1). As manifestações clínicas da paciente sobrepõem-se às de outros portadores de deleções da síndrome de microdeleção em 2q23, apontando para a haploinsuficiência do gene *MBD5*, mapeado no segmento deletado do cromossomo 2, como causa da deficiência intelectual e dos distúrbios faciais (Talkowski et al., 2011). Esse gene codifica um membro da família *methyl-CpG-binding domain* (MBD), que atuam tendo como substrato o DNA metilado. Além do domínio MBD, essa proteína contém o domínio PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro motif), que consiste de 100-150 aminoácidos e é encontrado em proteínas que atuam em divisão celular, crescimento e diferenciação.

O gene *MBD5* contém cinco exons não codificadores seguidos de 10 exons codificadores. Existem duas isoformas, uma maior, codificada pelos exons 6-15, e outra menor, codificada pelos exons 6-9. A primeira é altamente expressa no cérebro e no testículo e a isoforma 2 tem alta expressão no ovócito, sugerindo papel no sistema nervoso e na reprogramação epigenética após a fertilização (Bonnet et al., 2013). A deleção detectada no portador da inv(17) inclui apenas os cinco primeiros exons não codificadores do *MBD5*. No entanto, já foi demonstrado que a deleção dos exons não codificadores da isoforma do *MBD5* expressa no cérebro diminui a expressão do gene pela metade e causa deficiência intelectual (Talkowski et al., 2011; Bonnet et al., 2013). Assim, a deleção do gene *MBD5* no cromossomo 2 aparece como causa principal do quadro clínico do portador da inv(17), sendo mais provável que a associação entre a inv(17) e o fenótipo seja casual.

- **Translocação t(4;14)(q27;q13) (BCR A21)**

Paciente

A paciente foi encaminhada com 1 ano e 6 meses para avaliação genética, por apresentar atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, paraplegia cerebral tetraplégica

caracterizada por hipotonia axial e espasticidade distal, microcefalia, disfagia orofaríngea neurogênica e convulsões. No período neonatal teve parada cardiorrespiratória, necessitando de ventilação mecânica prolongada; foram detectados malformação adenomatóide cística em pulmão esquerdo e agenesia de corpo caloso. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 4 e 14: t(4;14)(q27;q13). A análise cromossômica de seus pais revelou cariótipos normais.

Investigação da translocação por MPS e aCGH

Os pontos de quebra da translocação foram mapeados por MPS (Tabelas VI.37 e VI.38). O ponto de quebra no cromossomo 4 foi delimitado num segmento de 1284 pb, em 4q26. O ponto de quebra no cromossomo 14 foi delimitado num segmento de 499 pb em 14q12 (Figura VI.14). O sequenciamento das junções dos pontos de quebras revelou a presença de pequenas deleções (Tabela VI.38).

Tabela VI.37: Segmentos dos pontos de quebra da t(4;14) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
4	4q26	chr4:114869966-114871250	1284	chr4:114870849-114870853	<i>ARSJ</i>
14	14q12	chr14:29630532-29631031	499	chr14:29630920-29630929	

Tabela V.38: Segmentos de junção das quebras da t(4;14) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
4/14	4	-	14	+	chr4: del GACTT
14/4	14	-	4	+	chr15:del GCCCTGGCT

Gene afetado pela translocação cromossômica

O gene *ARSJ* (*Arylsulfatase family, member J*) foi interrompido no ponto de quebra do cromossomo 4 (Tabela VI.37). Não há genes mapeados no ponto de quebra do cromossomo 14.

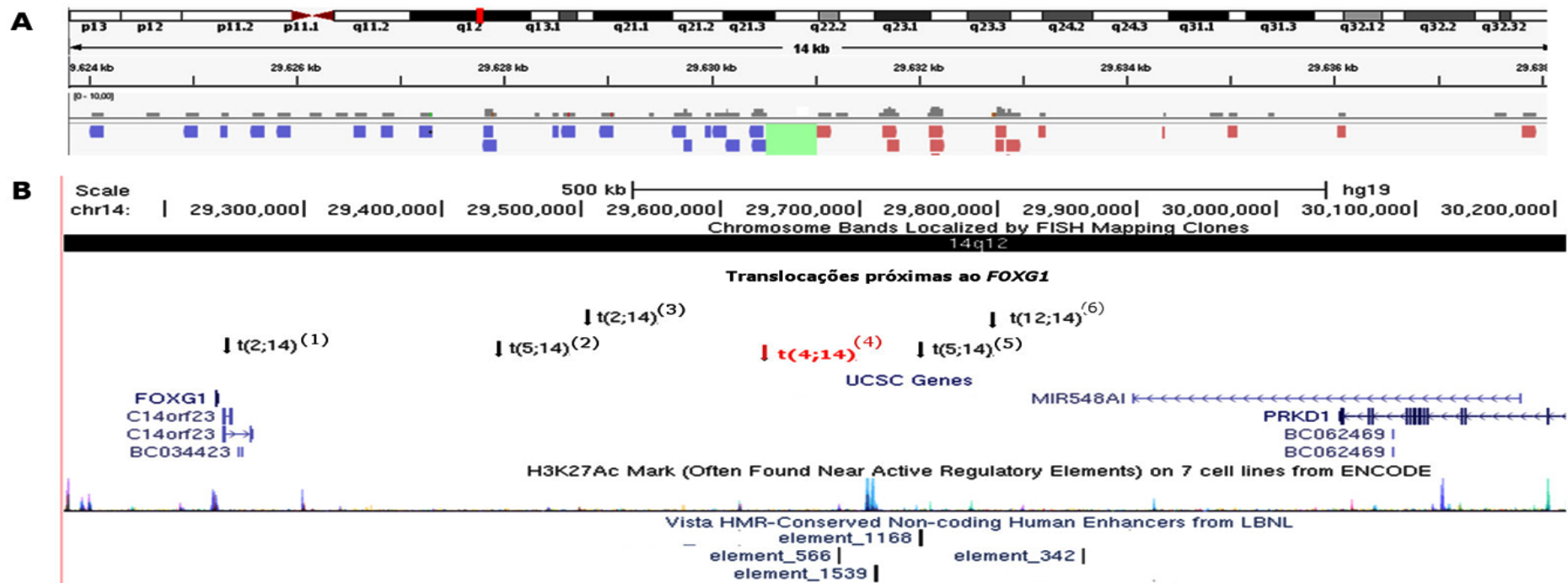


FIGURA VI.14: t(4;14)(q27;q13) (BCR A23) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 14 por MPS. **A.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes em 14q12, cujo par se localiza em 4q26, confirmando a translocação t(4;14). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 499 pb que contém o ponto de quebra (em verde) foi delimitado pelas *reads* mapeadas em fitas diferentes do DNA. Não há genes mapeados nesse segmento (IGV Browser). No entanto, a quebra provavelmente afetou a região reguladora do gene *FOXG1* mapeado 391 kb *downstream* ao ponto de quebra. **B.** Segmento *downstream* ao gene *FOXG1*: estão indicados os genes (UCSC genes), as translocações que provavelmente afetam a expressão do gene e potenciais elementos reguladores. As quebras da translocação t(4;14) descrita neste trabalho (4) (indicada por seta vermelha) e das cinco translocações previamente descritas, (indicadas por setas pretas: (1) Schoichet et al., 2005; (2) Goubau et al., 2013; (3) Kortum et al., 2011; (5) Goubau et al., 2013; (6) Goubau et al., 2013) ocorreram a aproximadamente 4 - 640 kb 3' do gene *FOXG1*. Elementos não codificadores conservados (Conserved Non-coding Elements, CNE) foram avaliados quanto a sua atividade de controle da expressão gênica (VISTA HMR-Conserved Non-coding Human Enhancers from LBNL). Vários elementos conservados apresentaram atividade de *enhancers*, induzindo a expressão de gene repórter em embriões de camundongos (elementos 566, 1539, 1168 e 342). São candidatos a controlar a expressão do gene *FOXG1*. A t(4;14) e as outras translocações descritas podem ter afastado o gene *FOXG1* de um ou mais elementos reguladores e alterado a sua expressão.

A translocação t(4;14) e o quadro clínico do portador

O gene *ARSJ* foi interrompido no intron 1, no ponto de quebra do cromossomo 4. No banco de dados DECIPHER, há variações de número de cópias de segmentos que incluem esse gene, associadas a quadros clínicos diversos; entretanto essas variantes incluem outros genes, o que não permite estabelecer correlações clínicas especificamente com a perda do gene *ARSJ*. Apesar de o ponto de quebra do cromossomo 14 não afetar a estrutura de gene(s), a quebra ocorreu 391 kb downstream ao gene *FOXG1* (Figura VI.14). Cinco translocações descritas anteriormente localizadas entre 5 kb e 640 kb *downstream* ao *FOXG1*, supostamente afetaram a expressão do gene diante do fenótipo dos portadores (Shoichet et al. 200; Kortüm et al., 2011; Goubau et al., 2013). As quebras dessas translocações e da translocação t(4;14) localizam-se no mesmo domínio topológico do *FOXG1*, apoiando a hipótese de que afetam a região reguladora do gene. Assim como indivíduos com mutações no *FOXG1*, os portadores dessas translocações são afetados por uma variante congênita da síndrome de Rett (RTT) (MIM 613454). A RTT é doença neurológica grave, que resulta de mutação no gene *MECP2*, localizado no cromossomo X. A síndrome é caracterizada por microcefalia, regressão psicomotora, convulsões e movimentos manuais estereotipados. Na forma congênita da doença, relacionada a haploinsuficiência do gene *FOXG1*, observa-se hipotonia e atraso de desenvolvimento nos primeiros meses de vida da criança afetada. Em oposição, as primeiras manifestações clínicas de RTT aparecem entre 6 e 18 meses de vida. Diante do quadro clínico da paciente portadora da translocação, compatível com diagnóstico da variante congênita da síndrome de Rett, propomos que o fenótipo resulte da alteração da expressão do gene *FOXG1*. Nesse caso e nas translocações previamente descritas, os rearranjos podem ter interrompido elementos reguladores do gene *FOXG1* ou afastado o gene desses reguladores, levando à alteração de sua expressão e ao fenótipo. Na região 3' ao *FOXG1* já foram isolados elementos conservados não codificadores (CNE, *Conserved Noncoding elements*) capazes de ativar a expressão de genes repórter em embriões de camundongo (VISTA enhancer Project). Com base nesses resultados e na localização dos CNE no mesmo domínio topológico do gene, é provável que esses elementos sejam *enhancers*, regulando a expressão do *FOXG1* em cis (Figura VI.14).

- **Translocação t(2;16)(q35;q24.1) (BCR A7)**

Paciente

A paciente foi encaminhada, aos 8 anos de idade, para avaliação genética, por apresentar hipotireoidismo, testa curta, baixa implantação de cabelos, filtro curto, retrognatia e orelhas em abano. As mãos tinham quatro dígitos com ausência aparente do indicador. Apresentava também pé torto congênito com hexadactilia. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço longo do cromossomo 2 e o braço longo do cromossomo 16: t(2;16)(q35;q24.1).

Investigação da translocação por FISH, MPS e aCGH

Em estudo anterior do laboratório (Antonini, 2005; dados não publicados) e em nosso mestrado, os pontos de quebra da translocação foram mapeados por FISH. Neste trabalho, prosseguimos com o refinamento dos pontos de quebras da translocação por FISH e MPS. No cromossomo 2, a hibridação *in situ* permitiu delimitar o ponto de quebra em um segmento de 41 kb em 2q35 (Tabelas VI.39 a VI.41, Figuras VI.15 e VI.16). No cromossomo 16, o ponto de quebra foi delimitado em um segmento de 87 kb em 16q24.1. Posteriormente os pontos de quebra dos cromossomos 2 e 16 foram delimitados por MPS em segmentos de 101 pb e 99 pb, respectivamente (Tabelas VI.42 e VI.43, Figuras VI.15 e VI.16). O sequenciamento pelo método de Sanger dos fragmentos de junção revelou pequenas deleções nas regiões das quebras.

Tabela VI.39 : Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 2

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-265P15	chr2:220,815,939-220,987,640	der(2); der(16)
RP11-558I16*	chr2:220,942,287-221,039,798	der(2); der(16)
RP11-36A24	chr2:220,983,218-221,167,600	der(16)

*Clone utilizado no estudo anterior (Antonini, 2005)

Tabela VI.40 : Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 16.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-514D23	chr16:86,192,535-86,363,519	der(2)
RP11-805I24*	chr16:86,058,168-86,254,994	der(2); der(16)
RP11-542M13	chr16:85,916,567-86,105,024	der(16)

* Clone utilizado no estudo anterior (Antonini, 2005)

Tabela VI.41: Pontos de quebra da t(2;16) mapeados por FISH; não há genes mapeados nos segmentos das quebras .

Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho (kb)
chr2:220983218-220987674	4
chr16:86140084-86192535	52

Tabela VI. 42 : Segmentos dos pontos de quebra da t(2;16) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger; não há genes interrompidos.

Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger
2	2q35	chr2:220991570-220991671	101	chr2:220991633-220991636
16	16q24.1	chr16:86214706-86214805	99	chr6:86214739-86214741

Tabela VI.43: Segmentos de junção das quebras da t(2;16) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
2/16	2	-	16	+	chr2: del (GGTA)
16/2	16	+	2	+	chr16: del (ATA)

Nenhum gene está mapeado nos segmentos dos pontos de quebra dos cromossomos 2 e 16.

A translocação t(2;16) e o quadro clínico do portador

Não foram identificados genes nas regiões das quebras dos cromossomos 2 e 16. No cromossomo 2, o ponto de quebra foi mapeado em um extenso *gene desert*, entre os genes *SLC4A3* e *EPHA4* (Figura VI.15). No cromossomo 16, a quebra também ocorreu em um *gene desert*, entre os genes *IRF8* e *FOXF1* (Figura VI.16). Em nosso mestrado (Fonseca, 2011) concluímos que, apesar do gene *IHH* (*Indian hedgehog*) estar mapeado a mais de 1 Mb de distância do ponto de quebra do cromossomo 2, a alteração na expressão do *IHH* seria o principal mecanismo candidato ao quadro clínico da paciente. Mutações de ganho e de perda de função no gene *IHH* causam, respectivamente, braquidactilia tipo A1 (MIM, 112500; et al., 2001) e displasia acrocapitofemoral (MIM, 607778; Helleman et al., 2003). Translocações e variações de números de cópias *upstream* ao *IHH*, em camundongos e humanos, também resultam em malformações de membros e de crânio devido a alteração da regulação do gene (Cantagrel et al., 2007; Babbs et al., 2008; Klopockiet al., 2011; Yuksel-Apak 2012). O gene *IHH* codifica uma molécula sinalizadora da família *hedgehog* que atua na

diferenciação dos condrócitos e na formação óssea cortical. A molécula tem papel fundamental na formação óssea endocondral, por meio da regulação do desenvolvimento e da diferenciação dos condrócitos, via controle de *feedback* negativo com o peptídeo relacionado ao hormônio paratireoidiano (*parathyroid hormone-related peptide*, PTHrP) (Vortkamp et al., 1996). O *IHH* também promove a formação dos ossos corticais por meio da sinalização via receptores *Ptch1*, em osteoblastos. A portadora da t(2;16) tem quatro dígitos nas duas mãos, com aparente ausência do indicador e nos pés tem hexadactilia. O *IHH* é, portanto, um bom candidato ao quadro clínico, por meio da alteração de região reguladora. No entanto, o gene se localiza no domínio topológico vizinho à quebra da t(2;16), e portanto, a barreira do domínio impediria que a região reguladora do gene fosse afetada, como discutido adiante (Figura VI.15).

Apesar de nenhum dos genes mapeados no domínio topológico da quebra do cromossomo 2 causar alteração de membros, recentemente foi relatado que rearranjos cromossômicos (deleção, inversão e duplicação) localizados no mesmo domínio da quebra do cromossomo 2 causam malformações de membros em humanos (Lupiáñez et al., 2015). Nesse estudo, interações de cromatina, baseadas em estudos de 4C foram avaliadas em membros de embriões de camundongo, modelo para rearranjos semelhantes aos dos pacientes. O fenótipo dos camundogos recapitulava o fenótipo dos portadores do rearranjo. Os dados revelaram que as alterações de membros nos camundongos foram resultado de interações ectópicas dos genes *PAX3* (*Paired box 3*), *WNT6* (*wingless-type MMTV integration site family, member 6*) e *IHH* com o domínio em que se localiza a quebra da t(2;16). A deleção associada a alteração da expressão do *PAX3* causou braquidactilia em camundongos e humanos. A duplicação e a inversão estavam associadas, respectivamente, a alteração da expressão do gene *IHH* e do gene *WNT6*, causando polidactilia e F-syndrome (MIM 102510), em camundongos e humanos. Esses genes estão localizados nos domínios vizinhos ao domínio em que se localiza a quebra da t(2;16): *IHH* e *WNT6*, no domínio vizinho proximal e *PAX3*, no domínio vizinho distal (Figura VI.15). A remoção da fronteira do domínio (deleção) ou mudança de posição da fronteira (inversão e duplicação) permitiram que os genes *PAX3*, *WNT6* ou *IHH* passassem a interagir com o domínio vizinho. O padrão de expressão ectópico dos genes *IHH*, *WT6* e *PAX3* nos camundongos portadores dos rearranjos era similar ao padrão de expressão endógeno do gene *EPHAD4*, localizado

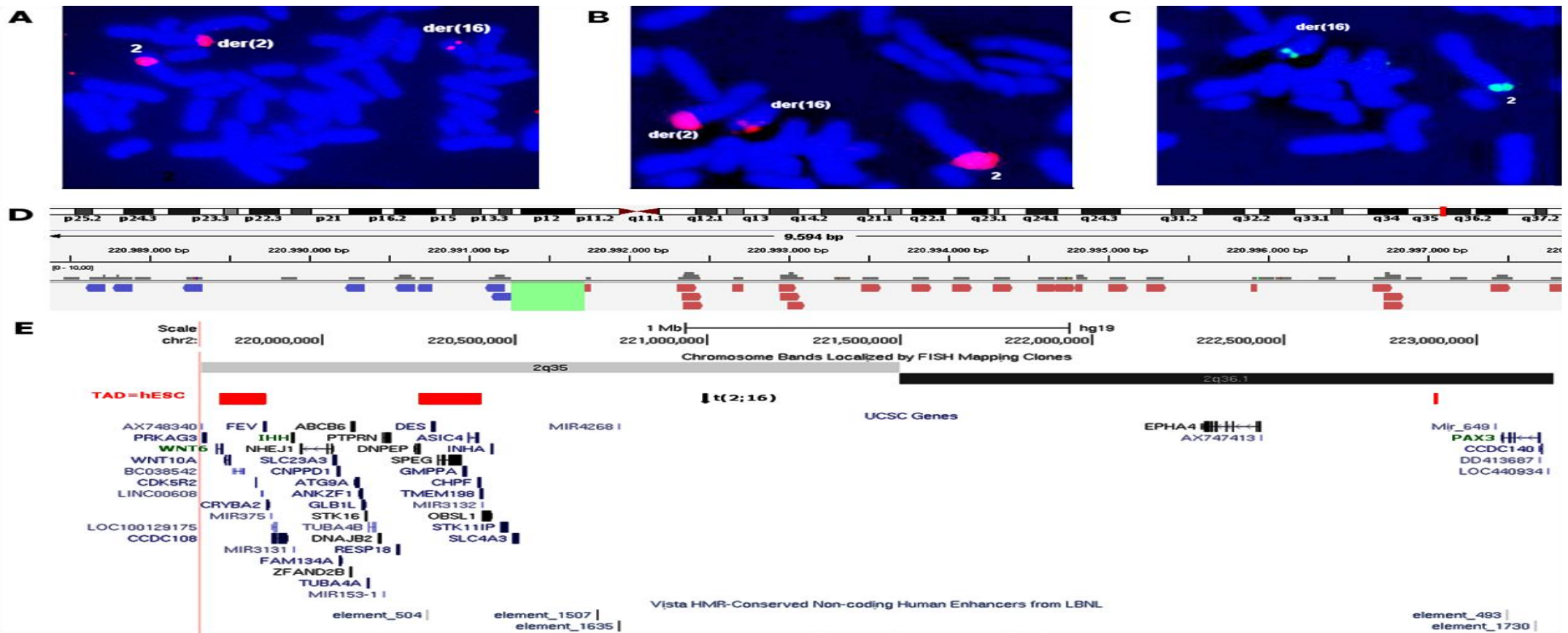


FIGURA VI.15: $t(2;16)(q35;q24.1)$ - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 2 por FISH e MPS e genes localizados próximos a quebra: A - C. Híbridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-265P15, RP11-558I16 e RP11-36A24. Os sinais de hibridação dos clones **A, RP11-265P15 e **B**, RP11-558I16 foram visualizados nos cromossomos der(16) e der(2), indicando que o ponto de quebra está contido na sequência comum aos dois clones. **C**. O sinal de hibridação do clone RP11-36A24 foi visualizado no cromossomo der(16). O ponto de quebra situa-se no segmento de 41 kb que contém os clones RP11-265P15 e RP11-558I16, delimitado pela porção do clone RP11-36A24 que não se sobrepõe aos clones RP11-265P15 e RP11-558I16. **D**. Após alinhamento dos dados de MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes mapeadas em 2q35 cujo par localiza-se em 16q24.1, confirmando a translocação $t(2;16)$. As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 101 pb, que contém o ponto de quebra (em verde), foi delimitado pelas *reads* que foram mapeadas em fitas diferentes do DNA. **E**. O mapa do segmento 2q35 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu um segmento sem genes, entre os genes *SLC4A3* e *EPHA4* (UCSC genes). As fronteiras do domínio topológico, no qual a quebra ocorreu, são mostradas em vermelho. Os genes *WNT6*, *IHH* e *PAX3*, localizados nos domínios vizinhos, estão evidenciados em verde. Ness segmento sem genes, estão localizados dois elementos com atividade de *enhancers* -*element* 1507 e *element* 1635 -, que induziram a expressão do gene repórter no mesênquima dos membros e da face em embriões de camundongos. (Vista Enhancer Browser). São candidatos a controlar a expressão do gene *EPHA4*. Esses elementos permaneceram no cromossomo der(2).**

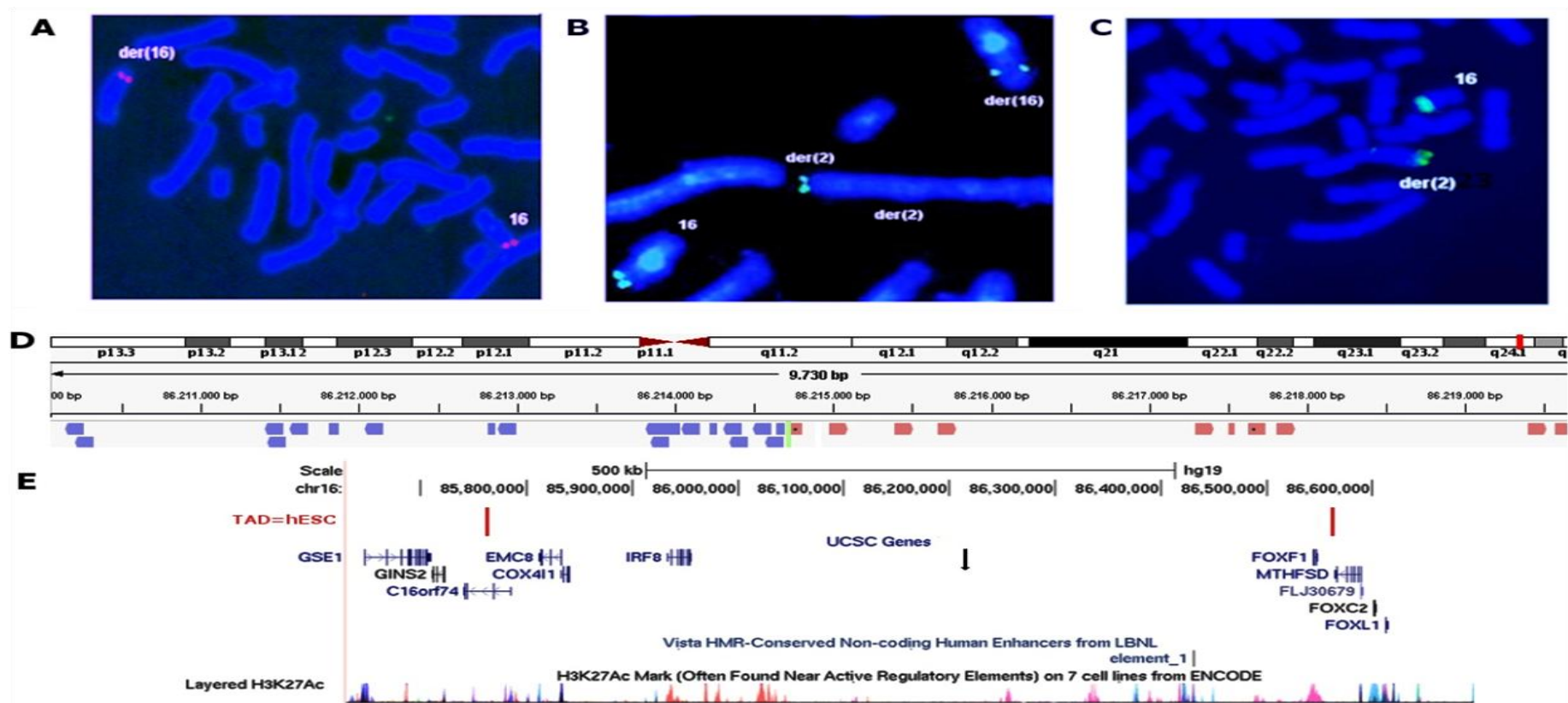


FIGURA VI.15: t(2;16)(q35;q24.1) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 2 por FISH e MPS e genes localizados próximos a quebra: A - C. Hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-265P15, RP11-558I16 e RP11-36A24. Os sinais de hibridação dos clones **A.** RP11-265P15 e **B.** RP11-558I16 foram visualizados nos cromossomos der(16) e der(2), indicando que o ponto de quebra está contido na sequência comum aos dois clones. **C.** O sinal de hibridação do clone RP11-36A24 foi visualizado no cromossomo der(16). O ponto de quebra situa-se no segmento de 41 kb que contém os clones RP11-265P15 e RP11-558I16, delimitado pela porção do clone RP11-36A24 que não se sobrepõe aos clones RP11-265P15 e RP11-558I16. **D.** Após alinhamento dos dados de MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes mapeadas em 2q35 cujo par localiza-se em 16q24.1, confirmando a translocação t(2;16). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. O segmento de 101 pb, que contém o ponto de quebra (em verde), foi delimitado pelas *reads* que foram mapeadas em fitas diferentes do DNA. **E.** O mapa do segmento 2q35 mostra que a quebra (indicada pela seta) interrompeu um segmento sem genes, entre os genes *SLC4A3* e *EPHA4* (UCSC genes). As fronteiras do domínio topológico, no qual a quebra ocorreu, são mostradas em vermelho. Os genes *WNT6*, *IHH* e *PAX3*, localizados nos domínios vizinhos, estão evidenciados em verde. Ness segmento sem genes, estão localizados dois elementos com atividade de *enhancers* -*element 1507* e *element 1635* -, que induziram a expressão do gene repórter no mesênquima dos membros e da face em embriões de camundongos. (Vista Enhancer Browser). São candidatos a controlar a expressão do gene *EPHA4*. Esses elementos permaneceram no cromossomo der(2).

no mesmo domínio da quebra da t(2;16), indicando que elementos reguladores que controlam a expressão do *EPHAD4* podem ser responsáveis pela alteração de membros em humanos. Em camundongo, o gene *Ephad4* é expresso durante o desenvolvimento dos membros e é necessário para a inervação deles, mas sua inativação não causa alteração esquelética de membros (Helmbacher et al., 2000). Lupiáñez et al (2015) também observaram que as novas interações dos genes *IHH/PAX3/WTN6* em camundongos e fibroblastos de pacientes ocorreram preferencialmente em um segmento de 200 kb localizado na região mais proximal do domínio do gene *EPHAD4*, onde identificaram vários elementos reguladores potenciais, incluindo os enhancers hs1507 e hs1635 já descritos no banco de dados VISTA (Visel et al., 2007) (Figura VI.15). Assim, concluiu-se que rearranjos cromossômicos que alteram as fronteiras do domínio topológico do gene *EPHAD4* causaram alterações de membros, por permitirem a interação dos genes *IHH*, *PAX3*, ou *WTN6* com elementos reguladores localizados no domínio do *EPHAD4*, que provavelmente controlam sua expressão. Na t(2;16), os genes *IHH* e *WTN6* supostamente não interagem com o domínio do *EPHAD4*, pois a fronteira proximal do domínio no qual o *EPHAD4* está localizado não foi alterada impedindo, portanto, a interação do *IHH* ou *WTN6* com o domínio vizinho (Figura VI.15). Apesar de translocada, a fronteira do domínio distal do *EPHAD4* não alterou sua posição em cis em relação ao *PAX3*, e como consequência, não ocorre interação entre esse gene e o domínio vizinho. Assim é provável que o fenótipo da portadora da t(2;16) não esteja associada a alteração da região reguladora dos genes *IHH/PAX3/WT6*, uma vez que as fronteira dos domínios do *EPHAD4* no qual a quebra da t(2;16) ocorreu impediriam a interação ectópica desses genes com o domínio. Por outro lado, não avaliamos as possíveis interações de cromatina ectópicas resultantes dessa translocação. Apesar de a maioria das interações genes-elementos reguladores ocorrerem nos domínios topológicos, há evidências de interações que ocorrem a distâncias maiores. O estudo de uma translocação familiar, segregando com encurtamento de dedos dos pés e mãos, revelou que o fenótipo resultou da separação do gene *PTHLH* de um enhancer localizado a 24 Mb de distância (Maas et al., 2012). A quebra dessa translocação ocorreu 145 kb *downstream* ao *PTHLH*. O elemento regulador distante codifica um lncRNAs (DA125942) que interage com o *PTHLH* em cis e o *SOX9* em trans, ambos genes essenciais para o desenvolvimento dos dígitos. A translocação separou o DA125942 e o *PTHLH*, causando alteração na expressão do gene e o fenótipo nos portadores da translocação. Esses dados indicam que mesmo genes localizados em

outros domínios topológicos podem ter sido afetados pela t(2;16) e, assim, não podemos afastar os genes *WTN6*, *PAX3* e *IHH* como candidatos. A inativação do *EPHAD4* não causa alteração de membros, sendo portanto improvável que a mudança de posição do gene para o der(16) e a separação de elementos reguladores que permaneceram no der(2) possa contribuir para o fenótipo da portadora da t(2;16).

A região de 200 kb candidata a conter enhancers que atuam nos membros em desenvolvimento, incluindo os enhancers hs1507 e hs1635 (Visel et al., 2007; Lupiáñez et al., 2015), permaneceu no der(2), podendo afetar a expressão de genes translocados do cromossomo 16. Considerando as fronteiras do domínio topológico do cromossomo 16 no qual a quebra ocorreu, apenas o gene *FOXF1* (*forkhead box F1*) e o *RNA FENDRR* (*FOXF1 adjacent non-coding developmental regulatory RNA*) poderiam tido sua expressão alterada, em virtude da mudança de posição para o der(2) (Figura VI.16). Alterações no gene *FOXF1* estão associados a displasia capilar alveolar (MIM, 265380). O fenótipo da portadora da t(2;16) não se enquadra no quadro clínico dessa doença e, portanto, o gene *FOXF1* não parece contribuir para o fenótipo. Uma inversão com ponto de quebra 135 kb 5' ao *FOXF1* e, portanto, distal à quebra da t(2;16) causou displasia capilar alveolar em seu portador (Parries et al., 2013). A ausência de sinais da doença em nossa paciente demonstra que a translocação t(2;16) não afetou a regulação desse gene. Além do *FOXF1* e do *FENDRR* um *enhancer*, hs1 (chr16:86,430,087-86,430,726; hg 19; VISTA Enhancer Browser), que induziu a expressão do gene repórter em membros, nervo craniano, rombencéfalo e tubo neural, em embriões de camundongo, também foi translocado para o der(2). Entretanto, não há genes do cromossomo 2 cuja proximidade com esse elemento regulador poderia relacioná-los com a alteração de membros. No cromossomo 16, os genes *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*), *EMC8* (*ER Membrane protein complex subunit 8*) e *COX4I1* (*cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1*), que permaneceram no der(16), poderiam ter sua regulação alterada por estarem localizados no mesmo domínio da quebra. O gene *IRF6* causa imunodeficiência, sendo improvável que esteja contribuindo para o fenótipo. Também não há evidências de que os genes *EMC8* e *COX4I1* possam afetar a estrutura de membros.

Apesar de a quebra no cromossomo 2 da t(2;16) ter ocorrido em um domínio topológico associado ao desenvolvimento de membros e estar próxima a genes que causam malformações de membros causadas por alteração de região reguladora (*IHH/PAX3/WT6*), a relação causal entre a translocação e o fenótipo permanece incerta.

Somente estudos baseados em interações de cromatina poderiam determinar se a t(2;16) afetou a expressão do(s) gene(s) *IHH/PAX3/WT6*, apesar da manutenção das barreiras do domínio topológico que os separam.

VI.3.2 Rearranjos associados a microdeleções detectadas na análise por aCGH

- **Translocação t(6;18)(q13;q22)**

Paciente

O paciente foi encaminhado para avaliação genética, por apresentar grave retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, associado a agenesia de corpo caloso, malformação arteriovenosa no cérebro, dismorfismos craniofaciais e hipotonia oral. Seu exame cromossômico revelou uma translocação entre os braços longos dos cromossomos 6 e 18. O exame cromossômico de seus genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da translocação por FISH e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, realizamos hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabelas VI.44 e VI.45). O ponto de quebra do cromossomo 6 foi mapeado em um segmento de 762 kb em 6q13 (Figura VI.17; Tabela VI.46). O ponto de quebra do cromossomo 18 foi mapeado em um segmento de 962 kb em 18q22.3 (Figura VI.17; Tabela VI.46).

A análise por meio de aCGH detectou duas deleções no cromossomo 18 (Figura VI.19; Tabela VI. 47): uma deleção de 2,7 Mb em 18q21.1-q21.2 e outra de 375 kb em 18q21.2. As duas deleções são separadas por um segmento de cerca de 324 kb sem alteração de número de cópias. A hibridação *in situ* fluorescente dos clones mapeados na região da deleção proximal (Tabela V.45) mostrou que as perdas submicroscópicas ocorreram no braço longo do cromossomo participante da translocação, já que não foram identificados sinais de hibridação desses clones no der(18), que contém o segmento 18q21.1-q21.2, mas somente no cromossomo 18 normal. A hibridação *in situ* fluorescente do clone mapeado no segmento entre as duas deleções produziu sinal nos cromossomos 18 e der(6) (Tabela VI.45). Esses resultados indicam que o segmento

entre as duas deleções foi inserido no cromossomo 6. Assim, os resultados da análise por FISH concordam com aqueles de aCGH; não foi possível, entretanto, validar por FISH a deleção distal em 18q21.2, por não termos os clones disponíveis. Essas alterações em 18q21.1-q21.2 distam cerca de 22 Mb do segmento delimitado para o ponto de quebra da translocação no cromossomo 18.

Tabela VI. 44: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra do cromossomo 6.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-409K15	chr6:68,156,447-68,298,374	der(6)
RP1-46B1	chr6:69,381,968-69,540,171	der(6)
RP1-160B9	chr6:69,881,260-69,950,781	der(6)
RP3-375M21	chr6:70,185,934-70,302,791	der(6)
RP11-462G2	chr6:71,064,771-71,126,997	der(18)
RP11-111D8	chr6:72,100,526-72,285,575	der(18)
RP11-256L9	chr6:73,038,504-73,218,079	der(18)

Tabela VI.45: Clones utilizados no mapeamento por FISH do ponto de quebra do cromossomo 18.

Clone	Posição (hg 19; Build 37)	Sinal de hibridação
RP11-729G3	chr18:48,478,290-48,634,496	Sem sinal nos der
RP11-25O3	chr18:49,686,873-49,865,504	Sem sinal nos der
Cancer_3B11	chr18:50,398,924-50,489,089	der(6)
RP11-342G3	chr18:66,835,298-66,992,982	der(18)
RP11-484N16	chr18:67,849,822-67,850,529	der(18)
RP11-430H7	chr18:68,603,097-68,777,622	der(18)
RP11-45A1	chr18:69,739,381-69,890,645	der(6)
RP11-169F17	chr18:70,659,486-70,848,786	der(6)
RP11-25L3	chr18:71,418,720-71,604,185	der(6)
RP11-348J6	chr18:72,992,800-73,156,985	der(6)

Tabela VI.46: Resultados do mapeamento por FISH dos pontos de quebra da translocação t(6;18).

Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho kb	Genes nos pontos de quebra
chr6:70302791-71064771	761	<i>LMBRD1, COL19A1, COL9A1</i>
chr18:68777622-69739381	961	<i>LOC100505776</i>

Tabela VI. 47: t(6;18) - Deleções identificadas por aCGH e genes mapeados nos segmentos das deleções.

Banda	Localização das deleções (hg 19)	Tamanho kb	Genes mapeados nos segmentos deletados
18q21.1q21.2	chr18:47555744-50276170	2720	<i>MYO5B, CCDC11, MBD1, CXXC1, SKA1, MAPK4, MRO, ME2, ELAC1, SMAD4, MEX3C, DCC</i>
18q21.2	chr18:50600596-50976024	375	Não há

Genes afetados pelo rearranjo cromossômica

No cromossomo 6, três genes estão mapeados no segmento delimitado para o ponto de quebra (Tabela VI.46). No cromossomo 18, apenas o gene do RNA não codificador *LOC100505776*, cuja função é desconhecida, está mapeado no segmento delimitado para o ponto de quebra.

Genes afetados pelas microdeleções no cromossomo 18

Nos segmentos das microdeleções do cromossomo 18 estão mapeados 12 genes codificadores de proteína (*MYO5B, CCDC11, MBD1, CXXC1, SKA1, MAPK4, MRO, ME2, ELAC1, SMAD4, MEX3C, DCC*), um de microRNA (*MIR4320*) e um de RNA não codificador cuja função é desconhecida (*LOC100287225*) (Tabela VI.47).

A translocação t(6;18) e o quadro clínico do portador

Há um número relativamente grande de genes codificadores de proteína e de RNA não codificadores nos segmentos que contêm os pontos de quebra e incluídos nas microdeleções, tornando a correlação genótipo-fenótipo complexa. No entanto, podemos excluir os genes *LMBR1* e *COL9A1*, mapeados no ponto de quebra do cromossomo 6, como candidatos, já que mutações em homozigose nesses genes causam doenças que não se sobrepõem ao quadro clínico do portador da t(6;18). Mutações em homozigose no gene *LMBR1* causam transtorno do metabolismo da vitamina B12 (Rutsch et al; 2009). Mutações no *COL9A1* em homozigose foram associadas à múltipla displasia epifeseal do tipo 6, uma forma de condrodisplasia (Czarny-Ratajczak et al., 2001), e também à síndrome de Stickler (Van Camp et al., 2006).

Um dos genes deletados no cromossomo 18 é o *SMAD4* (*SMAD family member 4*), que codifica um fator de transdução de sinais ativado pelas vias de sinalização da *TGF-beta* e das *bone morphogenic proteins* (Shioda et al., 1998 e Davis et al., 2008). Além de ter sido associado à susceptibilidade para desenvolvimento de câncer

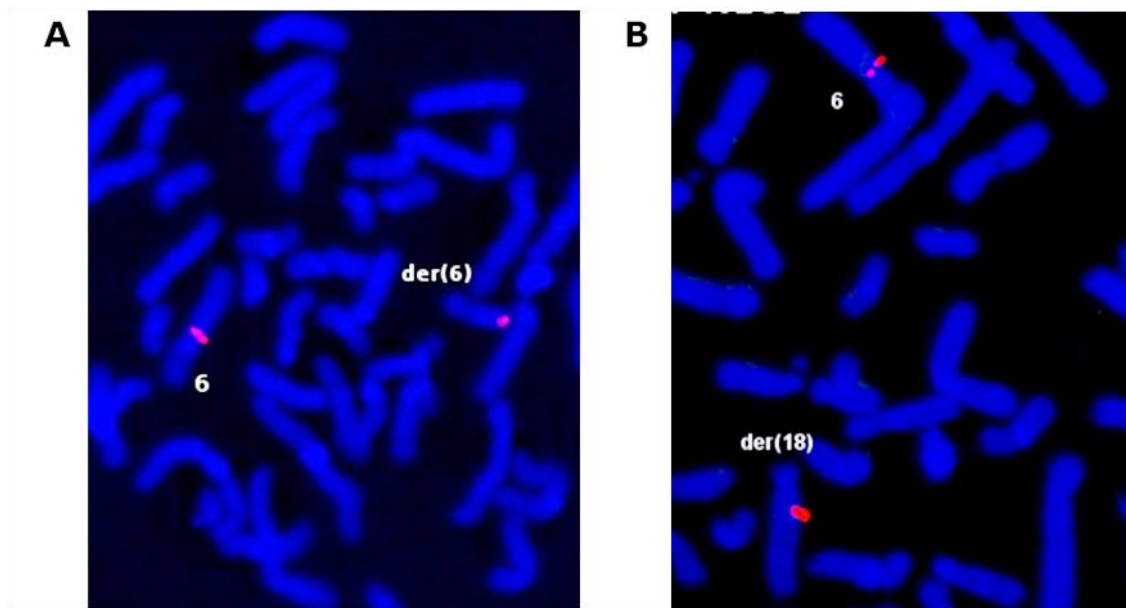


FIGURA VI.17: t(6;18)(q13;q22) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 6 por FISH: A hibridação in situ fluorescente revelou sinais de hibridação (A) do clone RP3-375M21, no cromossomo der(6) e (B) do clone RP11-462G2, no cromossomo der(18). O ponto de quebra ocorreu, portanto, no segmento de 762 kb delimitado pelos dois clones.

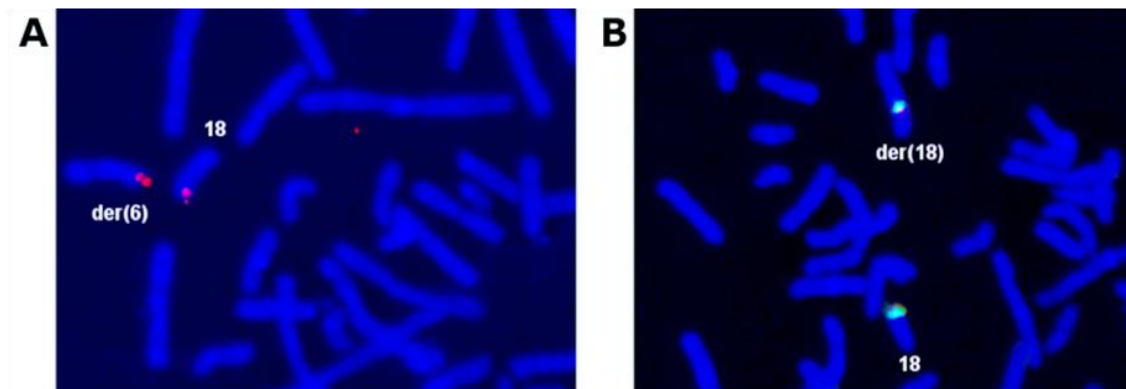


FIGURA 18: t(6;18)(q13;q22) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 18 por FISH: A hibridação in situ fluorescente revelou sinais de hibridação (A) do clone e RP11-45A1, no cromossomo der(6) e (B) do clone RP11-430H7, no cromossomo der(18). O ponto de quebra ocorreu, portanto, no segmento de 962 kb delimitado pelos dois clones.

pancreático (Schutte et al., 1996), mutações em heterozigose no gene *SMAD4* foram identificadas em pacientes com a síndrome de polipose juvenil (*juvenile polyposis syndrome*; MIM 174900) (Howe et al., 1998) e com a síndrome da telangiectasia hemorrágica hereditária (*Juvenile polyposis with hereditary hemorrhagic telangiectasia*, MIM 175050) (Gallione et al., 2004), caracterizada por displasias vasculares em vários órgãos. Estudos anteriores sugeriram que JPS e a JPS-HTT,

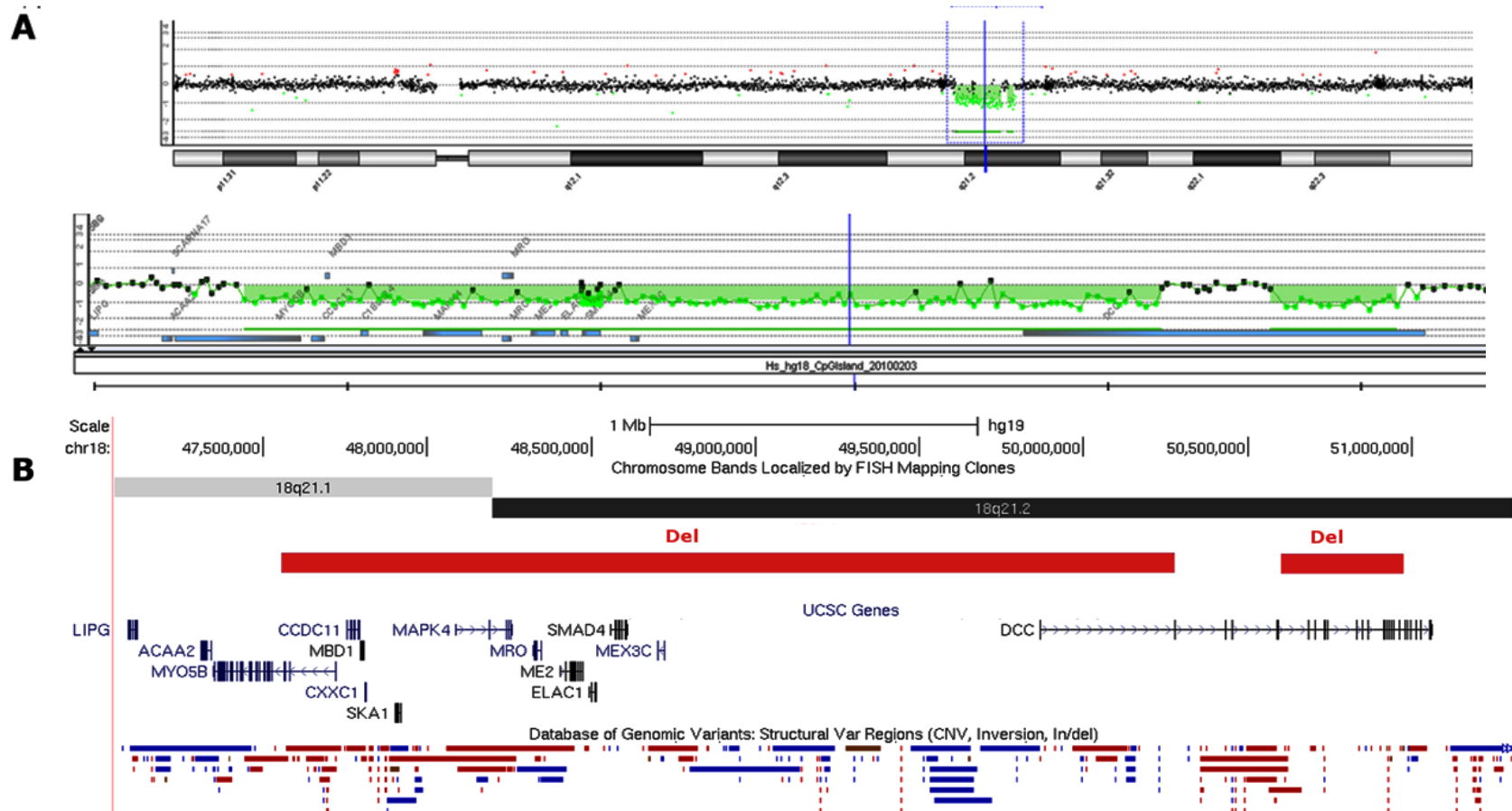


FIGURA VI.19: t(6;18)(q13;q22) - Deleções no cromossomo 18. A. aCGH (Plataforma 180K). O perfil de 18q21.1-q21.2 evidencia dois segmentos deletados separados por segmento não deletado. O perfil de 18q21.1q21.2 evidencia o segmento deletado de 3 Mb; oligonucleotídeos mapeados na região da deleção, em verde. **B.** O mapa dos segmentos de 2,7 Mb (Del em vermelho) e 375 kb (Del, em vermelho), que correspondem aos segmentos deletados, mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeados na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

estariam relacionadas, respectivamente, a mutações de perda e ganho de função do *SMAD4*. No entanto, não há correlação genótipo-fenótipo clara já que mutações idênticas foram identificadas em pacientes JP e JP-HHT (Aretz et al., 2007; Gallione et al., 2010). O paciente portador da t(6;18) tem malformação arteriovenosa no cérebro, uma das manifestações da HHT. O paciente deve ser avaliado quanto a presença de pólipos no trato gastrointestinal, característica de JPS.

Outro gene candidato, principalmente para o atraso de desenvolvimento neuropsicomotor no portador da t(6;18), é o *MBD1* (*methyl-CpG binding domain protein 1*). Apesar de esse gene ser frequentemente associado a câncer, estudos em camundongos e humanos indicam que *MBD1* pode atuar no desenvolvimento neurocognitivo. Alterações em proteínas dessa família causam doenças neurológicas, um deles o *MECP2*, mutado na síndrome de Rett. Camundongos *knockout* quanto ao *Mbd1* têm neurogênese neuro-hipocampal reduzida, dificuldade de aprendizado (Zhao et al., 2003) e comportamento autista o camundongo (Allan et al., 2008). Uma mutação no gene *MBD1* também foi detectada em paciente autista (Li et al., 2005).

O gene *DCC* (*Deleted in colorectal carcinoma*), também incluído na microdeleções do cromossomo 18, codifica um receptor de netrina 1. A netrina 1 é uma proteína secretada, que atua como direcionador quimiotrófico, orientando o crescimento axonal e também a migração celular, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Ko et al., 2012). Mutações em heterozigose foram identificadas em pacientes com a doença congênita de penetrância incompleta *Mirror movement* (*MM*; *Mirror movements, congenital*; MIM 157600) (Srour et al., 2010). *MM* refere-se ao movimento involuntário, contralateral, simultâneo e idêntico que acompanha os movimentos voluntários. Os sinais da doença iniciam-se nos primeiros anos de vida e podem desaparecer posteriormente. Os autores sugerem que a doença resultaria da perda de função do *DCC*, já que, em uma das famílias relatadas, o estudo funcional revelou que a proteína *DCC* mutada não era capaz de ligar-se a netrina 1. No paciente portador da t(6;18), que não apresenta sinais da *MM*, a região distal e proximal do gene estão incluídas nas regiões das duas microdeleções, estando o restante do gene inserido no cromossomo 6. É portador, portanto, de perda de função do gene, em heterozigose. Outra paciente portadora de deleção em 18q21.2.q21.33, que inclui toda a região codificadora do *DCC* também não apresenta sinais da doença (Kato et al., 2009), assim como outros pacientes portadores de deleções do *DCC* descritos no DECIPHER (250153, 252206 e 248721). Essas observações confirmam a penetrância incompleta da

doença, apoiada também pela ausência de sinais no camundongos *knockout Dcc* (Fazeli et al., 2002). No entanto, tanto o camundongo *knockout Dcc* e o camundongo mutante "kanga", portador de deleção espontânea em homozigose do exon 29 de gene *Dcc*, têm ausência de corpo caloso (Finger et al., 2002). A ressonância magnética revelou ausência de corpo caloso no portador da t(6;18). Um estudo em camundongos knockout quanto ao gene da netrina 1, que também apresentam ausência de corpo caloso, revelou que a deficiência da netrina 1 impede a formação das principais projeções axonais na linha média do cérebro, incluindo o corpo caloso e as comissuras hipocampais (Serafini et al., 1996). Conclui-se que a via de sinalização *netrin1-Dcc* é necessária para o desenvolvimento do corpo caloso. Outros paciente portadores de deleções do *DCC* (Kato et al., 2009; DECIPHER 250153, 252206 e 248721) não têm malformações no cérebro. Em nosso paciente, além da cópia deletada no cromossomo 18 rearranjado, o cromossomo 18 normal poderia ser portador de mutação no gene *DCC*. Assim a deleção no cromossomo 18 rearranjado, teria “desmacarado” o outro alelo mutante. O gene *DCC* está contido no ponto de quebra distal da maior deleção do cromossomo 18, enquanto que o gene *MYO5B*, está contido no ponto de quebra proximal da mesma deleção. Assim poderia ter ocorrido a formação de um gene quimérico. A proteína quimérica *MYO5B-DCC* inativaria a proteína *DCC* funcional (codificada pelo cromossomo 18 normal), ou a proteína mutada poderia ter maior afinidade pela netrin-1. O “sequestro” de netrin-1 pela proteína mutada, ou a inativação da proteína *DCC* funcional, impediria a atuação da netrin-1, resultando em um efeito similar ao observado em camundongos *knockout netrin 1 e DCC*.

- **Translocação 46,XY,t(6;7)(q12;q31)**

Paciente

O paciente foi encaminhado aos dez anos de idade para avaliação genética, por apresentar atraso do desenvolvimento neuropsicomotor associado a sinais, incluindo orelhas em abano, estrabismo, palato alto, escoliose, hipoplasia genital e pés planos. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 6 e 7, t(6;7)(q12;q31). O exame cromossômico de seus genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da translocação por MPS e aCGH

Os pontos de quebra da translocação foram mapeados por *mate-pair sequencing* (MPS) (Tabelas VI.48 e VI.49). O ponto de quebra no cromossomo 6 foi delimitado num segmento de 2824 pb em 6q12. O ponto de quebra no cromossomo 7 foi delimitado num segmento de 426 pb em 7q31.33. O sequenciamento dos segmentos de junção das quebras pelo método de Sanger revelou que a translocação causou a perda de 2649 pb e de 21 pb nos cromossomos 6 e 7, respectivamente. Também foi detectada uma inserção de 29 pb no cromossomo der(7). (Tabela VI.49)

A análise por meio de aCGH detectou uma deleção de 3,09 Mb em 6q14.3-q15 no cromossomo 6 rearranjado (Figura VI.20, Tabela VI.50). A distância entre a deleção em 6q14.3-q15 e o ponto da quebra da translocação em 6q12 é de cerca de 18 Mb. A deleção foi confirmada por MPS e seus pontos de quebra mapeados em um segmento de aproximadamente 3,14 Mb.

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Os genes *CEP162* e *C6orf163* foram interrompidos nos pontos de quebra do cromossomo 6 (Tabela VI.48). O gene do RNA não codificador LncRNA LOC101928283 foi interrompido no ponto de quebra do cromossomo 7.

Nos segmentos das microdeleções do cromossomo 6, estão mapeados 11 genes codificadores de proteínas (*CEP162*, *TBX18*, *NT5E*, *SNX14*, *SYNCRIP*, *HTR1E*, *CGA*, *ZNF292*, *C6orf162*, *GJB7*, *C6orf163*) e três de RNA não codificadores (*SNORD50A*, *B* e *SNHG5*) (Tabela VI.50).

A translocação t(6;7) e o quadro clínico do portador

Na literatura e no banco de dados DECIPHER já foram descritas microdeleções que incluem o segmento 6q14.3 deletado no paciente portador da t(6;7) (DECIPHER 863,1878,248173, 258167, 255381, 255277 e 1617; Van Esch, Wentzelet al., 2010.; Lowry et al., 2013, Wentzel et al., 2014; Quintela., et al., 2015). Baseando-se nesses casos e em outros que incluem o segmento 6q13q15 em pacientes com intelectual/atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, Becker et al. (2012) concluíram que os genes *FILIP1*, *MYO6*, *HTR1E*, *SNX14* e *HTR1B* são candidatos para comprometimento intelectual. Os genes *HTR1E* e *SNX14* estão incluídos na região da microdeleção do portador da t(6;7). Outras características comuns ao portador da t(6;7)

Tabela VI.48: Segmentos dos pontos de quebra da t(6;7) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Banda	Chr (Quebra)	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
6q12	6(1)	chr6:67598970-67601794	2824	chr6:67599069-67601717	
6q14.3	6(2)*	chr6:84907824-84911690	3866	**	<i>CEP162</i>
6q15	6(3)*	chr6:88054111-88054956	845	**	<i>C6orf163</i>
7q31.33	7(1)	chr7:124998807-124999233	426	chr7:124998970-124998990	<i>LOC101928283</i>

*Quebras que originaram deleções.

** Segmento não foi sequenciado pelo método de Sanger

Tabela VI.49: Segmentos de junção das quebras da t(6;7) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
6(1)/7(1)	6(1)	-	7(1)	+	Del6:2649 pb
7(1)/6(1)	7(1)	-	6(1)	+	Del7:21pb; ins:29pb
6(2)/6(3)	6(2)	-	6(3)	+	

Tabela VI.50: t(6;7) - Deleção identificada por aCGH e delimitada por MPS, e genes mapeados no intervalo da deleção.

Banda	Localização da deleção por aCGH (hg 19)	Tam. kb	Localização da deleção por MPS	Tam. kb	Gene
6q14.3q15	chr6:84942016-88040620	3098	Chr6:84911690-88054111	3142	<i>CEP162, TBX18, NT5E, SNX14, SYNCRIP, HTR1E, CGA, ZNF292, C6orf162, GJB7, C6orf163</i>

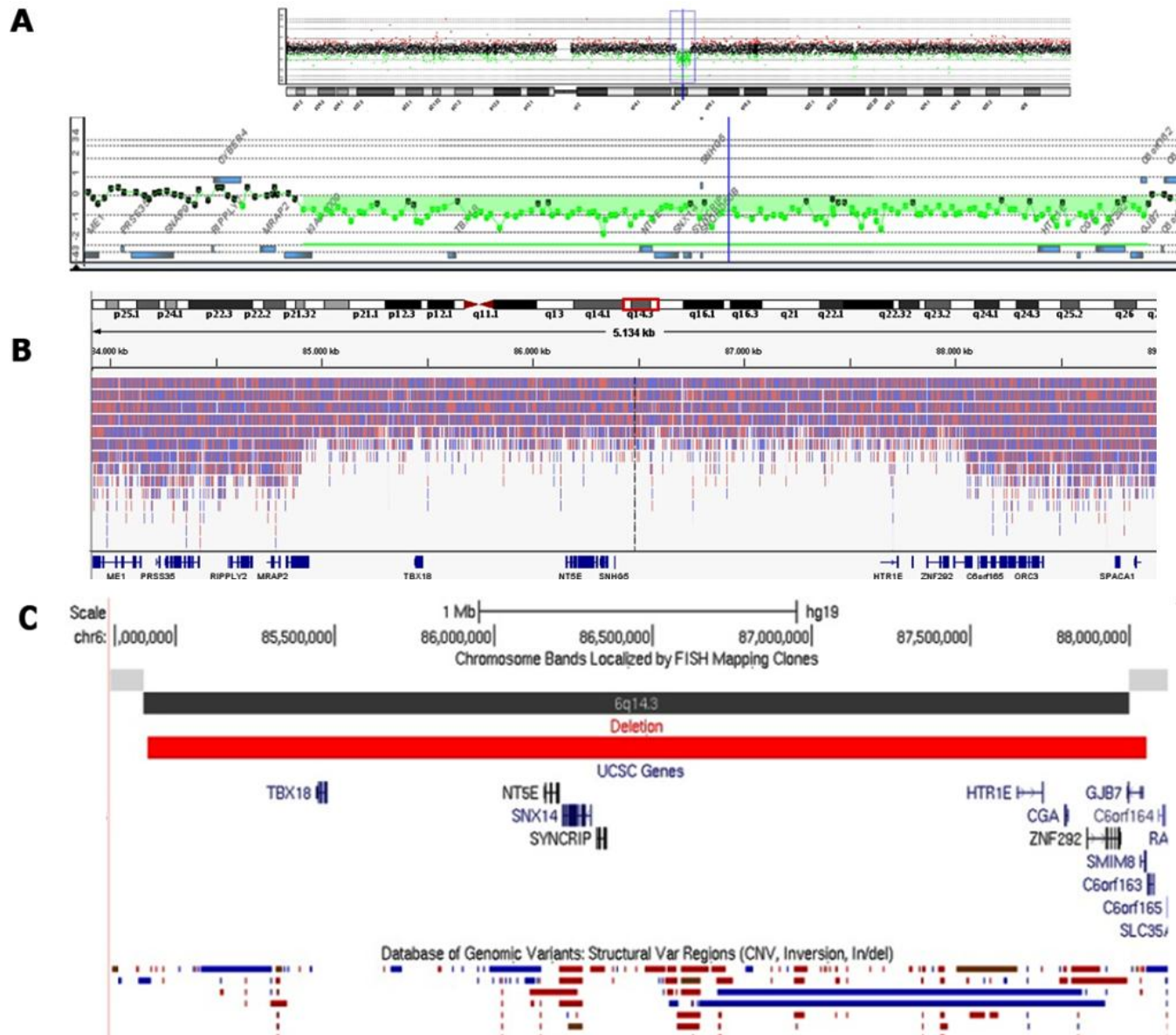


FIGURA VI.20: t(6;7)(q12;q31)-Deleção no cromossomo 6 detectada por aCGH e confirmada por MPS. A. Acima, o perfil do aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 6 evidencia segmento deletado no braço longo. Abaixo o perfil da região 6q14.3 evidencia o segmento deletado de 3 Mb (oligonucleotídeos mapeados na região da deleção são representados em verde). **B.** O perfil do IGV Browser na região 6q14.3 mostra a redução da cobertura de reads no alinhamento de paired-reads correspondentes à região da microdeleção, confirmando o resultado obtido por aCGH. **C.** O mapa do segmento que corresponde à região da deleção em 6q14.3 (em vermelho), mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

e a alguns pacientes portadores de deleções que se sobrepõem ao segmento 6q14.3 são escoliose, dismorfismos faciais e pés planos. No entanto, não há sobreposição entre os segmentos deletados nesses pacientes e essas características. Apesar de o *SNX14* ter sido considerado candidato e estar deletado em nosso paciente e em outros sete com comprometimento intelectual (Van Esch, Wentzelet al., 2010.; Lowry et al., 2013, Wentzel et al., 2014; Quintela., et al., 2015; DECIPHER 255381; DECIPHER 254057), no DGV há doze deleções descritas que incluem o gene. Recentemente mutações recessivas de perda de função no *SNX14* foram identificadas como causa de uma forma síndrome de atrofia cerebelar (Akizu et al., 2015). Os portadores em heterozigose das mutações eram clinicamente normais, outro indício que a perda de uma das cópias do gene não seja patogênica.

O gene *HTR1E* está deletado em nosso paciente, e em outros seis pacientes (Van Esch, Wentzelet al., 2010.; Wentzel et al., 2014; Quintela., et al., 2015) . Wentzel e col. sugeriram que o gene *HTR1E*, um receptor de serotonina, seria responsável pelas alterações de comportamento e ausência de saciedade alimentar observada em seu paciente. Esse gene também foi associado a déficit de atenção e hiperatividade (Lasky-Su et al. 2008; Oades et al., 2008). Não há deleções descritas no DGV que incluem esse gene. Na avaliação clínica, o portador da t(6;7) não apresentou alterações de comportamento ou em seu padrão de alimentação.

Apesar de não ter sido citado no trabalho de Becker e colaboradores (2012) o gene *SYNCRIP* (*synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein*) foi considerado em outro estudo como um forte candidato para causar doenças de neurodesenvolvimento e com alta probabilidade de ser um gene haploinsuficiente (Pinto et al., 2014). Nesse trabalho os autores descrevem uma deleção que incluiu apenas a região 3'UTR do *SYNCRIP* e a região codificadora do *SNX14*, e citam outras duas deleções que incluem apenas o *SYNCRIP* (Rauch et al., 2012; DECIPHER, 254774); as três deleções foram detectadas em pacientes com comprometimento intelectual. Há também oito pacientes com deficiência mental portadores de deleções maiores que inclui o *SYNCRIP* e vários outros genes (Van Esch, Wentzelet al., 2010.; Lowry et al., 2013;Wentzel et al., 2014, Quintela., et al., 2015; DECIPHER 255381; DECIPHER 254057). O gene *SYNCRIP* é membro da família das *heterogeneous nuclear ribonucleo proteins* (hnRNP). As hnRNP ligam-se ao RNA e regulam o *splicing* alternativo, poliadenilação e outros passos do metabolismo e do transporte do RNA mensageiro. A proteína *SYNCRIP* está associada a vários complexos

multiproteicos, que incluem os complexos *apoB RNA* e *survival of motor neurons* (SMN).

Apesar dos dados indicarem o *SYNCRIP* como principal candidato para o comprometimento intelectual do portador da t(6;7), não podemos afastar a hipótese que o quadro clínico possa resultar do efeito conjunto da perda/interrupção dos outros 12 genes afetados pelo rearranjo. Para a maioria desses genes, desconhece-se o efeito clínico de sua perda em heterozigose.

Translocação t(5;18)(q33.3;q21.1) (BCR A17)

Paciente

O paciente foi encaminhada, aos 10 anos de idade, para avaliação genética por apresentar retardo do desenvolvimento neuropsicomotor e surdez neurossensorial bilateral. Apresentava dismorfismos faciais, incluindo orelhas proeminentes, rosto triangular e fendas palpebrais estreitas. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 5 e 8, t(5;18)(q33.3;q21.1). Os pais têm cariótipos normais.

Investigação da translocação por MPS e aCGH

A análise utilizando aCGH detectou uma deleção de 2,47 Mb em 5q33.2-q33.3 (Tabela VI.53, Figura VI.21). Para compreender a complexidade do rearranjo e refinar os seus pontos de quebra, o rearranjo foi mapeado por MPS. A deleção detectada por meio de aCGH foi confirmada por MPS e sua localização refinada em um segmento de ~2.47Mb em 5q33.2-q33.3 (Tabela 51 e 52, Figura VI.21). Quatro deleções, duas em 5q33.1 (tamanho aproximado: 60 pb e 14 kb) e duas deleções em 18q12.3 (tamanhos aproximados: 60 pb) não detectados por aCGH devido ao seu tamanho também foram identificadas por MPS (Figura VI.22 e VI.23). Duas quebras não relacionadas as deleções também foram identificadas em 18q12.3. No cromossomo 5 os pontos de quebra foram delimitados em segmentos de 7,5 kb a 20 kb. No cromossomo 18 os pontos de quebra foram delimitados em segmentos de 122 pb a 19,9 kb. Um dos fragmentos de junção da translocação foi clonado por Sanger (Tabela VI.52).

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Onze genes e um Rna não codificador estão incluídos nos segmentos perdidos do cromossomo 5 em 5q33.2 - q33.3 (*LARPI*, *C5orf4*, *CNOT8*, *GEMIN5*, *MRPL22*, *KIF4B*, *SGCD*, *PPP1R2P3*, *TIMD4*, *LOC100286948*, *HAVCR1*, *HAVCR2*) (Figura VI.21, Tabela VI.53). Não há genes mapeados nas regiões das outras quatro deleções. O gene *HAVCR2* em 5q33.3 e os genes *RIT2* e *SETBP1* 18q12.3 foram interrompidos (Figuras VI.22 e VI.23, Tabela VI.51).

Tabela VI.51: Segmentos dos pontos de quebra da t(5;18) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene truncado
5(1)*	5q33.1	chr5:151307474-151322589	15115	**	
5(2)*	5q33.1	chr5:151322648-151339788	17140	**	
5(3)*	5q33.1	chr5:151831516-151839104	7588	**	
5(4)*	5q33.1	chr5:151853453-151868602	15149	**	
5(5)*	5q33.2	chr5:154031715-154051805	20090	**	
5(6)*	5q33.3	chr5:156530618-156539468	8850	**	<i>HAVCR2</i>
18(1)*	18q12.3	chr18:40403086-40411904	8818	**	<i>RIT2</i>
18(2)*	18q12.3	chr18:40411963-40416788	4825	**	<i>RIT2</i>
18(3)	18q12.3	chr18:41324248-41325086	838	**	
18(4)	18q12.3	chr18:41639915-41640037	122	**	
18(5)*	18q12.3	chr18:42572791-42578779	5988	chr18:42573538-42573539	<i>SETBP1</i>
18(6)*	18q12.3	chr18:42578838-42598751	19913	**	<i>SETBP1</i>

*Quebras que originaram deleções.

** Segmento dos pontos de quebra não foram sequenciados pelo método de Sanger.

A translocação t(5;18) e o quadro clínico do portador

As análises realizadas por aCGH e MPS mostram que a translocação t(5;18) aparentemente equilibrada no nível do bandamento G, na verdade, é muito mais complexa e está associada a perdas de segmentos cromossômicos, afetando 13 genes codificadores de proteínas e um de RNA não codificador. Para a maioria desses genes, desconhece-se o efeito clínico de sua perda em heterozigose.

Em decorrência das quebras que originaram uma das deleções no cromossomo 18, o gene *SETBP1* foi truncado duas vezes (Figura VI.22 e VI.23). A interrupção foi confirmada por sequenciamento de Sanger do segmento de junção da quebra. *SETBP1* é um oncogene expresso em vários tecidos, incluindo cérebro fetal. O gene codifica uma proteína que se liga-se a proteína SET; sua função é desconhecida.

Tabela VI.52: Segmentos de junção das quebras da t(5;18) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 1	Fita	Modificação no segmento de junção
5(1)/5(5) *	5(1)	-	5(5)	-	
5(4)/18(6) *	5(4)	+	18(6)	+	
18(1)/18(4) *	18(1)	-	18(4)	+	
18(5)/18(3)	18(5)	-	18(3)	+	Não há
18(4)/5(2) *	18(4)	-	5(2)	+	
5(3)/18(2) *	5(3)	-	18(2)	+	
18(3)/5(6) *	18(3)	-	5(6)	+	

* Segmento de junção não foi sequenciado pelo método de Sanger

Tabela VI.53: t(5;18) (BCR A17) - Deleções identificadas por aCGH e caracterizadas por MPS e genes mapeados nos intervalos das deleções.

Banda	Localização das deleções por aCGH (hg 19)	Tam. (pb)	Localização das deleções por MPS (hg 19)	Tam. (pb)	Genes
5q33.1			chr5:151322589-151322648	59	Não há
5q33.1			chr5:151839104-151853453	14349	Não há
5q33.2 - q33.3	chr5:154051805-156530618	2478813	chr5:154051805-156530618	2478813	<i>LARP1</i> , <i>C5orf4</i> , <i>CNOT8</i> , <i>GEMIN5</i> , <i>MRPL22</i> , <i>KIF4B</i> , <i>SGCD</i> , <i>PPP1R2P3</i> , <i>TIMD4</i> , <i>LOC100286948</i> , <i>HAVCR1</i> , <i>HAVCR2</i>
18q12.3			chr18:40411904-40411963	59	<i>RIT2</i>
18q12.3			chr18:42578779-42578838	59	<i>SETPQ1</i>

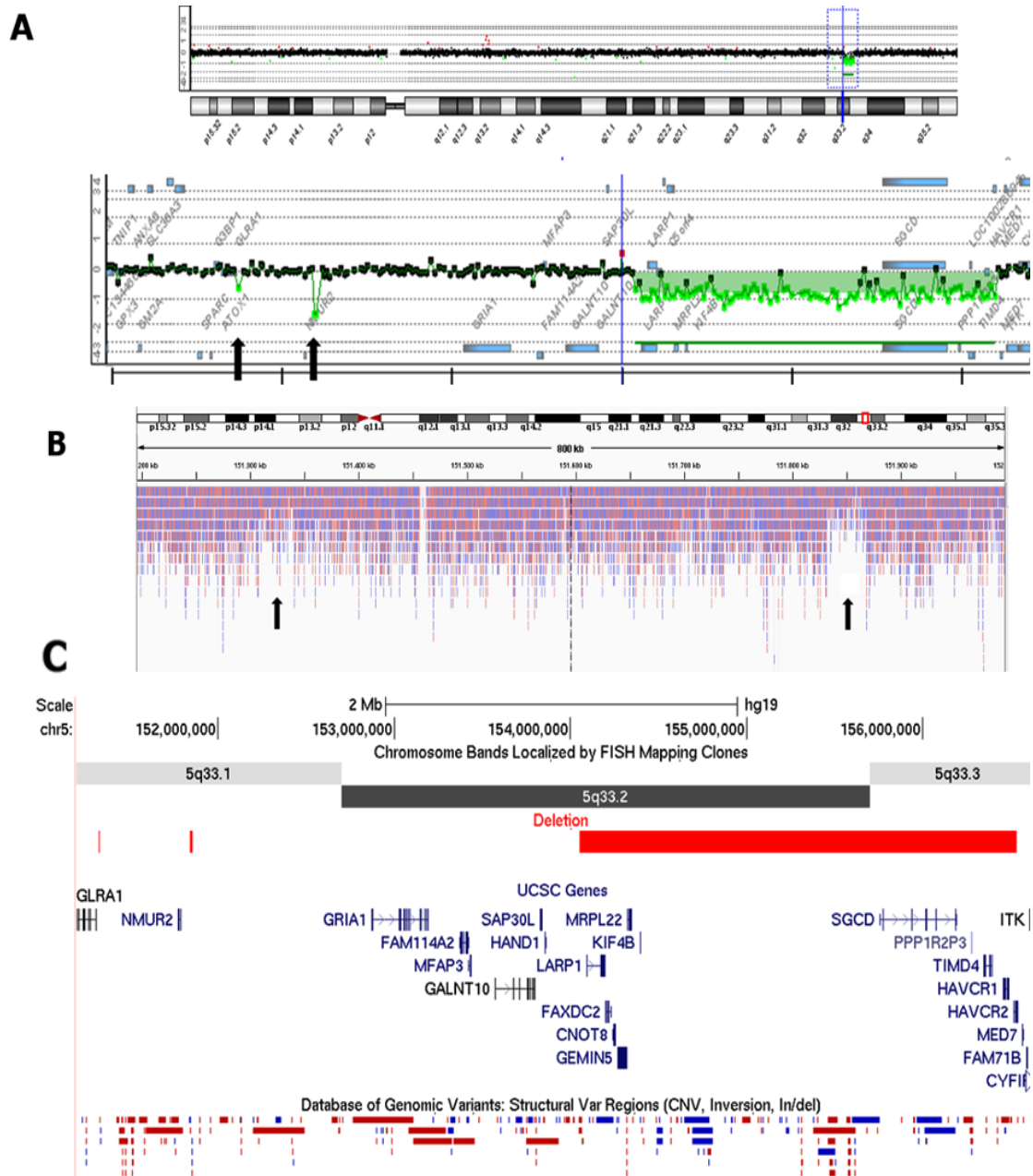


FIGURA VI.21: $t(5;18)(q33.3;q21.1)$ - Deleções no cromossomo 5 em 5q33.1-q33.31 . A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 5 evidencia segmento deletado no braço longo. O perfil da região 5q33.1-q33.31 evidencia o segmento deletado de 2,47 Mb. Oligonucleotídeos mapeados no segmento deletado, em verde. Duas deleções em 5q33.1 foram identificadas inicialmente por MPS. Devido ao seu tamanho, as deleções não incluíram três oligos consecutivos necessários para identificar regiões alteradas usando o *software* Genomic Workbench. No entanto, é possível verificar que as duas sondas mapeadas nas regiões alteradas estão marcadas em verde (seta), confirmando as deleções identificadas por MPS. B. O perfil do IGV Browser da região 5q33.1 mostra a redução da cobertura de reads no alinhamento de paired-reads correspondentes às regiões das duas pequenas microdeleções (apontada pela seta), confirmando o resultado obtido por aCGH. C. O mapa do segmento que corresponde às três deleções em 5q33.1 e 5q33.2-q33.31 (em vermelho), mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19). Após a análise de MPS e aCGH, a estrutura do der(5) pôde ser determinada. O segmento entre as duas microdeleções em 5q33.1 foi inserido no der(18) e o fragmento 5q33.31qtel, distal às três quebras no cromossomo 5, foi translocado para o der(18). O segmento entre uma das deleções em 5q33.1 e a deleção em 5q33.2-q33.31 permaneceu no der(5), mas foi rearranjado na posição invertida.

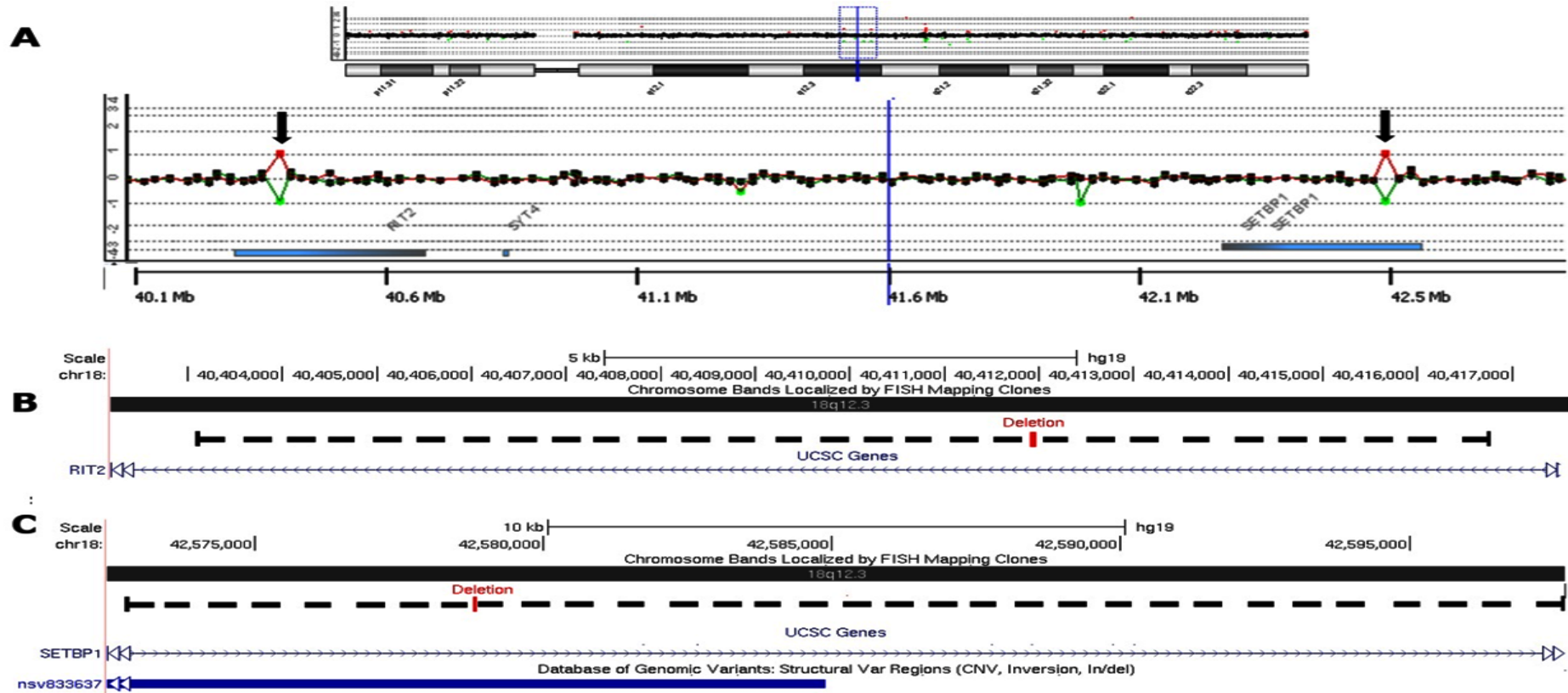


FIGURA VI.22: t(5;18)(q33.3;q21.1) - Deleções no cromossomo 18 em 18q12.3 . A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 18 evidencia deleção de segmento no braço longo. O perfil da região 18q12.3 evidencia os segmentos deletados. Oligonucleotídeos mapeados no segmento deletado, em verde e vermelho. Essas deleções foram identificadas inicialmente por MPS. Devido ao seu tamanho, as deleções não incluíram três oligos consecutivos necessários para identificar regiões alteradas, usando o software Genomic Workbench. No entanto, é possível verificar que as duas sondas mapeadas nas regiões alteradas estão marcadas em verde ou vermelho (indicadas por seta), confirmando as deleções identificadas por MPS. B-C. O mapa do segmento que corresponde às regiões das deleções em 18q12.3 (em vermelho), mostra os genes *RIT2* (B) e *SETBP1* (C) (UCSC genes) e a duplicação na região (em azul) (Database of Genomic Variants). As linhas pontilhadas representam os pontos de quebra das deleções. (Adaptado de UCSC, hg 19). Após a análise por MPS e aCGH a estrutura do der(18) pôde ser determinada. Além das duas deleções, os fragmentos resultantes das seis quebras do cromossomo 18 foram rearranjados no der(18) e o fragmento 18q12.3qtel, distal as seis quebras, foi translocado para o der(5).

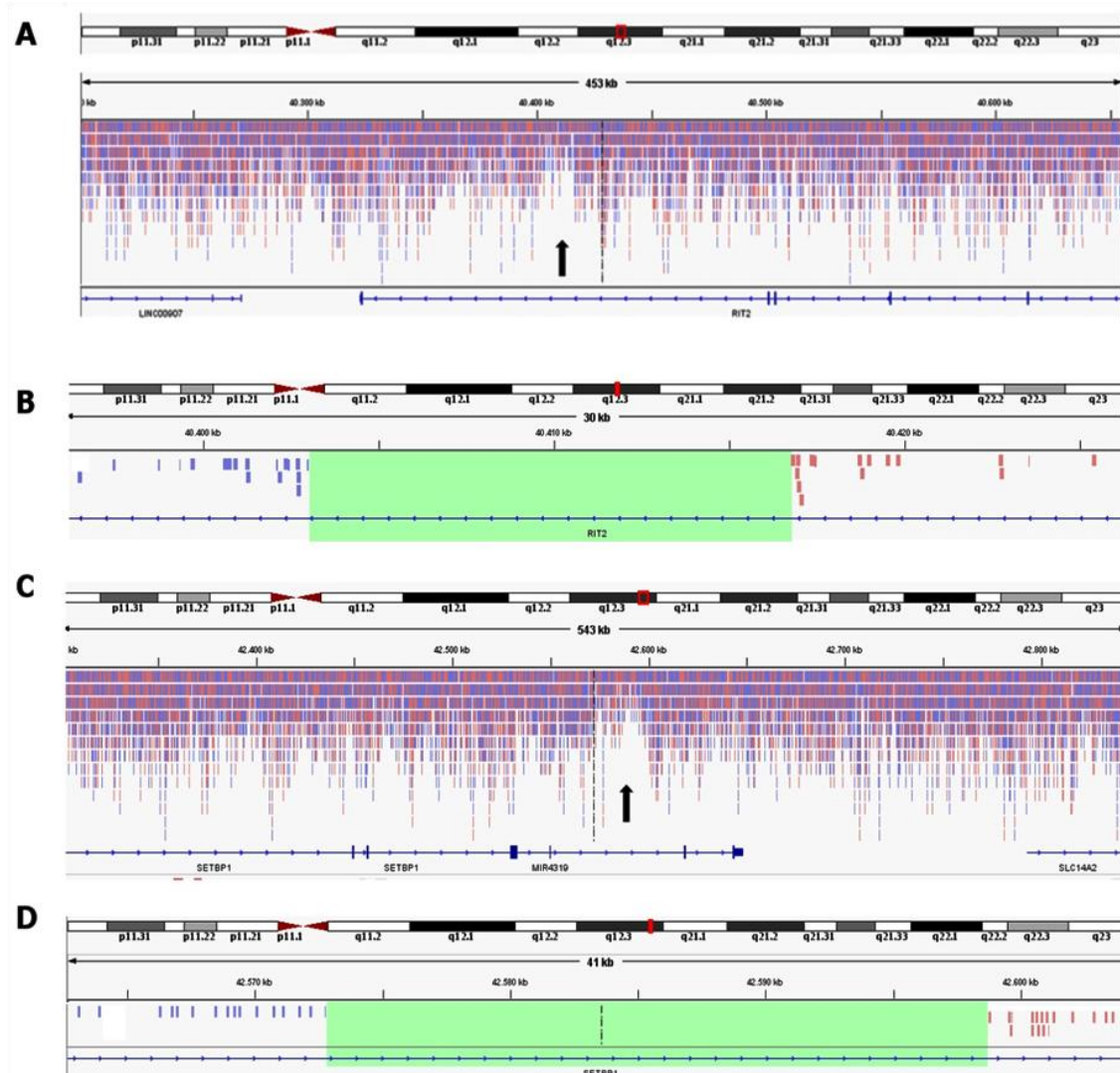


FIGURA VI.23: t(5;18)(q33.3;q21.1) - Deleções no cromossomo 18 em 18q12.3 e os genes interrompidos nas regiões das quebras. A e C. O perfil do IGV Browser na região 18q12.3 mostra a redução da cobertura de *reads* (apontada pela seta) produzida pelo alinhamento de *paired-reads* correspondentes às regiões das microdeleções (A) proximal e (C) distal, confirmando o resultado obtido por aCGH. **B e D.** O perfil do IGV Browser na região 18q12.3 mostra as *reads* discordantes que flanqueiam as regiões das deleções proximal (B) e distal (D). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. As regiões que contêm as deleções (em verde) foram determinadas pelas *reads* discordantes da t(5;18), mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *RIT2* está parcialmente contido na deleção proximal. O gene *SETBP1* está parcialmente contido na deleção distal.

Mutações no *SETBP1* causam a síndrome de Schinzel-Giedion (MIM 269150), caracterizada por deficiência intelectual grave associada a sinas faciais e múltiplas malformações congênicas (Hoischen et al., 2010). No entanto, a doença estaria associada apenas a mutações que modificam as proteínas, levando a ganho de função. A

haploinsuficiência do gene *SETBP1* está relacionada a quadro clínico mais brando, que inclui atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, déficit significativo da fala e sinais faciais característicos (MIM, 616078; Filges et al., 2011; Marseglia et al., 2012; Rauch et al., 2012). A perda de função do gene pode, assim, ser a principal causa do quadro clínico do portador da translocação t(5;18). Esse quadro inclui também deficiência auditiva, característica que não está relacionada a alterações no gene *SETBP1*, sugerindo que outros genes afetados pelo rearranjo contribuam para o fenótipo.

- **Translocação t(1;2)(p34.3;q31) (BCR A22)**

Paciente

O paciente foi encaminhado para avaliação genética, aos 6 anos de idade, por apresentar deficiência intelectual moderada, ausência de fala e dismorfismos faciais. Sustentou a cabeça aos 10 meses de idade, após início de fisioterapia motora; sentou-se com 1 ano e 6 meses e andou aos 5 anos de idade. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço curto do cromossomo 1 e o braço longo dos cromossomos 2, t(1;2)(p34.3;q31). Os pais têm cariótipos normais.

Investigação da translocação por MPS e aCGH

A análise utilizando aCGH detectou dois segmentos deletados de 3 Mb e 811 kb, em 1p34.3 (Figura VI.24 e VI.25, Tabela VI.56). Outra deleção de 1Mb foi detectada em 2q31.1. As três deleções foram confirmadas por MPS e delimitadas em segmentos de aproximadamente 3 Mb e 833 kb em 1p34.3, e em um segmento de aproximadamente 1,1 Mb, em 2q31.1 (Tabela VI.56). Os pontos de quebra do cromossomo 1 foram delimitadas em segmentos de 470 a 11.843 pb. As duas quebras do cromossomo 2 foram delimitadas em segmentos de 992 a 5.777 pb (Tabelas VI.54 e VI.55). Os dados de MPS permitiram determinar a estrutura dos cromossomos der(1) e der(2), resultantes das seis quebras identificadas (Figuras VI.24 e VI.25).

Genes afetados pela rearranjo cromossômico

Quarenta e seis genes estão incluídos nos segmentos perdidos, 37 no cromossomo 1 e nove do cromossomo 2 (Figuras VI.24 e VI.25, Tabela VI.56). O gene *C1orf94* (*chromosome 1 open reading frame 94*) em 1p34.3 e os genes *SLC25A12*

[*Solute Carrier Family 25 (Aspartate/Glutamate Carrier), Member 12*], *RAPGEF4* [*Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 4*] em 2q31.1 foram interrompidos nos pontos de quebras (Tabela VI.54)

A translocação t(1;2) e o quadro clínico do portador

As análises realizadas mostram que a translocação aparentemente equilibrada no nível do bandamento G, na verdade, é muito mais complexa e está associada a perdas de segmentos cromossômicos, afetando 47 genes. O quadro clínico do portador do rearranjo pode, portanto, resultar da perda de gene(s) localizado(s) nesses segmentos. Uma deleção de 2,6 Mb de um segmento do braço curto do cromossomo 1, que está incluído na deleção mais distal do cromossomo 1 da t(1;2) foi identificada em uma menina que apresentava atraso do desenvolvimento neuromotor, tendo também déficit significativo da fala (Takenouchi et al., 2014). O gene *GRIK3* (*glutamate receptor, ionotropic, kainate 3*) foi considerado candidato para o quadro clínico. O gene codifica uma subunidade do receptor kainate/AMPA, que é altamente expresso no sistema nervoso central, sendo fundamental para a plasticidade sináptica (Bortolotto et al., 1999; Schmitz et al., 2001). O gene *GRIK3* já foi associado a esquizofrenia (DeLisi et al., 2002) e autismo (Luo et al., 2012). Dentre os cinco genes da família GRIK, haploinsuficiência de *GRIK1* (Haldeman-Englert et al., 2010), *GRIK2* (Motazacker et al., 2007) e *GRIK4* (Pickard et al., 2006) causam atraso de desenvolvimento ou comprometimento intelectual. No DVG há apenas uma deleção que incluem exons do gene (nssv712329). O gene *GRIK3* é, portanto, candidato para contribuir para o quadro clínico do portador da t(1;2). Dois outros genes localizados nos segmentos deletados, tanto na menina descrita por Takenouchi e col. (2013) quanto em no portador da t(1;2), causam doença: o *GJB3* (*GJB3 gap junction protein, beta 3, 31kDa*) e *COL8A2* (*collagen, type VIII, alpha 2*), relacionados, respectivamente, a deficiência auditiva e distrofia de córnea. Ambas as doenças têm manifestação após os 40 anos de idade; deve-se notar que são conhecidas nesses genes apenas mutações que modificam as proteínas, mas não deleções que levam à haploinsuficiência, não havendo produto alterado.

No cromossomo 2 o gene *SLC25A12* [*solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 12*], deletado no portador da t(1;2), é altamente expresso no sistema nervoso central. Mutações no *SLC25A12* em homozigose causam grave retardo neuropsicomotor, hipotonia e hipomielinização do sistema

Tabela VI.54: Segmentos dos pontos de quebra da t(1;2) delimitados por MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tam. pb	Gene truncado
1(1)	1p34.3	chr1:34660165-34662874	2709	<i>C1orf94</i>
1(2)	1p34.3	chr1:37705929-37707917	1988	
1(3)	1p34.3	chr1:38577151-38588994	11843	
1(4)	1p34.3	chr1:39422098-39422568	470	
2(1)	2q31.1	chr2:172670294-172671286	992	<i>SLC25A12</i>
2(2)	2q31.1	chr2:173769620-173775397	5777	<i>RAPGEF4</i>

Tabela VI.55: Segmentos de junção das quebras da t(1;2) delimitados por MPS.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita
2(2)/1(3)	2(2)	+	1(3)	-
1(2)/1(4)	1(2)	+	1(4)	+
2(1)/1(1)	2(1)	-	1(1)	-

Tabela VI.56: t(1;2) - Deleções identificadas por aCGH e delimitadas por MPS e genes mapeados nos intervalos das deleções.

Banda	Localização das deleções por aCGH (hg 19)	Tam. kb	Localização das deleções por MPS	Tam. kb	Genes
1p34.3	chr1:34686140-37703728	3017	chr1:34662874-37705929	3043	<i>GJB5, GJB4, GJB3, GJA4, C1orf212, DLGAP3, ZMYM6, ZMYM1, SFPQ, ZMYM4, KIAA0319L, NC, TFAP2E, PSMB2, C1orf216, CLSPN, EIF2C4, EIF2C1, EIF2C3, TEKT2, ADPRHL2, COL8A2, TRAPPC3, MAP7D1, THRAP3, C1orf113, FAM176B, STK40, LSM10, OSCP1, MRPS15, CSF3R, GRIK3</i>
1p34.3	chr1:38591421-39403409	812	chr1:38588994-39422098	833	<i>RRAGC, MYCPQ, GJA9, RHBDL2</i>
2q31.1	chr2:172676240-173760787	1084	chr2:172671286-173769620	1098	<i>SLC25A12, HAT1, MAP1D, DLX1, DLX2, ITGA6, PDK1, LOC91149, RAPGEF4</i>

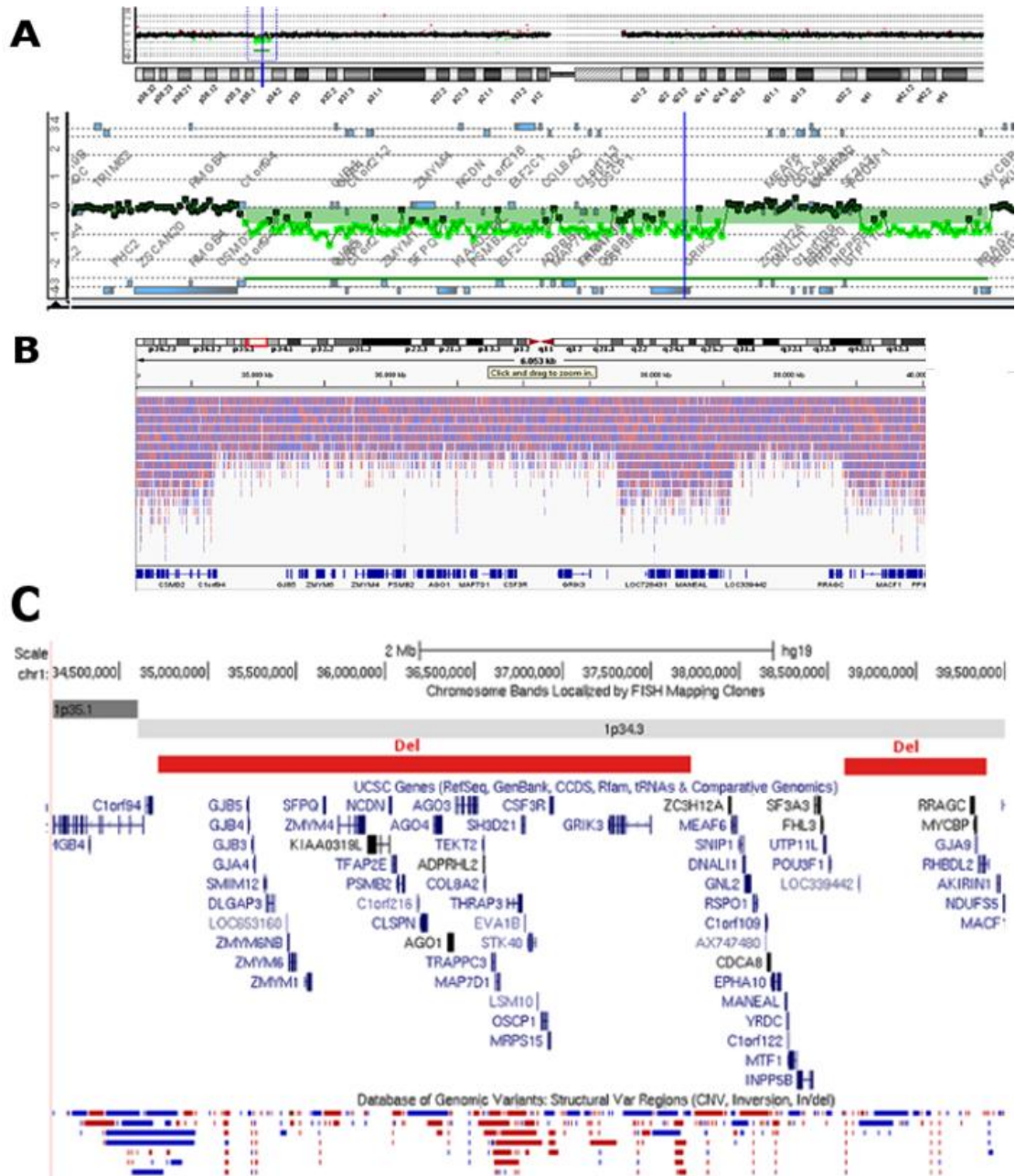


FIGURA VI.24. t(1;2)(p34.3;q31) - Deleções no cromossomo 1 em 1p34.3 . A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 1 evidencia segmentos deletados em 1p34.3. O perfil da região 1p34.3 evidencia dois segmentos deletados de 3 Mb e 811 kb. Oligonucleotídeos mapeados nas deleções, em verde. **B.** O perfil do IGV Browser na região 1p14.3 mostra a redução da cobertura de *reads* produzida pelo alinhamento de *paired-reads* correspondentes às regiões das microdeleções, confirmando o resultado obtido por aCGH. **C.** O mapa do segmento que corresponde à região das deleções em 1p34.3 (em vermelho) mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV), mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). O segmento entre as duas deleções permaneceu no der(1), porém em posição invertida. O segmento do braço curto do cromossomo 1, distal às duas deleções foi translocado para o braço longo do cromossomo 2. (Adaptado de UCSC, hg 19).

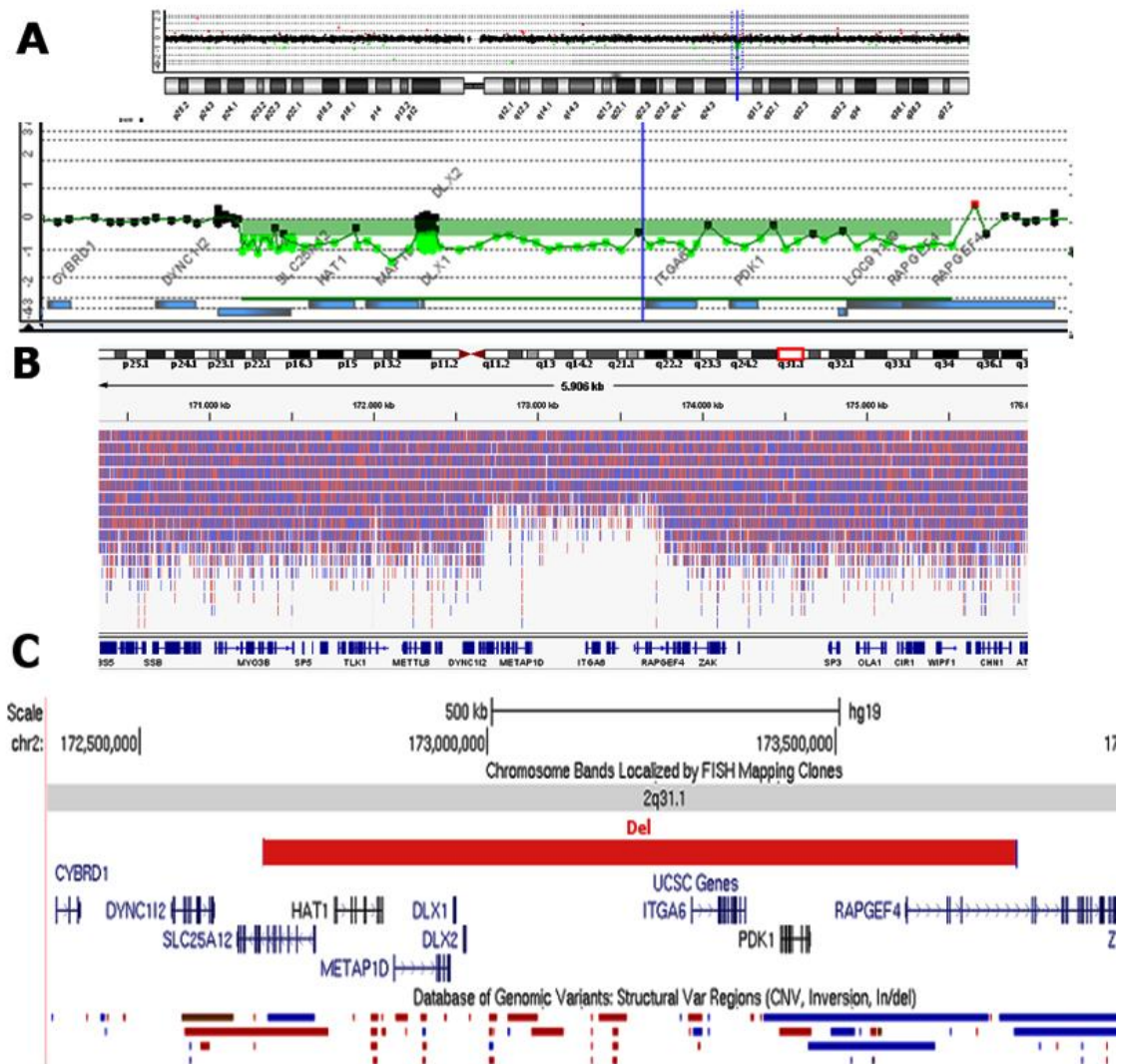


FIGURA VI.25. t(1;2)(p34.3;q31) - Deleção no cromossomo 2 em 2q31.1 A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 2 evidencia segmento deletado em 2q31.1. O perfil da região 2q31.1 evidencia o segmento deletado de 1 Mb. Oligonucleotídeos mapeados nos segmentos das deleções, em verde). B. O perfil do IGV Browser da região 2q31.1 mostra a redução da cobertura de *reads* produzida pelo alinhamento de *paired-reads* correspondentes às regiões de microdeleções, confirmando o resultado obtido por aCGH. C. O mapa do segmento que corresponde à deleção em 2q31.1 (em vermelho) mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). O segmento do braço longo do cromossomo 2 distal à deleção foi translocado para o braço curto do cromossomo 1.

nervoso central (Wibom et al., 2009). No entanto, apenas mutações recessivas causam doença. A perda de uma das cópias do *SLC25A12*, como detectado no portador da t(1;2) não é patogênica. Os genes *DLX1* e *DLX2* também estão mapeados no segmento da deleção em 2q31.1. Ambos os genes estão frequentemente deletados em pacientes portadores da síndrome da microdeleção em 2q31.1, caracterizada por anomalias de membros e que também pode estar associadas a atraso de desenvolvimento, dismorfismos faciais leves, escoliose e retardo de crescimento. Apesar de a perda de função dos genes *DLX1* e *DLX2* ter sido descartada como causa de malformações de membros, sua haplonsuficiência foi sugerida como a causa de alterações neurológicas e dismorfismos crâniofaciais nos portadores da síndrome (Mitter et al., 2010; Theisen et al., 2010).

Apesar de os dados indicarem o *GRIK3* como principal candidato para o comprometimento intelectual do portador da t(1;2), deve ser considerada a possibilidade do efeito conjunto sobre o fenótipo da perda/interrupção de outros genes afetados pelo rearranjo. Para a maioria desses genes, desconhece-se o efeito clínico de sua perda em heterozigose.

- **Translocação t(10;21)(p13;q22)**

Paciente

A paciente foi encaminhada aos quatro meses para avaliação genética por apresentar atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, microcefalia, hipertonia espástica moderada dos quatro membros, predominante nos inferiores, associada a hiperreflexia osteotendinosa. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço curto do cromossomo 10 e o braço longo do cromossomo 21, t(10;21)(p13;q22). O exame cromossômico de seus genitores revelou cariótipos normais.

Investigação da translocação por MPS e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, em nosso mestrado foi realizada a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabela VI.57). A análise por aCGH também realizada nessa ocasião, detectou quatro deleções no cromossomo 10 rearranjado, duas delas próximas ao ponto

de quebra: uma deleção de 973 kb em 10p14 e uma deleção de 1,15 Mb em 10p13 (Figuras VI.26 e VI.27, Tabela VI.60). Outras duas deleções no cromossomo 10 localizavam-se distantes do ponto de quebra, no braço longo: uma deleção de 700 kb em 10q26.13 e uma deleção de 1,66 Mb em 10q26.2-q26.3. As deleções detectadas por meio de aCGH foram confirmadas por MPS e a localização de seus pontos de quebra, refinada (Figuras VI.26 e VI.27, Tabela VI.60). A análise por MPS revelou a maior complexidade do rearranjo, associado a 18 quebras: cinco quebras em 10p14, três em 10p13, duas em 10q25.2, cinco em 10q26.12, duas em 21q22.12 e uma quebra em 21q22.3 (Tabelas VI.58 e VI.59). Oito das 18 quebras foram identificadas apenas por

Tabela VI.57: Mapeamento dos pontos de quebra da translocação t(10;21) por FISH

Localização dos pontos de quebra mapeados por FISH (hg 19)	Tamanho (kb)	Genes nos pontos de quebra
chr10:14474313-14912604	438	<i>FAM107B, HSPA14, CF</i>
chr21:45848265-46022489	174	<i>LRRC3, KRTAP, C21orf90</i>

Tabela VI.58: Segmentos dos pontos de quebra da t(10;21) delimitados por MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Gene truncado
10(1)	10p14	chr10:9913030-9913628	598	
10(2)	10p14	chr10:10075816-10084697	8881	
10(3)	10p14	chr10:10154098-10154543	445	
10(4)*	10p14	chr10:10188630-10190896	2266	
10(5)*	10p14	chr10:11268115-11280995	12880	<i>CELF2</i>
10(6)*	10p13	chr10:12966412-12979292	12880	<i>CCDC3</i>
10(7)*	10p13	chr10:14262181-14268620	6439	<i>FRMD4A</i>
10(8)	10p13	chr10:14442452-14442555	103	<i>FRMD4A</i>
10(9)	10q25.2	chr10:112226989-112227402	413	
10(10)	10q25.2	chr10:115215579-115215746	167	
10(11)*	10q26.13	chr10:125040148-125043367	3219	
10(12)*	10q26.13	chr10:125787191-125790410	3219	<i>CHST15</i>
10(13)	10q26.13	chr10:126375360-126375571	211	<i>FAM53B</i>
10(14)*	10q26.2	chr10:129730774-129737213	6439	<i>PTPRE</i>
10(15)*	10q26.3	chr10:131406114-131407264	1150	<i>MGMT</i>
21(1)	21q22.12	chr21:36863869-36864832	963	<i>RUNX1</i>
21(2)	21q22.12	chr21:36945695-36945975	280	<i>RUNX1</i>
21(3)	21q22.3	chr21:45914485-45914684	199	

*Pontos de quebras associados a deleções

MPS. Todos os pontos de quebra tiveram sua localização refinada, em segmentos de 199 a 12.880 pb. Os dados de MPS permitiram determinar a estrutura dos cromossomos derivativos der(10) e der(21) (Figura VI.29).

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Quatorze genes estão mapeados nos segmentos das microdeleções: um gene em 10p14 (*CUGBP2*), oito genes em 10p13 (*OPTN*, *MCM10*, *C10orf49*, *PHYH*, *SEPHS1*, *BEND7*, *PRPF18* e *FMRD4A*), dois genes em 10q26.13 (*GPR26* e *CPXM2*) e três genes em 10q26.2-q26.3 (*PTPRE*, *MKI67* e *MGMT*) (Figuras VI.26 e VI.27, Tabela VI.60). Sete genes foram interrompidos nos pontos de quebra do cromossomo 10 (*CELF2*, *CCDC3*, *FRMD4A*, *CHST15*, *FAM53B*, *PTPRE* e *MGMT*) (Tabela VI.58). O gene *RUNXI* foi interrompido no ponto de quebra do cromossomo 21. Devido à proximidade das quebras associadas a esse rearranjo, os genes *FRMD4A* e *RUNXI* foram interrompidos em duas regiões diferentes.

Relação da alteração cromossômica com o quadro clínico

Há um número relativamente grande de genes nos segmentos que contêm os pontos de quebra e incluídos nas microdeleções, tornando a correlação genótipo-fenótipo complexa. Apesar de não ser possível individualizar candidatos funcionais entre os genes deletados ou que possam ter sido interrompidos pelos pontos de quebra, genes altamente expressos no sistema nervoso são os principais candidatos a contribuir para o quadro clínico da paciente. Localizados nos segmentos das microdeleções, cinco genes são altamente expressos no sistema nervoso (*GPR26*, *OPTN*, *CELF2*, *PHYH* e *PTPRE*). Esses genes podem ser considerados candidatos a contribuir para o quadro clínico. De acordo com o *Database of Genomic Variants*, as regiões nas quais as alterações foram mapeadas contêm poucas variações de números de cópias (Figuras VI.26 e VI.27).

Mutações em homozigose no gene *PHYH* (*phytanoyl-CoA 2-hydroxylase*) foram identificadas em associação com a doença de Refsum, que é um erro inato do metabolismo. Mutações em homozigose no gene *OPTN* (*optineurin*) causam esclerose lateral amiotrófica (Maruyama et al., 2010). A perda de função dos genes *PHYH* e *OPTN* em heterozigose ocorre em indivíduos clinicamente normais.

O gene *GPR26* (*G protein-coupled receptor 26*) é altamente expresso no cérebro adulto de camundongos e humanos (Boulay et al., 2009). *GPR26* codifica uma proteína

Tabela VI.59: Segmentos de junção das quebras da t(10;21) delimitados por MPS.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita
21(3)/10(3)	21(3)	+	10(3)	+
10(4)/10(2)	10(4)	+	10(2)	+
10(1)/10(8)	10(1)	+	10(8)	+
10(9)/10(10)	10(9)	-	10(10)	+
10(11)/10(12)	10(11)	-	10(12)	+
10(13)/10(14)	10(13)	-	10(14)	-
10(13)/10(9)	10(13)	+	10(9)	+
10(10)/10(15)	10(10)	-	10(15)	+
21(1)/21(3)	21(1)	-	21(3)	-
21(2)/21(1)	21(2)	+	21(1)	+
21(2)/10(8)	21(2)	-	10(8)	-
10(7)/10(6)	10(7)	+	10(6)	-
10(5)/10(2)	10(5)	+	10(2)	+
10(3)/10(1)	10(3)	-	10(1)	-

Tabela VI.60. t(10;21) - Deleções identificadas por aCGH e caracterizadas por MPS e genes mapeados nos intervalos das deleções.

Banda	Localização das deleções por aCGH (hg 19)	Tam. kb	Localização das deleções por MPS	Tam. pb	Genes
10p14	chr10:10221542-11194881	973	chr10:10190896-11268115	1077	<i>CUGPQ2, LINC00710, LOC101928322, SFTA1P</i>
10p13	chr10:13107142-14257936	1150	chr10:12979292-14262181	1282	<i>OPTN, MCM10, C10orf49, PHYH, SEPHS1, BFIM7, PRPF18, FMRD4A</i>
10q26.2	chr10:125067151-125767527	700	chr10:125043367-125787191	743	<i>GPR26, CPXM2, CHST15</i>
10q26.2q26.3	chr10:129741203-131399691	1658	chr10:129737213-131406114	1668	<i>PTPRE, MKI67, MGMT</i>

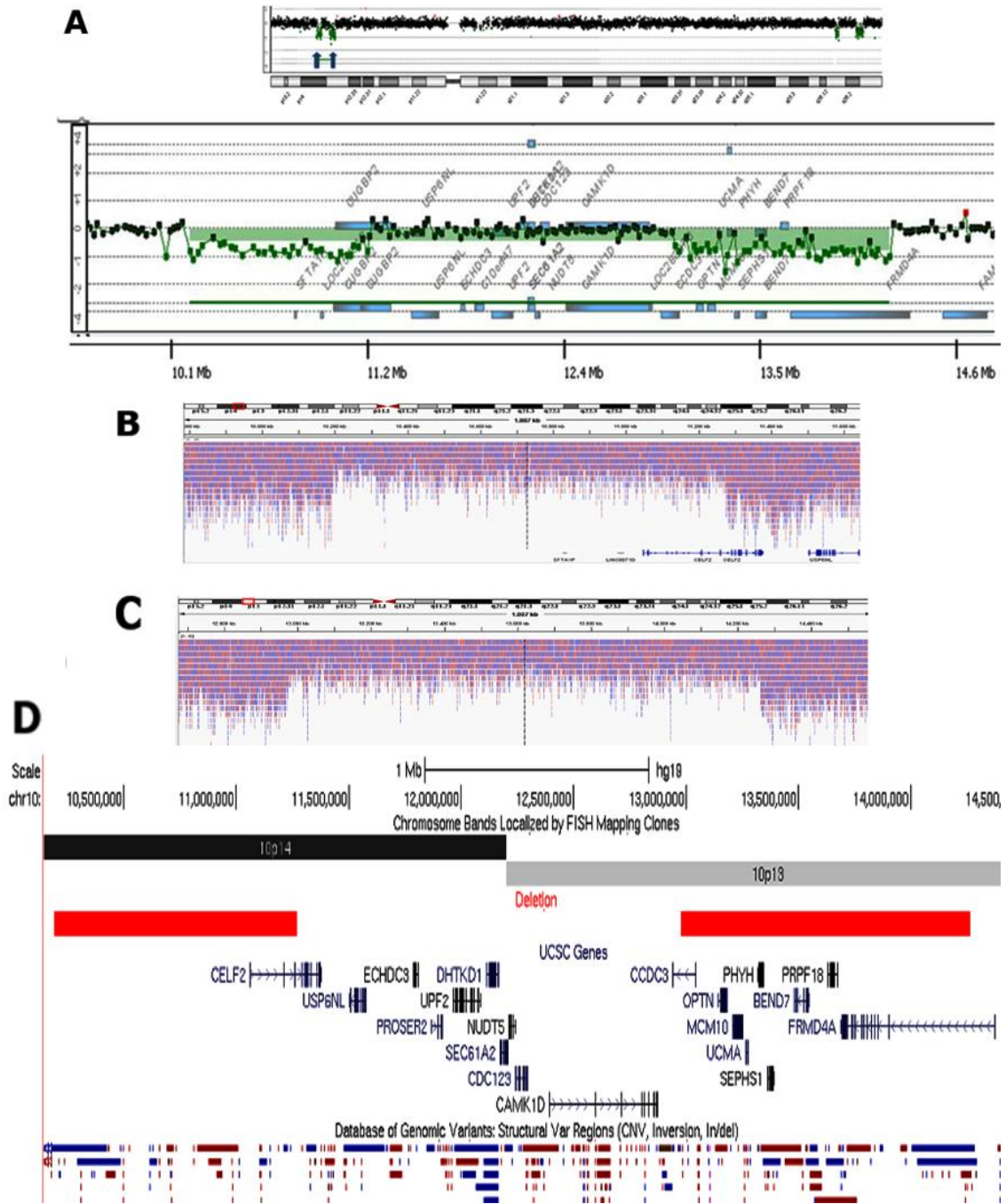


FIGURA VI.26: t(10;21)(p13;q22) - Deleção no braço curto do cromossomo 10 detectada por aCGH e confirmada por MPS: **A.** O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 10 evidencia dois segmentos deletados no braço curto (indicados pelas setas). O perfil de 10p14 e 10p13 evidencia, respectivamente, o segmento deletado de 973 kb e 1,15Mb. Oligonucleotídeos mapeados na região da deleção, em verde). **B e C.** Os perfis do IGV Browser de 10p14 (**B**) e 10p13 (**C**) mostram a redução da cobertura de *reads* produzida pelo alinhamento de *paired-reads* correspondentes às regiões das microdeleções, confirmando o resultado obtido por aCGH. **D.** O mapa dos segmentos que correspondem às deleções em 10p13 e 10p14 (em vermelho), mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19)

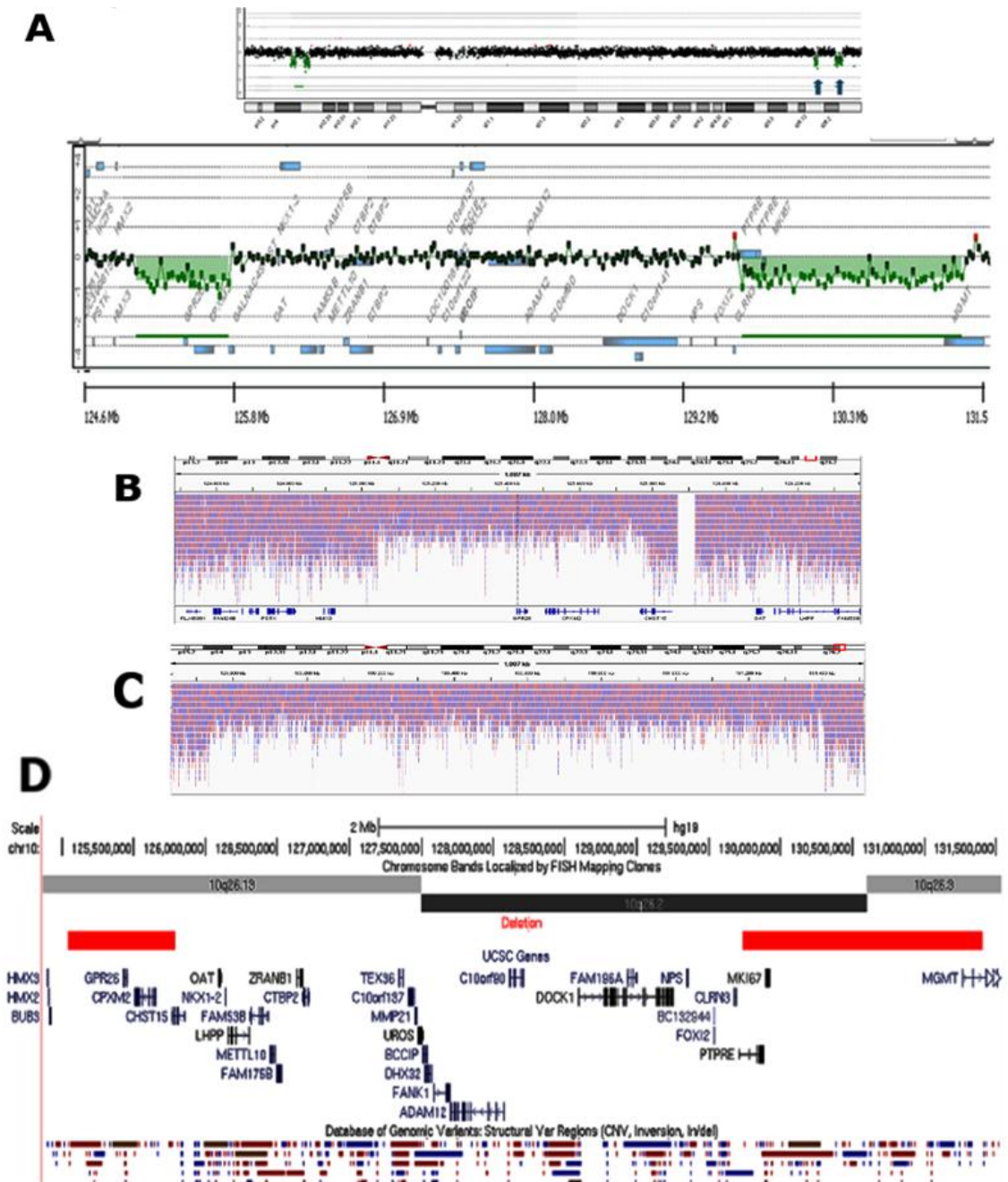


FIGURA 27: t(10;21)(p13;q22): Deleção no braço longo do cromossomo 10 detectada por aCGH e confirmadas por MPS. A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 10 evidencia dois segmentos deletados no braço longo (indicados por setas). O perfil de 10q26.2 e de 10q26.2-10q26.3 evidencia os segmentos deletados de 700 kb e 1,65 Mb, respectivamente. Oligonucleotídeos mapeados na região das deleções, em verde. **B e C.** Os perfis do IGV Browser de **(B)** 10q26.2 e **(C)** 10q26.2-10q26.3 mostram a redução da cobertura de *reads* produzida pelo alinhamento de *paired-reads* correspondentes às regiões de microdeleções, confirmando o resultado obtido por aCGH. **D.** O mapa dos segmentos que correspondem às deleções em 10q26.2 e 10q26.2-10q26.3 (em vermelho) mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

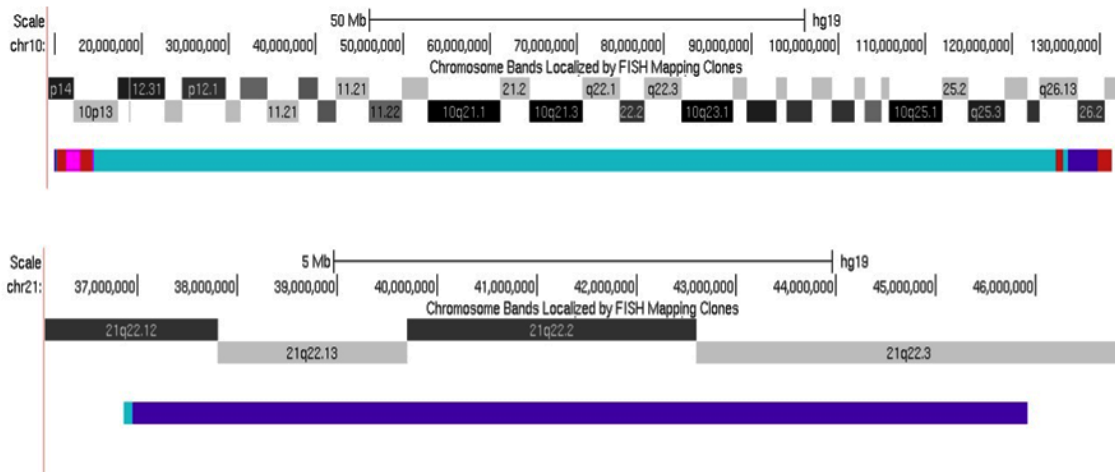


FIGURA VI.28: $t(10;21)(p13;q22)$ - Esquema ilustrativo da estrutura dos segmentos rearranjados dos cromossomo 10 e 21 após análise por aCGH, FISH e MPS. No cromossomo 10 (acima) ocorreram 15 quebras em 10p14, 10p13, 10q25.2, 10q26.13, 10q26.2, 10q26.3. Dois fragmentos do braço curto e dois do braço longo foram perdidos (em vermelho). Dois fragmentos de 10p14-10p13 foram inseridos no der(21) na posição invertida (em rosa). Os fragmentos remanescentes foram rearranjados no der(10), na posição normal (azul) ou na posição invertida (roxo). O segmento 10p14-pter foi translocado para o der(21). No cromossomo 21 (abaixo) ocorreram três quebras em 21q22.12 e 21q22.3. Dois fragmentos foram rearranjados no der(21); o maior foi inserido invertido (em roxo) e o pequeno fragmento de 21q22.12 foi inserido na posição normal (azul). O segmento 21q22.3-qter foi translocado para o der(10).

pertencente à família de receptores de proteína G (*G protein coupled receptors*, GPCR), que transduzem sinais extracelulares por meio de proteínas G heterotriméricas. O gene *GPR26* pode atuar como supressor do desenvolvimento de glioblastomas primários, já que em amostras do tumor, a proteína GPR26 está ausente ou reduzida devido a metilação *de novo* de ilhas 5' CpG do gene (Carter et al., 2008). A haploinsuficiência quanto a supressores de tumor traz problema adicional no monitoramento de pacientes com deleções cromossômicas, como salientado por Krepischi-Santos et al. (2009).

O gene *CELF2* (*CUGBP, Elav-like family member 2*) é expresso principalmente em coração, músculo e córtex cerebral. *CELF2* faz parte de família de proteínas que se ligam a RNA e foi caracterizada por seu papel na regulação de eventos de *splicing* tecido-específico durante o desenvolvimento, no cérebro e no músculo. *CELF2* liga-se a sequências ricas em GU para silenciar ou ativar a seleção de exons de vários genes, no processo de *splicing*, incluindo o gene *MAPT*, que codifica a proteína tau, associada a microtúbulo. O gene *CUGBP2* regula o *splicing* alternativo dos exons 2/3 desse gene (Leroy et al., 2006). O gene *MAPT* é expresso principalmente em neurônios (Weingarten et al., 1975). A proteína tau atua na polimerização e na regulação da

estabilidade de microtúbulos, no transporte axoplasmático e na diferenciação axonal. Mutações em *MAPT* foram associadas a uma série de doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer e a demência frontotemporal.

O gene *PTPRE* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, E*) codifica uma fosfatase de tirosina (PTP); essas fosfatases são componentes essenciais das vias de transdução de sinalização celular. O gene é altamente expresso no sistema nervoso e camundongos knockout quanto ao *ptpre* apresentam hipomielinização dos axônios dos nervos ciáticos, logo após o nascimento (Peretz et al., 2000); os autores propõem que essa proteína faça parte do mecanismo molecular que controla a atividade de canais de potássio durante período crítico do desenvolvimento das células de Schwann e da mielinização dos nervos periféricos.

Dentre os genes incluídos nas microdeleções e altamente expresso no sistema nervoso central (*GPR26*, *OPTN*, *CELF2*, *PHYH* e *PTPRE*), apenas mutações de perda de função do *OPTN* e *PHYH* são reconhecidamente não patogênicas. Apesar de os dados indicarem os genes *GPR26*, *CELF2* e *PTPRE* como candidatos principais para o quadro clínico da portadora da t(10;21), não podemos descartar o efeito conjunto da perda/interrupção de outros genes afetados pelo rearranjo sobre o fenótipo. Para a maioria desses genes, desconhece-se o efeito clínico de sua perda em heterozigose.

- **Translocação t(X;17)(q21~22;p11.1)**

Paciente

A paciente foi encaminhada aos 5 meses de idade para avaliação genética, por apresentar atraso de desenvolvimento, paraplegia espática, baixa estatura, baixo peso, pescoço curto, cifoescoliose, luxação de rádio e clinodactilia de 5º dedo. A suspeita era de síndrome de Turner. Em nova consulta, aos 2 anos e 5 meses foi constatada deficiência intelectual moderada; apresentava epilepsia. Aos 8 anos de idade foi internada devido a alteração de marcha associada a quedas frequentes e dificuldade de levantar-se do solo. A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço longo do cromossomo X e o braço curto do cromossomo X, t(X;17)(q21~22;p11.1). O exame cromossômico de seus pais revelou cariótipos normais. Os pais têm cariótipos normais.

Investigação da translocação por MPS e aCGH

A análise utilizando aCGH detectou uma deleção de 90 kb em Xq25 (Figura VI.29; Tabela VI.61). Nota-se que a quebra da translocação determinada no cariótipo foi localizada em Xq21 ou Xq22, indicando a complexidade da translocação. A deleção foi confirmada por MPS e sua extensão foi delimitada em um segmento de 103 kb (Figura VI.29; Tabelas VI.61 e VI.62). O sequenciamento do segmento de junção da quebra da deleção pelo método de Sanger revelou uma inserção de 36 pb na junção (Tabela VI.63). Por outro lado, a análise por MPS não identificou os segmentos dos pontos de quebra da translocação, provavelmente porque a quebra em 17p11.1 está localizado em região altamente repetitiva próxima ao centrômero do cromossomo.

O padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico foi determinado com base na metilação do gene *AR*. A análise revelou desvio total de inativação (Figura VI.30).

Tabela VI.61: Deleção identificada por aCGH e delimitada por MPS na portadora da t(X;17).

Banda	Localização da deleção por aCGH (hg 19)	Tam. pb	Localização da deleções por MPS	Tam. kb
Xq25	chrX:12178004-121871066	90	chrX:121772607-121875774	103

Tabela VI.62: Segmentos dos pontos de quebra da deleção em Xq25 identificada na portadora da translocação t(X;17) delimitados por MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra	Tam. pb
X(1)	Xq25	chrX:121771764-121772607	843
X(2)	Xq25	chrX:121875774-121880214	4440

Tabela VI.63: Segmento de junção da quebra da deleção em Xq25 associado a translocação t(X;17) sequenciado pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
X(1)/X(2)	X(1)	+	X(2)	-	Ins (36pb) TGCCAGCAATATGCCAGCAATATGC

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Não há genes mapeados no segmento da deleção em Xq25 (Figura VI.31).

A translocação t(X;17) e o quadro clínico do portador.

Na paciente portadora da t(X;17) foi detectada uma deleção de segmento de aproximadamente 100 kb, em que não há genes (Figura VI.31). Apesar de não incluir genes, a deleção está mapeada a 447-537 kb 5' do gene *GRIA3* (Xq25). O gene *GRIA3* [(*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) subunit 3] codifica um receptor de glutamato ionotrópico AMPA. Os receptores de glutamato mediam a maioria dos neurotransmissores excitatórios no cérebro de mamíferos e atuam no processos de plasticidade sináptica, estando relacionados aos processos de memória e aprendizagem. Mutações e deleções no gene *GRIA3* causam deficiência intelectual associada alterações de comportamento e convulsões (Wu et al., 2007; Bonnet et al., 2009). O fenótipo da portadora da t(X;17), que inclui deficiência intelectual, paraplegia espástica e convulsões pode, assim, ser explicado por alteração da expressão e do gene *GRIA3*. Anteriormente, foi descrita uma duplicação localizada a 874 kb 5' (chrX:120,474,249-121,444,386) do gene *GRIA3* associada à redução da expressão do gene em um menino, indicando que a duplicação afetou região reguladora do gene, levando ao quadro clínico similar ao observado em portadores de mutações e deleções no gene *GRIA3* (Bonnet et al., 2012) (Figura VI.31). O fenótipo da portadora da t(X;17) estaria associado à redução da expressão do gene em decorrência da provável perda de elemento regulador mapeado na região da deleção do cromossomo der(X). As mulheres heterozigóticas quanto a alterações no gene *GRIA3* não apresentam manifestações clínicas, em decorrência do desvio de inativação do cromossomo X, ficando inativo o cromossomo com o alelo mutante do *GRIA3*. Na portadora da t(X;17), demonstramos que o padrão de inativação do X está completamente desviado (Figura VI.30). Apesar de não termos determinado qual dos cromossomos X é o inativo, admitimos que o cromossomo X normal está inativo e o der(X) ativo, padrão de inativação comum nas portadoras de translocações t(X;A) citogeneticamente equilibradas, por tornar as células funcionalmente equilibradas quanto aos segmentos translocados. Na translocação t(X;17) aqui descrita, espera-se que ocorra seleção contrária a células com o cromossomo normal ativo, pois estando o derivativo X inativo ocorre dissomia funcional do segmento Xq21-Xqter, translocado para o cromossomo 17; a inativação também pode propagar-se para o segmento do cromossomo 17 translocado para o cromossomo X. Dessa forma nas células da paciente, o derivativo X portador da deleção próxima ao gene *GRIA3* estaria ativo na maioria das células, o que levaria ao quadro clínico. Baseando-se na hipótese da existência de elemento

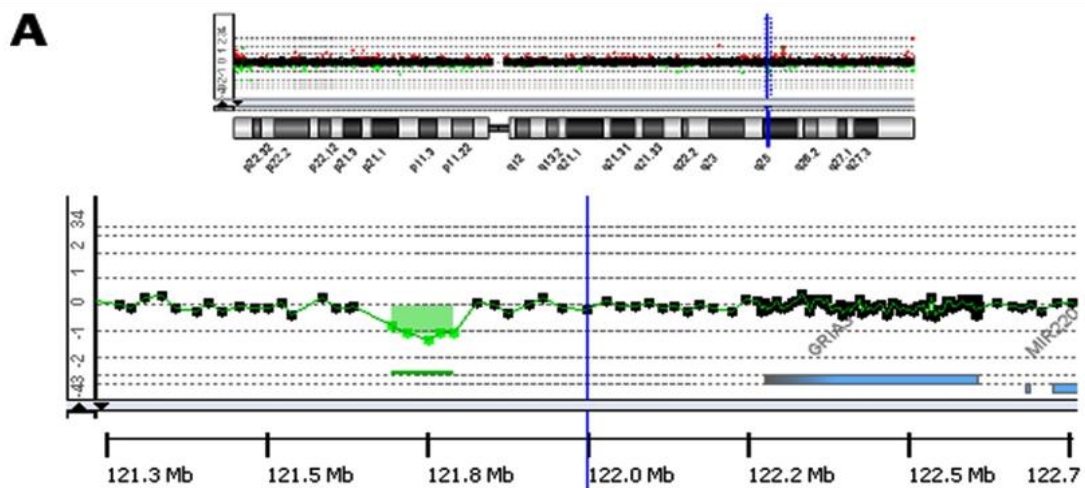


FIGURA VI.29: Deleção no cromossomo X detectada na paciente portadora da t(X;17). Acima, o perfil do aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo X evidencia segmento deletado no braço longo. Abaixo o perfil da região Xq25 evidencia o segmento deletado de 90kb (oligonucleotídeos mapeados na região da deleção são representados em verde). **B.** O perfil do IGV Browser na região Xq25 mostra à redução da cobertura de reads produzida pelo alinhamento de paired-reads correspondentes a região da microdeleção, confirmando o resultado do aCGH.

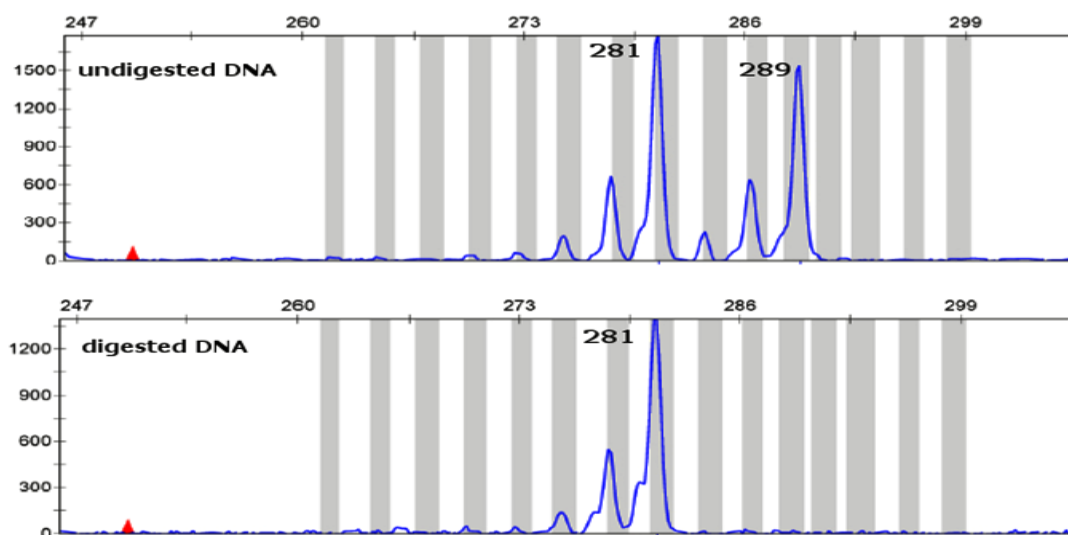


FIGURA VI.30. Padrão de inativação do cromossomo X na portadora de t(X;17), determinado com base na metilação do gene AR: Os alelos foram amplificados a partir do DNA genômico, não digerido (acima) e digerido (abaixo) pela enzima *HpaII*, sensível à metilação. Após digestão, apenas o alelo metilado, no X inativo, foi amplificado. A razão de inativação (100:0) mostra que o mesmo alelo está inativo em 100% das células.



FIGURA VI.31: Análise genômica comparativa da região de 100 Kb localizada 447-537 *upstream* ao gene *GRIA3* e deletada na portadora da t(X;17). A. Mapa do segmento do cromossomo X no qual o gene *GRIA3* está mapeado. A deleção em nossa paciente (em vermelho), localizada entre 447-537 *upstream* ao *GRIA3* e a duplicação descrita por Bonnet et al (2012) (em azul) estão ambas mapeadas *upstream* ao gene *GRIA3*, em segmento sem genes (Adaptado de UCSC, hg 19). **B.** Sequências genômicas, correspondentes ao segmento entre 447-537 *upstream* ao *GRIA3*, em rato, camundongo, boi, cão, macaco rhesus e chimpanzé, comparadas à sequência humana: foram identificadas quatro sequências altamente conservadas entre esses vertebrados (em rosa). Da esquerda para a direita, essas sequências contêm, respectivamente, 425, 535, 549 e 576 pares de bases e 75,8%, 74,8%, 73%, 76.7% de identidade. Em rosa (setas azuis), elementos conservados; em azul, transposons e elementos repetitivos simples; em vermelho, regiões intergênicas. O eixo horizontal corresponde ao alinhamento da sequência referência. O eixo vertical, que varia de 50 a 100%, corresponde ao nível de identidade do nucleotídeo nesse alinhamento. (Retirada do ECR browser).

regulador na região da deleção de 100 kb, buscamos elementos conservados não codificadores nessa região, para a identificação de possíveis elementos reguladores do *GRIA3*. Para essa análise utilizamos o programa *ECR Browser*, que permite alinhar sequências de várias linhagens de vertebrados e a análise comparativa do segmento alvo (Ovcharenko et al., 2004) (Figura VI.31B). A comparação foi feita entre os genomas humano, de chimpanzé, macaco *rhesus*, cão, bovino, camundongo e rato. Foram consideradas sequências com mais de 75% de identidade, compostas de no mínimo 350 pares de bases (Benko et al., 2009). A análise genômica comparativa das unidades identificou alguns elementos conservados no genoma de mamíferos. A Figura VI.31 mostra a comparação, entre genomas, do segmento correspondente à região da deleção *usptream* ao *GRIA3*, candidata a conter o(s) elemento(s) regulador(es). Nessa análise genômica comparativa, foi possível identificar quatro sequências de 425 a 576 pares de bases, altamente conservadas, pois presentes nas seis linhagens de mamíferos, compartilhando 73-75% de identidade; são, portanto, candidatas a conter elementos reguladores. Alternativamente à perda de elemento regulador, a deleção presente em nossa paciente pode ter aproximado o gene *GRIA3* de elemento silenciador. Nesse caso o silenciador poderia estar localizado no segmento próximo à duplicação descrita por Bonnet et al. (2012). Os autores ressaltam, nesse trabalho, a existência de um segmento altamente conservado de 2.268 pb, centromérico à região duplicada, sendo, portanto, candidato a conter elementos reguladores.

Como não pudemos identificar os pontos de quebra da translocação t(X;17) por MPS, não podemos descartar a possibilidade de interrupção de gene(s) sensível(s) a dosagem, que possa(m) contribuir para o fenótipo da paciente. No entanto a similaridade do quadro clínico com outros portadores de alterações no gene *GRIA3*, sugere que a interrupção da região reguladora do gene seja a principal causa do quadro clínico.

VI.3.3. Rearranjos complexos associados a microdeleções

- **Translocação t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13) (BCR A1)**

Paciente

O paciente foi encaminhado para avaliação genética, aos 8 de idade, por apresentar deficiência intelectual grave, ausência de fala e aniridia; as mãos apresentavam braquidactilia. Aos 4 meses de idade, constatou-se hipotonia; andou com

2 anos e sentou-se sem apoio, aos 3 anos de idade. Em reavaliação clínica aos 14 anos de idade, não falava. A análise cromossômica após bandamento G revelou um rearranjo cromossômico complexo, aparentemente equilibrado, no nível de resolução do bandamento G: uma translocação entre o braço longo do cromossomo 7 e o braço curto do cromossomo 10 e a inserção de um segmento do braço curto do cromossomo 11 no braço longo do cromossomo 7; $t(7;10;11)(q35;p12.1;p14)$. A análise cromossômica dos genitores da paciente revelou cariótipos normais.

Investigação da translocação por FISH, MPS e aCGH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, em estudo anterior do LGH (Antonini S, Pós doutoramento) foi realizado a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC e PAC mapeados nos segmentos dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabela VI.64).

No presente estudo, investigamos o rearranjo por aCGH e MPS. A análise por aCGH revelou cinco deleções de segmentos do cromossomo 7 em 7q33-q35 (Figuras VI.32 e VI.33; Tabela VI.67). As deleções têm aproximadamente 2,15 Mb, em 7q33, 50 kb, 1,54 Mb, 707 kb, em 7q34 e 610 kb, em 7q35. As deleções do cromossomo 7 não estão localizadas no ponto de quebra da translocação detectada na análise por bandamento G, mostrando a maior complexidade do rearranjo. A análise também revelou a deleção de um segmento de aproximadamente 2,9 Mb do cromossomo 11, em 11p14.1-11p13 (Figura VI.34; Tabela VI. 67). Essa deleção do cromossomo 11 está localizada no segmento inserido no braço longo do cromossomo 7 rearranjado. As seis deleções detectadas por meio de aCGH foram confirmadas na análise por MPS e a localização de seus pontos de quebra refinados (Figuras VI.32 e VI.34; Tabelas VI.65 e VI.67). A análise revelou maior complexidade dos cromossomos 7 e 11 rearranjados, com a presença de 20 quebras. No cromossomo 11, foi identificada uma quebra adicional em 11p14.1. Foram identificadas também cinco quebras adicionais no cromossomo 7, todas em 7q35. Não houve outras quebras no cromossomo 10. As quebras foram refinadas em segmentos de 173 a 3.176 pb. A estrutura dos cromossomos der(7) e der(11), após análise por aCGH e MPS, está ilustrada no Capítulo IX (Figura IX.6). Oito segmentos de junção das quebras do rearranjo foram sequenciados pelo método de Sanger (Tabela VI.66). Os resultados mostraram tanto *blunt fusions* quanto perdas e inserções nas junções das quebras.

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Vinte e nove genes estão mapeados nos segmentos das deleções em 7q33-7q35 (Figura VI.33, Tabela VI.67). Na deleção do cromossomo 11 em 11p13-11p14 estão mapeados nove genes (Figura VI.34; Tabela VI.67). Nove genes foram interrompidos nos pontos de quebra: *MKX* (10p12.1), *RCN1* (11p13), *TRIM24* (7q33), *SVOPL* (7q34), *KIAA1549* (7q34), *RAB19* (7q34), *DENND2A* (7q34), *TMEM178B* (7q34), *CNTNAP2* (7q35) (Figura VI.35; Tabela VI.65). Devido à proximidade das quebras no cromossomo 7, os genes *TRIM24* (7q34) e *CNTNAP2* (7q35) foram interrompidos em duas regiões.

O rearranjo t(7;10)ins(7;11) e o quadro clínico do portador

Vários genes estão localizados nos segmentos perdidos dos cromossomos 7 e 11. As quebras cromossômicas também interromperam nove genes nos cromossomos 7, 10 e 11. Genes nos segmentos perdidos ou interrompidos pelas quebras podem estar contribuindo para o quadro clínico do paciente. Entre esses, ressaltamos o *PAX6* (*paired box 6*), localizado no segmento da deleção em 11p13, e o *CNTNAP2* (*contactin associated protein-like 2*), interrompido por quebras em 7q35. A haploinsuficiência do *PAX6* é responsável pela formação incompleta ou a ausência da íris, a aniridia (OMIM 106210; Fantes et al., 1995; Robinson et al., 2008). A deleção do gene *PAX6*, explica a aniridia no paciente. O gene *CNTNAP2* codifica a CASPR2, proteína transmembrânica da família da neurexina. O gene de 24 Mb, o maior do genoma humano, contém 24 exons. O rearranjo complexo aqui descrito o interrompeu nos introns 1 e 8, devido à proximidade das quebras em 7q35. Comprometimento intelectual, convulsões, autismo e distúrbios no desenvolvimento da fala são características comuns observadas em portadores de alterações que causam perda de função do *CNTNAP2* (Rodenas-Cuadrado et al., 2013). No entanto, existe grande variabilidade clínica associada a alterações no gene. Pode não haver comprometimento intelectual ou este ser grave. Da mesma

Tabela VI.64: Resultados do mapeamento por FISH dos pontos de quebra da t(7;10)ins(7;11)

Localização dos pontos de quebra (hg 19)	Tamanho kb	Genes nos pontos de quebra
chr7:146808760-146922794	114	<i>CNTNAP2</i>
chr10:27897058-2808159	184	<i>MKX</i>
chr11:27718086-27929856	212	
chr11:3706873-38957367	1888	

Tabela VI.65: Segmentos dos pontos de quebra da t(7;10;11) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene truncado
10(1)	10p14	chr10:27981131-27981485	354	chr10:27981375-27981377	<i>MKX</i>
11(1)	11p14.1	chr11:27873293-27873677	384	**	
11(2)	11p14.1	chr11:28635104-28635398	294	**	
11(3)*	11p14.1	chr11:28938765-28941765	3000	chr11:28938918	
11(4)*	11p13	chr11:31946316-31949316	3000	**	<i>RCNI</i>
11(5)	11p12	chr11:38000194-38001669	1475	chr11:38000754-38000760 chr11:38000643-38000644	
7(1)*	7q33	chr7:135981002-135983448	2446	**	
7(2)*	7q33	chr7:138158864-138161788	2924	chr7:138161719	<i>TRIM24</i>
7(3)*	7q34	chr7:138204687-138207687	3000	**	<i>TRIM24</i>
7(4)*	7q34	chr7:138291246-138294246	3000	**	<i>SVOPL</i>
7(5)*	7q34	chr7:138537010-138540186	3176	**	<i>KIAA1549</i>
7(6)*	7q34	chr7:140110814-140111734	920	**	<i>RAB19</i>
7(7)*	7q34	chr7:140246520-140249205	2685	chr7:140246784	<i>DENND2A</i>
7(8)*	7q34	chr7:140987530-140988668	1138	chr7:140988569	<i>TMEM178B</i>
7(9)*	7q35	chr7:144718479-144721270	2791	**	
7(10)*	7q35	chr7:145361238-145363671	2433	chr7:145362397	
7(11)	7q35	chr7:145395796-145396494	698	chr7:145395870-145396006	
7(12)	7q35	chr7:145463504-145463699	195	**	
7(13)	7q35	chr7:146292568-146293344	776	**	<i>CNTNAP2</i>
7(14)	7q35	chr7:146968024-146968197	173	**	<i>CNTNAP2</i>

*Quebras que originaram deleções. ** Segmentos dos pontos de quebra não foram sequenciado pelo método de Sanger

Tabela VI.66: Segmentos de junção das quebras da t(7;10;11) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
7(1)/11(2)	7(1)	-	11(2)	+	**
11(3)/11(2)	11(3)	-	11(2)	-	Ins:16pb
11(1)/7(12)	11(1)	+	7(12)	-	Dup11: TTTCTGTCC
7(11)/7(12)	7(11)	+	7(12)	+	del7: 137pb
7(13)/11(5)	7(13)	-	11(5)	-	Dup 11: CCAATGA; AC
11(4)/7(13)	11(4)	+	7(13)	+	**
7(14)/7(8)	7(14)	-	7(8)	+	*
7(9)/7(10)	7(9)	-	7(10)	+	*
7(11)/10(1)	7(11)	-	10(1)	-	Ins:AAA; del7: 137pb; del 10:TCC
7(14)/7(5)	7(14)	+	7(5)	-	**
7(3)/7(4)	7(3)	-	7(4)	+	**
7(2)/7(6)	7(2)	+	7(6)	+	GAGT
7(7)/ 10(1)	7(7)	-	10(1)	+	Ins:180bp; del 10:TCC
11(1)/11(5)	11(1)	-	11(5)	+	Dup11TTTCTGTCC; Dup 11: CCAATGA; AC

* Fragmento de junção foi clonado por Sanger, mas não foram detectadas alterações

** Segmento de junção não foi sequenciado pelo método de Sanger

Tabela VI.67: t(7;10;11) - Deleções identificadas por aCGH e delimitadas por MPS e genes mapeados nos intervalos das deleções.

Banda	Localização das deleções por aCGH (hg 19)	Tam. kb	Localização das deleções por MPS	Tam. kb	Genes
7q33	chr7:135994754-138144754	2150	chr7:135981002-138161788	2180	<i>CHRM2, PTN, DGKI, CREB3L2, AKR1D1, TRIM24</i>
7q34	chr7:138222963-138273080	50	chr7:138204687-138294246	89	<i>TRIM24</i>
7q34	chr7:138562762-140107065	1544	chr7:138537010-140111734	1574	<i>KIAA1549, ZC3HAV1L, ZC3HAV1, TTC26, UBN2, C7orf55, LUC7L2, KLRG2, CLEC2L, HIPK2, TBXAS1, PARP12, JHDM1D, LOC100134229, SLC37A3, RAB19</i>
7q34	chr7:140274928-140982607	707	chr7:140246520-140988668	742	<i>DENND2A, ADCK2, LOC100134713, NDUFB2, BRAF, MRPS33, TMEM178B</i>
7q35	chr7:144738971-145349495	610	chr7:144718479-145363671	645	
11p14-11p12	chr11:28964028-31926058	2962	chr11:28938765-31949316	3010	<i>KCNA4, FSHB, C11orf46, MPPED2, DCDC1, AJC24, IMMP1L, ELP4, PAX6</i>

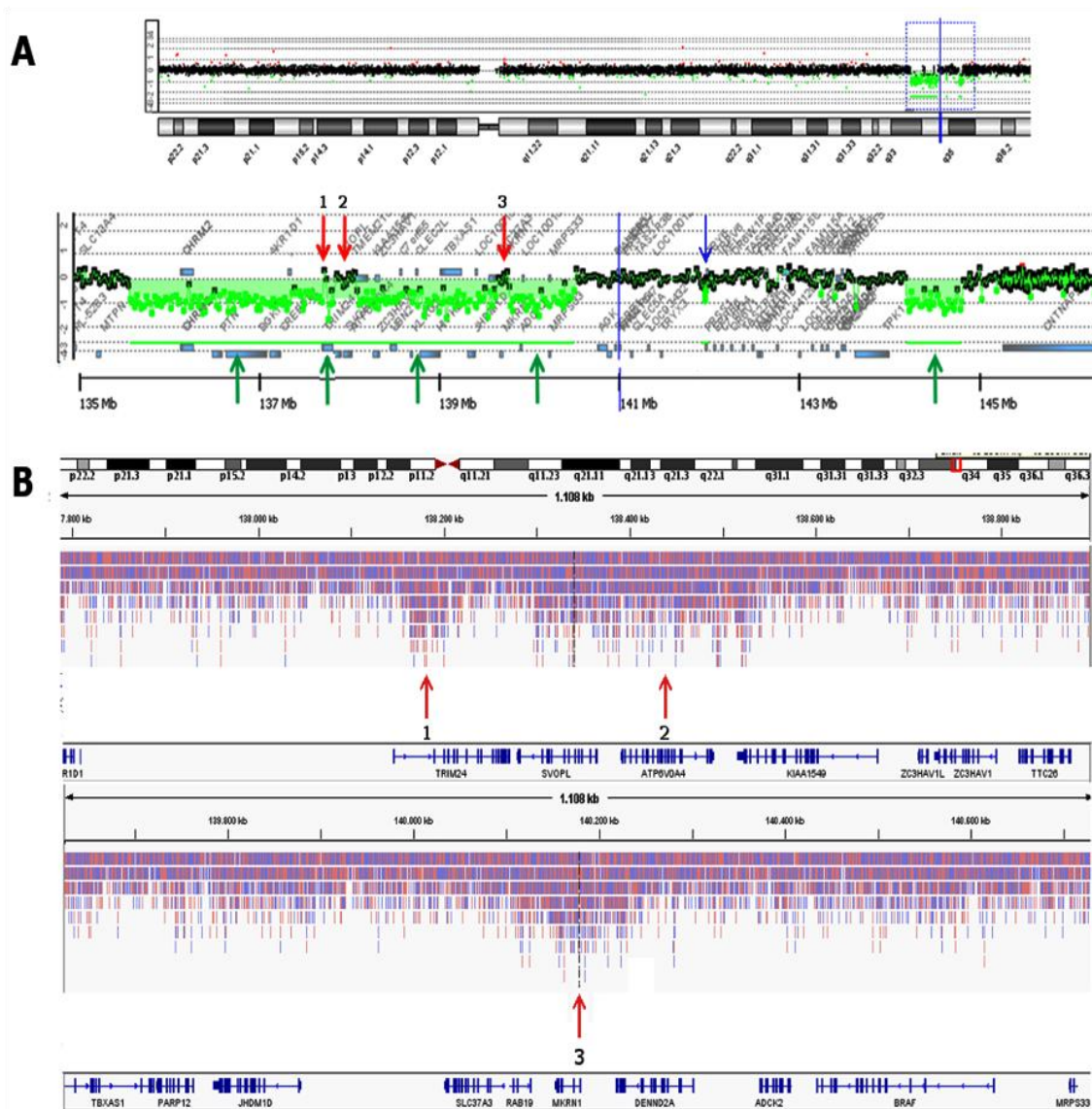


FIGURA VI.32: t(7;10)ins(7;11) - Deleções no cromossomo 7 detectadas em 7q33-7q35. A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 7 evidencia deleções de segmentos do braço longo. O perfil da região 7q33-7q35 evidencia cinco segmentos deletados (apontados pelas setas verdes). Oligonucleotídeos mapeados nos segmentos das deleções, em verde. O tamanho das deleções variou entre 50 kb e 2,15 Mb. As quatro deleções em 7q33-7q34 estão separados por dois segmentos sem variação de número de cópias (apontados por setas vermelhas). Uma deleção detectada em 7q34 não foi confirmada por MPS e não foi considerada (apontada pela seta azul). **B.** O perfil do IGV Browser de 7q33-7q34 mostra a redução da cobertura de *reads* produzida pelo alinhamento de *paired-reads* correspondentes à região das quatro microdeleções, confirmando o resultado obtido por aCGH. As setas vermelhas apontam para os segmentos não deletados indicados em A, que têm cobertura normal de *reads*.

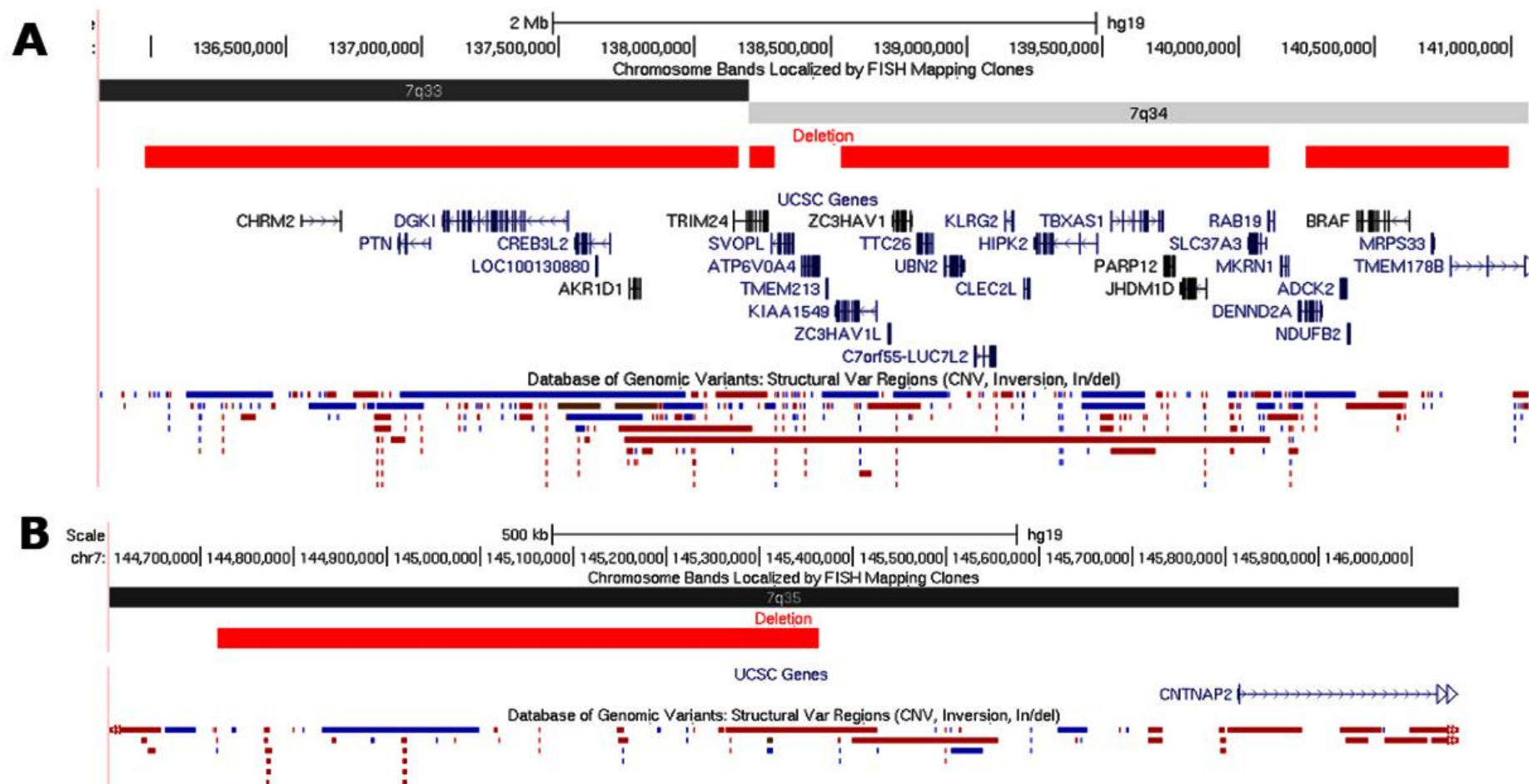


FIGURA VI.33. $t(7;10)ins(7;11)$ – Mapa dos segmentos deletados no cromossomo 7, em 7q33-7q35. O mapa do segmento que corresponde às regiões das microdeleções (em vermelho) em (A) 7q33-7q34 e (B) 7q35 mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (DGV). (Adaptado de UCSC, hg 19).

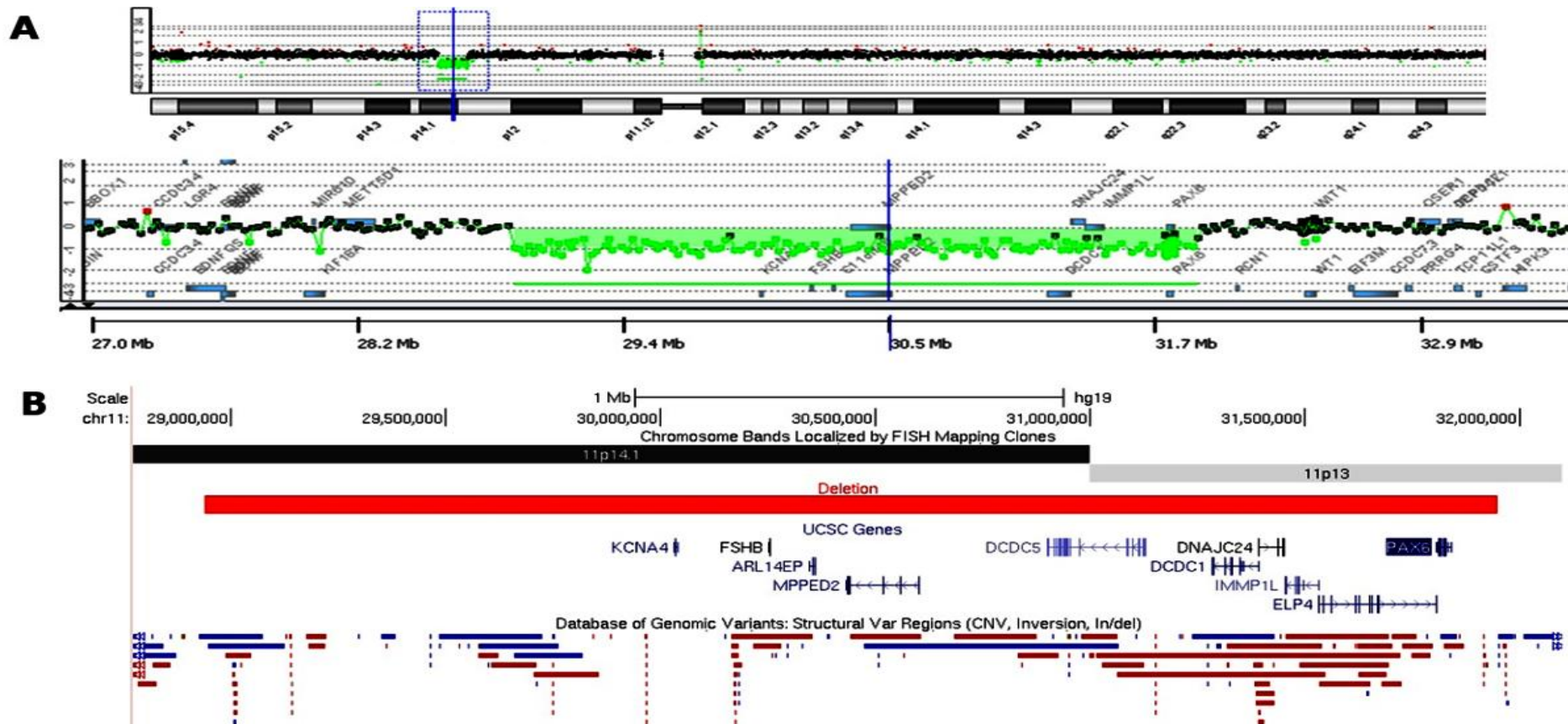


FIGURA VI.34. $t(7;10)ins(7;11)$ - Deleção no cromossomo 11 detectada em 11p13p14. (A) Acima, o perfil do aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 11 evidencia segmento deletado no braço longo do cromossomo 11. Abaixo o o perfil da região 11p14p13 evidencia o segmento deletado de 2,96 Mb (oligonucleotídeos mapeados na região da deleção são representados em verde). **(B)** O mapa do segmento que corresponde a região da deleção (em vermelho) em 11p14p13 mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). O gene *PAX6* está incluído no segmento deletado. (Adaptado de UCSC, hg 19).

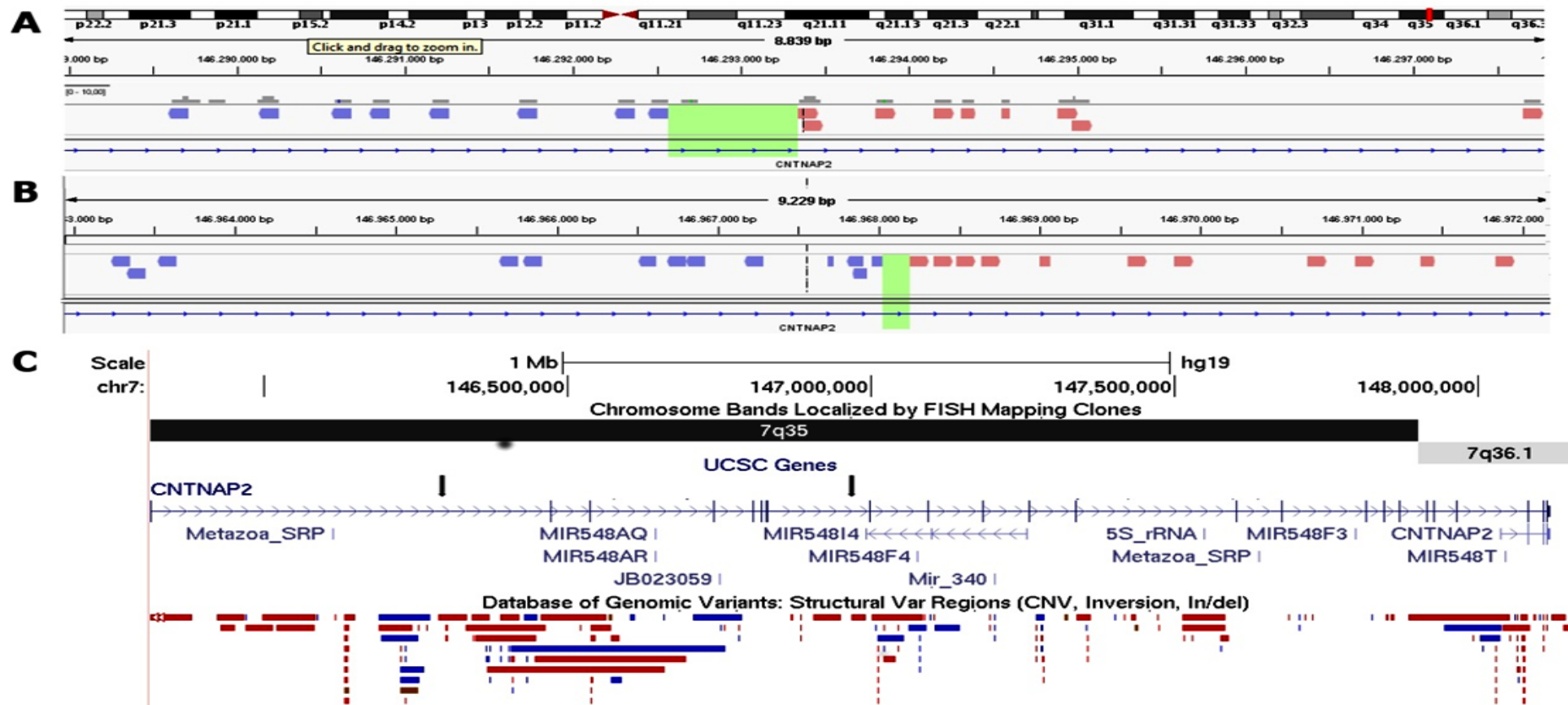


FIGURA VI.35: t(7;10)ins(7;11). Mapeamento por MPS dos pontos de quebra em 7q35, que interromperam o gene *CNTNAP2*. Estão ilustradas duas das cinco quebras identificadas em 7q35. **A e B.** Após alinhamento dos dados obtidos por MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra (A) as *reads* discordantes mapeadas em 7q35 cujo pares se localizam em 11p12 (*reads* em azul) e em 11p13 (*reads* em rosa); (B) as *reads* discordantes mapeadas em 7q35 cujo pares se localizam em 7q34. As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. Os segmentos que contêm os pontos de quebra (em verde) foram delimitados pelas *reads* discordantes mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *CNTNAP2* foi interrompido nos dois pontos de quebra. **C.** O mapa do segmento 7q35 mostra que as duas quebras (apontadas pelas setas) interromperam o gene *CNTNAP2* nos introns 1 e 8. (UCSC genes). As variações no número de cópias (CNV) descritas no DGV e mapeadas na região estão indicadas em vermelho (deleções) e azul (duplicações). (Adaptado de UCSC, hg 19).

forma, o autismo pode manifestar-se tipicamente ou ocorrer apenas comportamento repetitivo. A grande maioria dos pacientes portadores de alterações de perda de função do *CNTNAP2*, no entanto, apresentam algum tipo de alteração na fala, como por exemplo, fala disártrica, ausência ou atraso na aquisição de fala. As alterações de fala devem ser consequência da interação do gene *CNTNAP2* com o *FOXP2*, fator de transcrição associado a fala e desenvolvimento de linguagem.

Entretanto, certas observações sugerem que outros fatores também possam influenciar a manifestação da haploinsuficiência do *CNTNAP2*, pois translocações que interromperam *CNTNAP2* foram detectadas em indivíduo clinicamente normal (Belloso et al., 2007) e outro com a síndrome de Gilles de la Tourette e comportamento obsessivo (Verkerka et al., 2003). Mutações consideradas patogênicas no *CNTNAP2* também foram encontradas em indivíduos normais (Strauss et al., 2006; Bakaloglu et al., 2008). De qualquer forma, considerando o papel do *CNTNAP2* no neurodesenvolvimento e principalmente na fala, o gene é considerado candidato para o quadro clínico do portador da t(7;10)ins(7;11).

Outro gene afetado pelo rearranjo é o *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*). Mutações em heterozigose associadas a ganho de função da proteína mutada causam a síndrome cardio-faciocutânea, a síndrome de Noonan 7 e a síndrome LEOPARD 3 (Sarkozy et al., 2009). Comuns as três doenças estão dismorfismos faciais, defeitos cardíacos, anomalias ectodérmicas e graus variáveis de comprometimento intelectual. A deleção parcial do *BRAF* em um paciente com deficiência intelectual, encefalopatia grave e restrição de crescimento posnatal (Yu et al., 2011) sugere que a haploinsuficiência do gene também possa ser patogênica. Assim a perda do *BRAF* também pode contribuir para o fenótipo do paciente.

Dentre os outros genes alterados pelo rearranjo, três são genes de doença. Dois deles causam doenças recessivas (*AKR1D1* e *TBXAS1*), sendo os heterozigóticos clinicamente normais, ou estão relacionados a câncer (*TRIM24*). Apesar de não haver outros genes candidatos além do *PAX6*, *CNTNAP2* e *BRAF*, o quadro clínico do paciente pode resultar também do efeito conjunto da perda/interrupção de outros genes afetados pelo rearranjo.

- **ins(2)(p13q11.2q21),ins(12;18)(p11;q21.3q11.2) (BCR A3)**

Paciente

O paciente foi encaminhado para avaliação genética por apresentar retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, dismorfismos craniofaciais, limitação articular e diminuição de massa muscular. A análise cromossômica após bandamento G revelou um rearranjo complexo entre os cromossomos 2, 12 e 18: um segmento do braço longo do cromossomo 2 foi inserido em seu braço curto e um segmento do braço longo do cromossomo 18 foi inserido no braço curto do cromossomo 12 - ins(2)(p13q11.2q21),ins(12;18)(p11;q21.3q11.2). O exame cromossômico dos genitores da criança revelou cariótipos normais.

Investigação da inserção por aCGH e MPS.

A análise por meio de aCGH detectou uma deleção de 700 kb em 2q31.1 (Figura VI.36; Tabela VI.70). Aplicando MPS, os pontos de quebra no cromossomo 18 foram localizados em segmentos de 390 a 761 pb (Tabela VI.68). A quebra do cromossomo 12 foi delimitada em um segmento de 2.876 pb. A análise revelou a complexidade do cromossomo der(2), em que foram detectadas seis quebras, duas delas associadas à deleção identificada por aCGH. A deleção em 2q31.1 pôde assim ser confirmada e sua extensão foi delimitada em um segmento de 743 kb (Figura VI.36; Tabela VI.70). Além das quebras que originaram a deleção, foram identificadas duas quebras no braço curto, em 2p22.3 e 2p16.1, e outras duas, em 2q24.3 e 2q32.3 (Tabela VI.68). Devemos lembrar que a análise após bandamento G identificou as quebras da inserção como ins(2)(p13q11.2q21). Os pontos de quebra no cromossomo 2 foram mapeados em segmentos de 87pb a 5.177pb. Os nove fragmentos de junção foram submetidos a sequenciamento de Sanger, que revelou deleções e inserções nesses segmentos (Tabela VI.69). A combinação das análises por MPS e aCGH permitiram, assim, determinar a estrutura dos cromossomos der(2), der(12) e der(18), formados a partir das 10 quebras identificadas (Capítulo IX - Figura IX.4). Esses dados confirmaram que a inserção do cromossomo 2 e a inserção, envolvendo os cromossomos 12 e 18, são rearranjos independentes.

Tabela VI. 68: Segmentos dos pontos de quebra da ins(2)ins(12;18) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
2(1)	2p22.3	chr2:34769689-34769781	92	chr2:34769728-34769734	
2(2)	2p16.1	chr2:59400408-59400495	87	chr2:59400457-59400501	
2(3)	2q24.3	chr2:166101647-166101916	269	chr2:166101746-166101774	<i>SCN2A</i>
2(4)	2q31.1	chr2:170409563-170409664	101	chr2:170409621	<i>FASTKDI</i>
2(5)	2q31.1	chr2:171153031-171158208	5177	chr2:171158061	
2(6)	2q32.3	chr2:194336077-194336445	368	chr2:194336428	
12(1)	12p12.1	chr12:23834937-2383781	2876	chr12:23836959	<i>SOX5</i>
18(1)	18q11.2	chr18:20297048-20297707	659	chr18:20297220-20297230	
18(2)	18q21.33	chr18:59347874-59348635	761	chr18:59348240-59348249	
18(3)	18q21.33	chr18:60691944-60692334	390	chr18:60692183	

Genes afetados pelo rearranjo complexo

Nas regiões das microdeleções do cromossomo 2 estão mapeados nove genes (*PPIG*, *CCDC173*, *PHOSPHO2*, *PHOSPHO2-KLHL2*, *KLHL23*, *SSB*, *METTL5*, *UBR3*, *MYO3B*) (Figura VI.36; Tabela VI.70). Os genes *SCN2A* e *FASTKD1* foram interrompidos nos pontos de quebra (Tabela VI.68). A quebra do cromossomo 12 interrompeu o gene *SOX5* (Figura VI.37).

A inserção *ins(2) ins(12;18)* e o quadro clínico do portador

A análise do rearranjo revelou a perda de um segmento de aproximadamente 743 kb do cromossomo 2, em 2q31.1. Os genes mapeados nesse segmento não foram relacionados a doença. Entre os genes do segmento deletado, *FASTKD1*, *CCDC173*, *PHOSPHO2*, *PHOSPHO2-KLHL23*, *KLHL23* e *SSB* estão mapeados em segmentos em que não há CNV descritas no DGV (Figura VI.36). Já foram identificadas algumas microdeleções que incluem o segmento em 2q31.1, deletado em nosso paciente (Del Campo et al., 1999; Bijlsma et al., 2005; Pescucci et al., 2007; Mitter et al., 2010). Em comum os pacientes apresentam retardo de desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia. As sobreposições das deleções são, entretanto parciais, dificultando a correlação genótipo-fenótipo. Baseando-se em deleções que incluem o segmento 2q31.1 Dimitrov et al. (2010) sugerem que o fenótipo de portadores dessas deleções se

Tabela VI. 69: Segmentos de junção das quebras da ins(2)ins(12;18) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
12(1)/18(2)	12(1)	-	18(2)	-	dup 12(1): A; dup18(1):CAGGGCTTAT
18(2)/12(1)	18(1)	+	12(1)	+	del 18(2):TAAGCTTCCTG; dup 12(1): A
18(1)/18(3)	18(1)	-	18(3)	-	dup18(1):CAGGGCTTAT; ins:A
18(2)/18(3)	18(2)	+	18(3)	+	del 18(2):TAAGCTTCCTG; dup: C
2(1)/2(5)	2(1)	-	2(5)	+	del2(1):TACTCAC;
2(6)/2(3)	2(6)	-	2(3)	+	del2(3) :29 pb; dup 2(6): G
2(4)/2(2)	2(4)	-	2(2)	-	del2(2) 45 pb
2(1)/2(2)	2(1)	+	2(2)	+	del2(1):TACTCAC; del2(2) 45 pb
2(3)/2(6)	2(3)	-	2(6)	+	del2(3) :29 pb; dup 2(6): G

Tabela VI.70. Deleção identificada por aCGH e caracterizada por MPS no paciente portador da ins(2)ins(12;18) e genes mapeados no intervalo da deleção.

Banda	Localização das deleções por aCGH (hg 19)	Tam. kb	Localização das deleções por MPS	Tam. kb	Genes
2q31.1	chr2:170424322-171125070	700	chr2:170409664-171153031	743	<i>FASTKD1, PPIG, CCDC173, PHOSPHO2, PHOSPHO2-KLHL2, KLHL23, SSB, METTL5, UBR3, MYO3B</i>

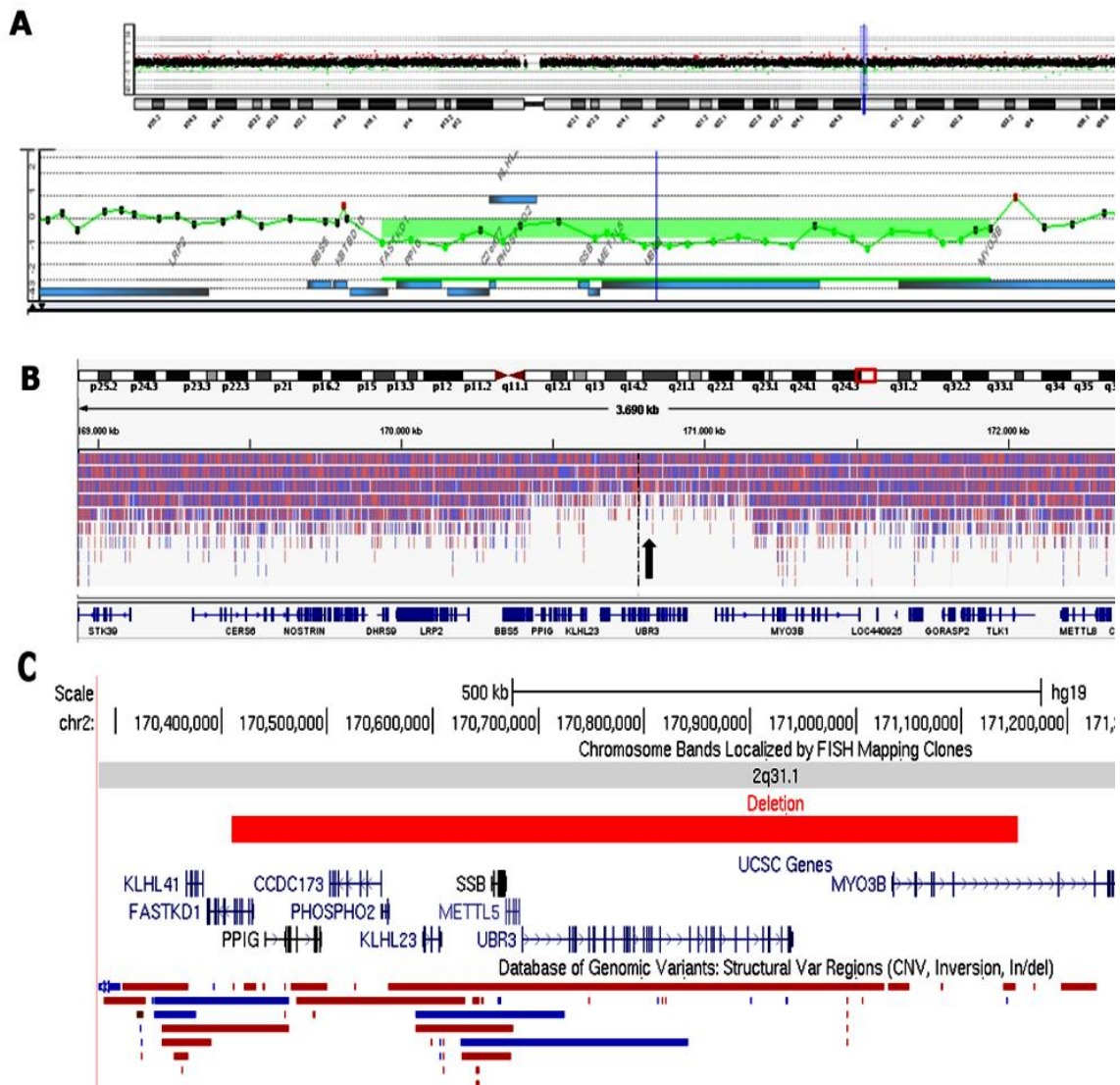


FIGURA VI.36: ins(2)ins(12;18) - Deleção no cromossomo 2 em 2q31.1. A. O perfil de aCGH (Plataforma 180 K) do cromossomo 2 evidencia segmento deletado no braço longo. O perfil da região 2q31.1 evidencia o segmento deletado de 700 kb. Oligonucleotídeos mapeados no segmento deletado, em verde. B. O perfil do IGV Browser da região 2q31.1 mostra a redução da cobertura de *reads* no alinhamento de *paired-reads* correspondentes à região da microdeleção (apontada pela seta), confirmando o resultado obtido por aCGH. C. O mapa do segmento que corresponde à região da deleção em 2q31.1 (em vermelho), mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeados na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

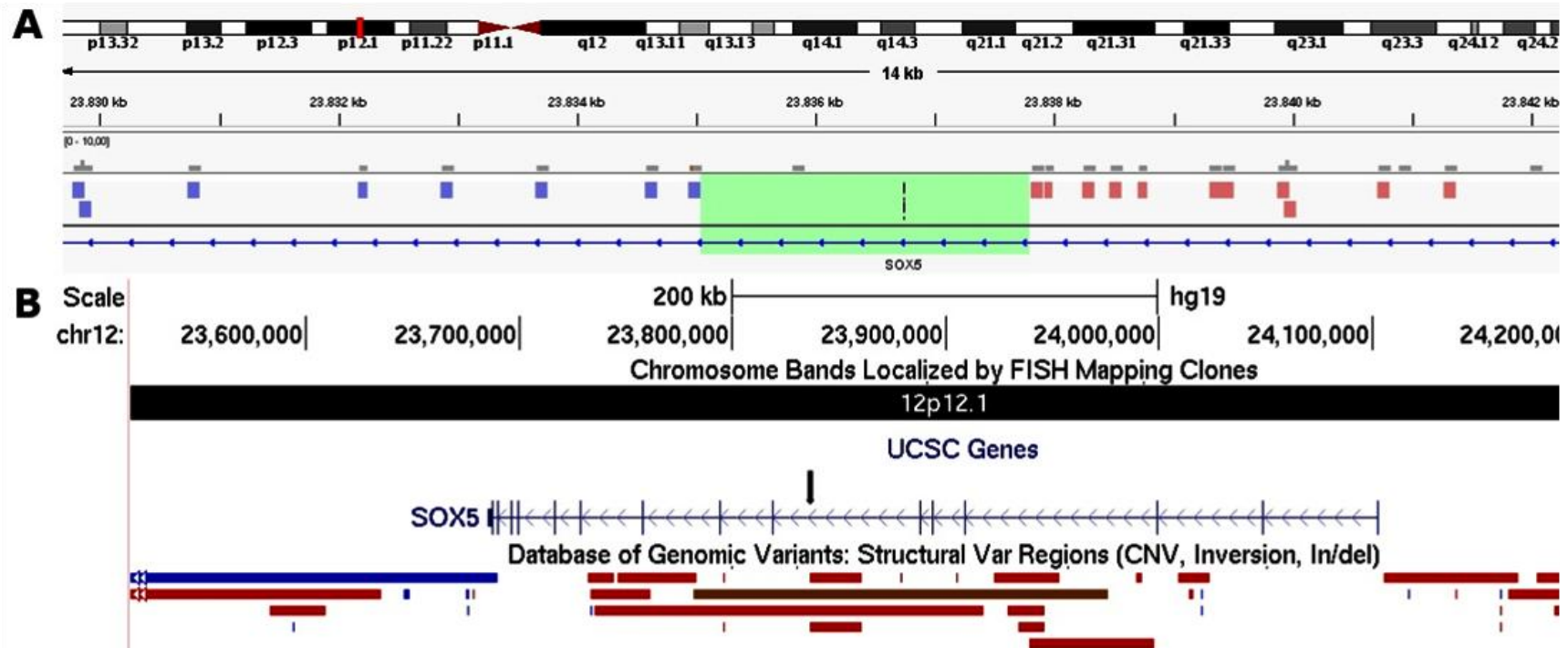


FIGURA VI.37: ins(2)ins(12;18) - Mapeamento por MPS do ponto de quebra em 12q12.1, que interrompeu o gene *SOX5*. A. Após alinhamento dos dados de MPS com genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes em 12q12.1 cujos pares se localizam em 18q21.33 (*reads* em azul) e 18q11.2 (*reads* em rosa). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. As regiões que contêm os pontos de quebra (em verde) foram delimitadas pelas *reads* discordantes, mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *SOX5* foi interrompido. B. O mapa do segmento 12q12.1 mostra que a quebra (apontada pela seta) interrompeu o gene *SOX5* entre os exons 10 e 11 (UCSC genes). As variações no número de cópias (CNV) descritas no DGV e mapeadas na região estão indicadas em vermelho (deleções) e azul (duplicações). (Adaptado de UCSC, hg 19).

caracterize por atraso de desenvolvimento neuropsicomotor moderado a grave, microcefalia, baixa estatura, hipotonia, dismorfismos faciais típicos e alterações em membros. No entanto, a região comum da síndrome não está alterada em nosso paciente.

Além dos genes mapeados na região da deleção do cromossomo 2, outros três genes (*SCN2A*, *FASTKD1*, *SOX5*) foram truncados pelas quebras que originaram o rearranjo complexo. O gene *SOX5* (*Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 5*), que tem 18 exons, foi interrompido pela quebra em 12p12.1 (Figura VI.37), que ocorreu em região intrônica, entre os exons 10 e 11. O genes da família SOXD de fatores de transcrição atuam em múltiplas vias de desenvolvimento, incluindo a formação da cartilagem (Aza-Carmona et al., 2011) e do sistema nervoso central (Kwan et al., 2008). A haploinsuficiência do gene *SOX5* causa deficiência intelectual, atraso na aquisição da fala, anomalias de comportamento e dismorfismos facias (Lamb et al., 2012). A variabilidade de quadros clínicos observada em portadores de deleções ou interrupção do *SOX5* pode estar associado a diferentes isoformas afetadas. Existem cinco isoformas da proteína; as quatro isoformas longas são altamente expressas em condrócitos, músculos estriados e cérebro fetal (Ikeda et al., 2002; Wunderle et al., 1996). A isoforma curta é expressa principalmente no testículo. Apenas a isoforma menor não foi afetada pela inserção no paciente que descrevemos. A ausência de algumas características associadas à haploinsuficiência do *SOX5*, como atraso de fala ou alterações de comportamento, no portador da ins(2), pode significar que a proteína truncada ainda mantenha parcialmente a sua função. Por outro lado, outro estudo com portadores de deleções do *SOX5* mostrou que apenas um dos três pacientes investigados tinha alterações de comportamento (Schanze et al., 2013). Apesar de o espectro clínico associado à haploinsuficiência do *SOX5* ainda precisar ser definido, a inativação do gene causa comprometimento intelectual aparecendo, portanto, como a principal causa do quadro clínico do portador da ins(2). Outro(s) gene(s) deletado(s) ou interrompido(s) podem contribuir para seu fenótipo. A limitação articular e a diminuição de massa muscular observada em nosso paciente não são características associadas ao *SOX5*, indicando a contribuição de outros genes.

Translocação t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1)

Paciente

A paciente foi encaminhada para avaliação genética, aos 2 anos de idade, por apresentar atraso de desenvolvimento neurospimotor, tetraplegia com hipotonia, lisencefalia, convulsões e dismorfismos faciais. As alterações visuais incluíam estrabismo, hipermetropia e nistagmo. O exame cromossômico revelou uma translocação complexa aparentemente equilibrada, no nível de resolução do bandamento G, com a participação dos cromossomos 1, 3, 12, 16 e 17 [Cariótipo: 46,XX,t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1). O exame cromossômico dos genitores da criança revelou cariótipos normais.

Investigação da translocação por aCGH e MPS.

A análise, utilizando aCGH, detectou duas deleções, uma de 43 kb no cromossomo 1, em 1p36.12 e a outra de 22 kb, no cromossomo 17, em 17p13.3 (Figuras VI.38 e VI.39; Tabela VI.73). A análise por MPS revelou a maior complexidade do rearranjo cromossômico, no qual foi identificada a participação do cromossomo 9. Foram detectadas, no total, 17 quebras: cinco no cromossomo 1 (em 1p36.32 e 1q21.2), uma no cromossomo 3 (em 3q21.1), uma no cromossomo 9 (9q34.2), duas quebras no cromossomo 12 (em 12p13.33), duas no cromossomo 16 (em 16p13.2) e seis quebras no cromossomo 17 (em 17p13.3) (Figura VI.40; Tabelas VI.71 e VI.72). As quebras foram localizadas em segmentos de 402 pb a 3.917 pb. As deleções detectadas por meio de aCGH foram confirmadas e seus pontos de quebra mapeados em segmentos de ~ 42 kb, em 1p36.12 e de ~ 32kb, em 17p13.3 (Figuras VI.38 a VI.39; Tabela VI.73). Seis dos 14 segmentos de junção do rearranjo sequenciados pelo método de Sanger (Tabelas VI.71 e VI.72). A análise por MPS e aCGH permitiu determinar a estrutura dos cromossomos derivativos 1, 3, 12, 16, 17 (Figura VI.41).

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

O gene *CLUH* no cromossomo 17 é o único mapeado no segmento das deleções (Figura VI.39; Tabela VI.73). Sete outros genes foram interrompidos, por quebras nos cromossomos 1 (*ARHGEF16* e *MTMR11*), 3 (*KALRN*), 12 (*CACNA2D4*) e 17 (*RPH3AL*, *ABR* e *PAFAH1B1*) (Figura VI.40; Tabela VI.71).

Tabela VI.71: Segmentos dos pontos de quebra da t(1;17;3;1;12;16), delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene truncado
PQ1(1)	1p36.32	chr1:3367656-3371461	3805	*	<i>ARHGEF16</i>
PQ1(2)	1p36.32	chr1:3386350-3389462	3112	*	<i>ARHGEF16</i>
PQ1(3)	1p36.12	chr1:20555399-20558399	3000	*	
PQ1(4)	1p36.12	chr1:20600800-20603800	3000	*	
PQ1(5)	1q21.2	chr1:149900725-149901974	1249	chr1:149901881-149901952	<i>MTMR11</i>
PQ3(1)	3q21.1	chr3:123752333-123754269	1936	*	<i>KALRN</i>
PQ9(1)	9q34.2	chr9:137150350-137154267	3917	*	
PQ12(1)	12p13.33	chr12:1637705-1640583	2878	chr12:1639450-1639469	
PQ12(2)	12p13.33	chr12:2017306-2019395	2089	chr12:2,019,214-2,019,264	<i>CACNA2D4</i>
PQ16(1)	16p13.2	chr16:9271339-9273233	1894	*	
PQ16(2)	16p13.2	chr16:9286519-9289231	2712	*	
PQ17(1)	17p13.3	chr17:169242-170476	1234	*	<i>RPH3AL</i>
PQ17(2)	17p13.3	chr17:890364-892539	2175	chr17: 890,827	
PQ17(3)	17p13.3	chr17:938055-940669	2614	*	<i>ABR</i>
PQ17(4)	17p13.3	chr17:2572145-2572892	747	*	<i>PAFAH1B1</i>
PQ17(5)	17p13.3	chr17:2588981-2589383	402	chr17:2,589,431	
PQ17(6)	17p13.3	chr17:2621594-2624843	3249	*	

*Segmento do ponto de quebra não foi sequenciado pelo método de Sanger

Tabela VI.72: Segmentos de junção das quebras da t(1;17;3;1;12;16) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
16(1)/1(2)	16(1)	-	1(2)	+	*
1(3)/1(4)	1(3)	-	1(4)	+	*
1(5)/17(5)	1(5)	-	17(4)	-	Ins:TCCT; Ins:ATGCCCTCATCC; Ins:CTCCTGCTGACCTGTAGTCC del1(5):del(A), dup1(5):T; dup1(5):CCCACTCAC; dup1(5):TCTTCA
17(4)/17(3)	17(4)	+	17(3)	-	*
17(2)/3(1)	17(2)	+	3(1)	+	**
1(1)/17(6)	1(1)	-	17(6)	+	*
9(1)/17(3)	9(1)	+	17(3)	+	*
17(4)/1(1)	17(4)	-	1(1)	+	*
1(2)/3(1)	1(2)	-	3(1)	-	*
12(1)/12(2)	12(1)	-	12(2)	-	ins(76pb); del 12(1):20pb; del12(2): 52 pb
12(1)/17(2)	12(1)	+	17(2)	-	del 12(1):20pb
17(1)/16(2)	17(1)	+	16(2)	+	*
1(5)/12(2)	1(5)	+	12(2)	+	del1(5):del(A); dup1(5):T; dup1(5):CCCACTCAC; dup1(5):TCTTCA del12(2): 52 pb
9(1)/16(2)	9(1)	-	16(2)	-	*

* Segmento de junção não foi sequenciado pelo método de Sanger

** Segmento de junção foi clonado por Sanger, mas não foram detectadas alterações

Tabela VI.73: t(1;17;3;1;12;16) - Deleções identificadas por aCGH e delimitados por MPS e genes mapeados nos intervalos das deleções.

Banda	Localização das deleções por aCGH (hg 19)	Tam. kb	Localização das deleções por MPS (hg 19)	Tam. kb	Genes
1p36.12	chr1:20555399-20599305	44	chr1:20558399-20600800	42	
17p13.3	chr17:2589516-2591714	22	chr17:2589383-2621594	32	<i>CLUH</i>

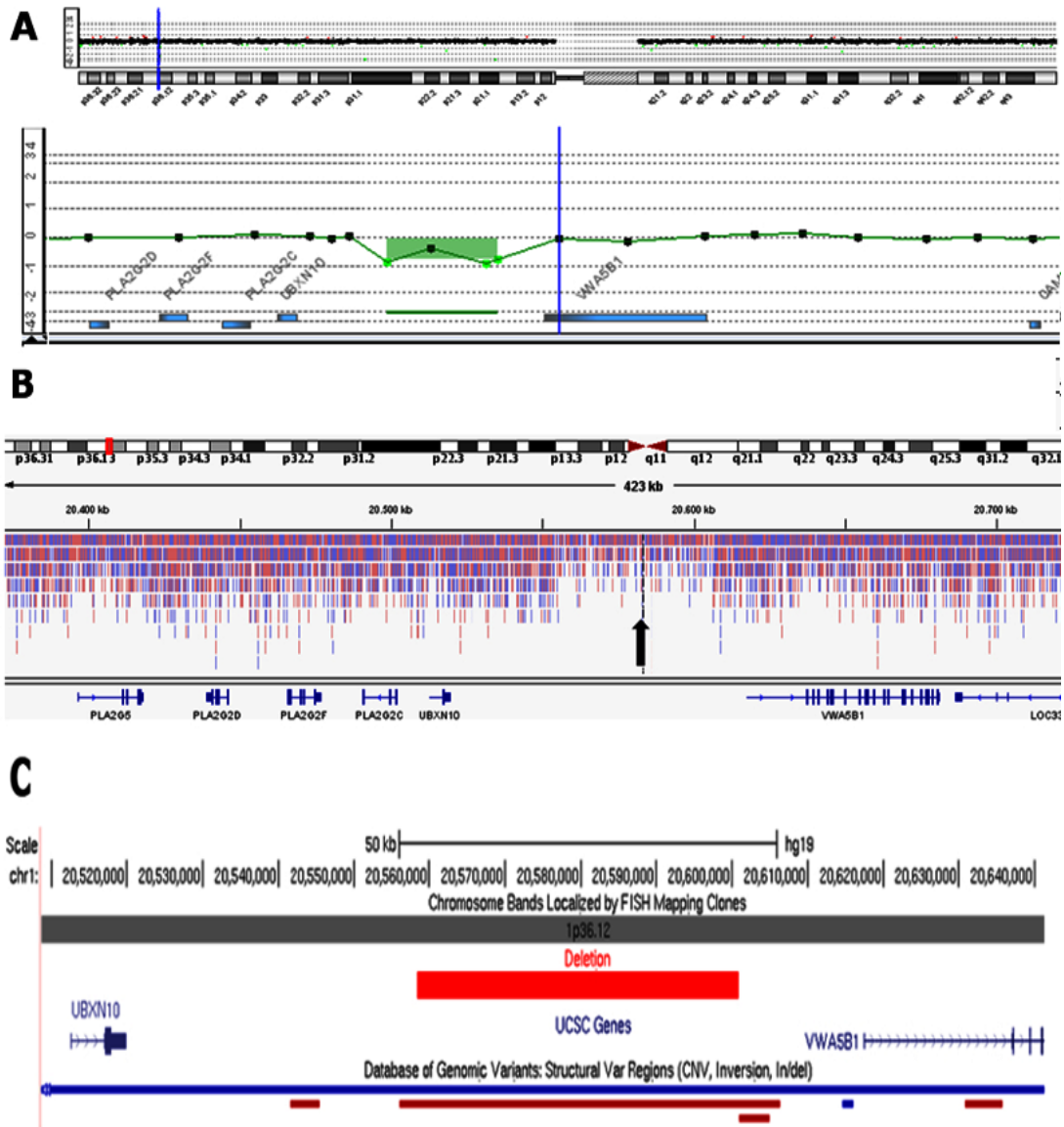


FIGURA VI.38: t(1;17;3;1;12;16) - Deleção no cromossomo 1 em 1p36.12. **A.** O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 1 evidencia segmento deletado no braço curto. O perfil da região 1p36.12 evidencia o segmento deletado de 43,9 kb. Oligonucleotídeos mapeados no segmento da deleção, em verde. **B.** O perfil do IGV Browser da região 1p36.12 mostra a redução da cobertura de *reads* (apontada pela seta) no alinhamento de *paired-reads* correspondentes à região da microdeleção, confirmando o resultado obtido por aCGH. **C.** O mapa do segmento que corresponde à região da deleção em 1p36.12 (em vermelho), mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeados na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

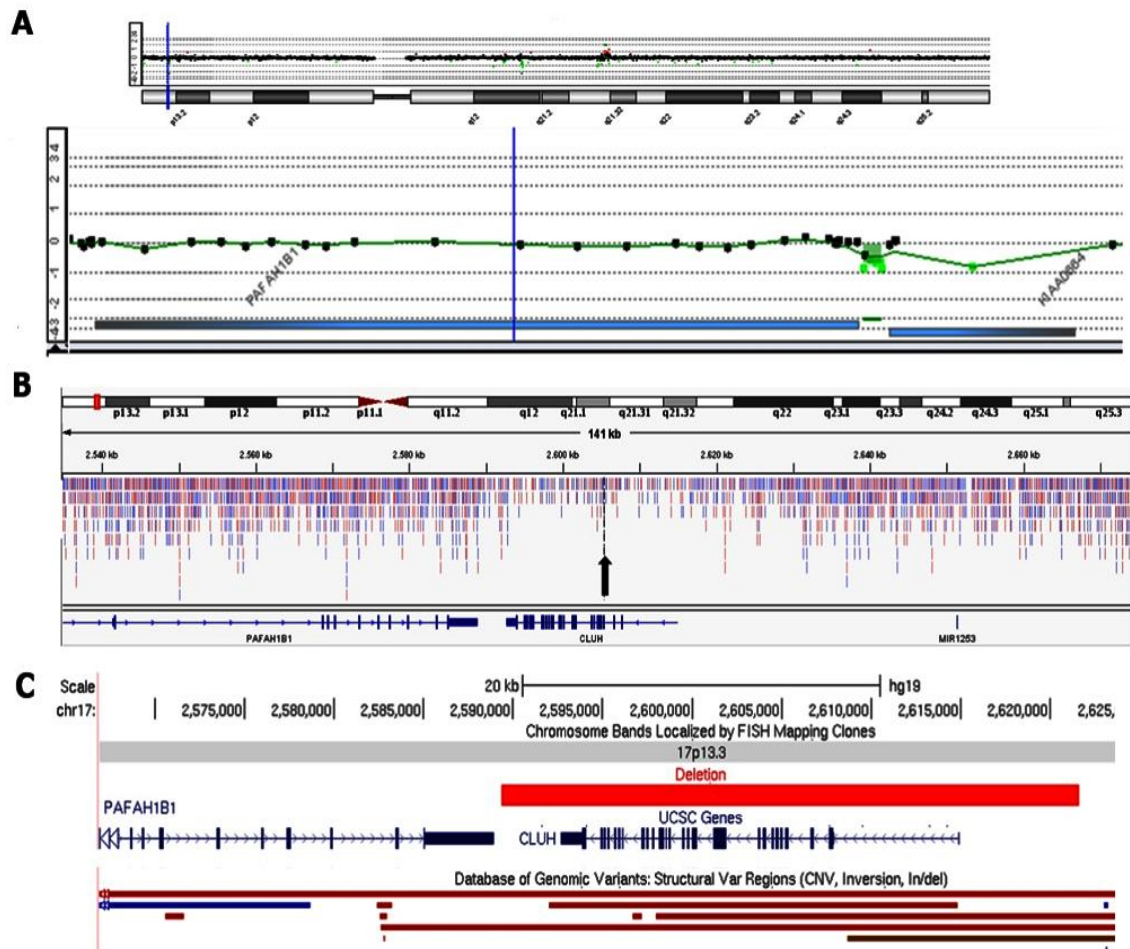


FIGURA VI.39: t(1;17;3;1;12;16) - Deleção no cromossomo 17 em 17p13.3. **A.** O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 17 evidencia segmento deletado no braço curto. O perfil da região 17p13.3 evidencia o segmento deletado de 21,9 kb. Oligonucleotídeos mapeados no segmento da deleção, em verde. **(B)** O perfil do IGV Browser da região 17p13.3 mostra a redução da cobertura de *reads* (apontada pela seta) no alinhamento de *paired-reads* correspondentes à região da microdeleção, confirmando o resultado obtido por aCGH. **(C)** O mapa do segmento que corresponde à região da deleção em 17p13.3 (em vermelho), mostra o gene *CLUH* (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeados na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants: Structural Var Regions (CNV, Inversion, In/del)). (Adaptado de UCSC, hg 19).

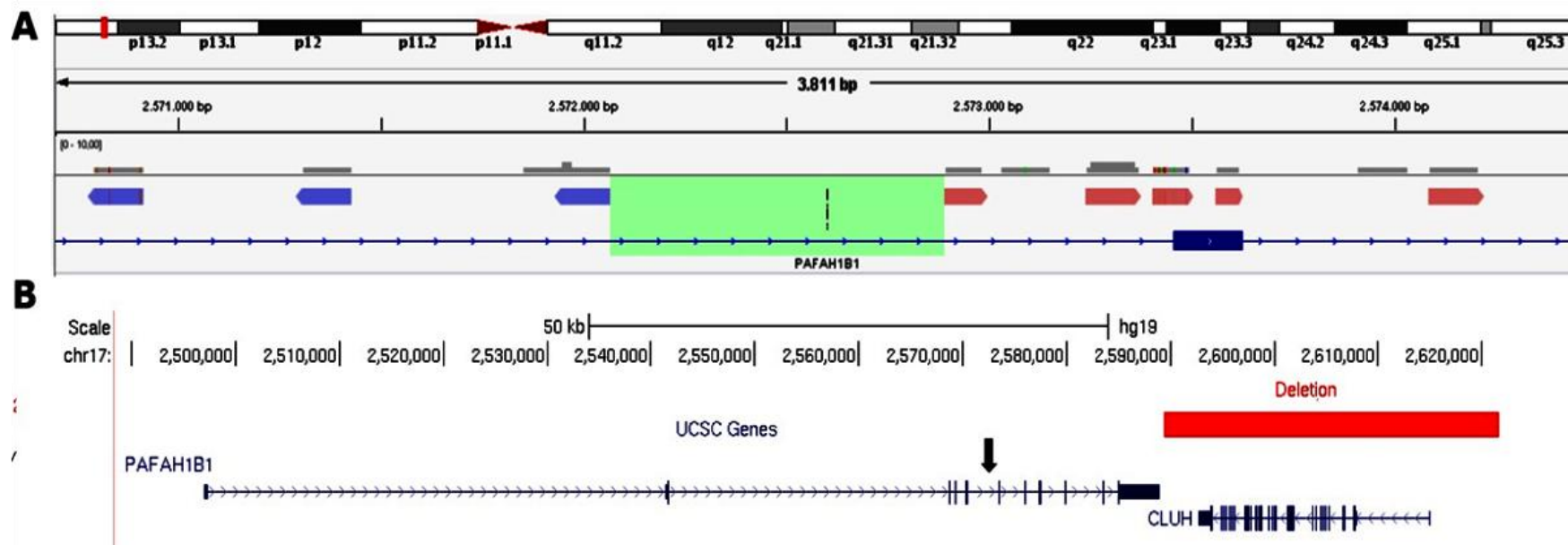


FIGURA VI.40. t(1;17;3;1;12;16) - Mapeamento por MPS do ponto de quebra em 17p13.1, que interrompeu o gene *PAFAH1B1*. (A) Após alinhamento dos dados de MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes em 17p13.3, cujos pares se localizam no cromossomo 1, em 1p36.32 (*reads* em azul) e no cromossomo 17, em 17p13.3 (*reads* em rosa). As *reads* em azul e rosa foram mapeadas, respectivamente, nas fitas negativas e positivas do DNA. A região que contém o ponto de quebra (em verde) foi delimitada pelas *reads* discordantes que foram mapeadas em fitas diferentes do DNA. O gene *PAFAH1B1* foi interrompido. **B.** O mapa do segmento 17p13.1 mostra que a quebra (apontada pela seta) interrompeu o gene *PAFAH1B1* entre os exons 5 e 6 (UCSC genes). As variações no número de cópias (CNV) descritas no DGV e mapeadas na região estão indicadas em vermelho (deleções) e azul (duplicações). (Adaptado de UCSC, hg 19).

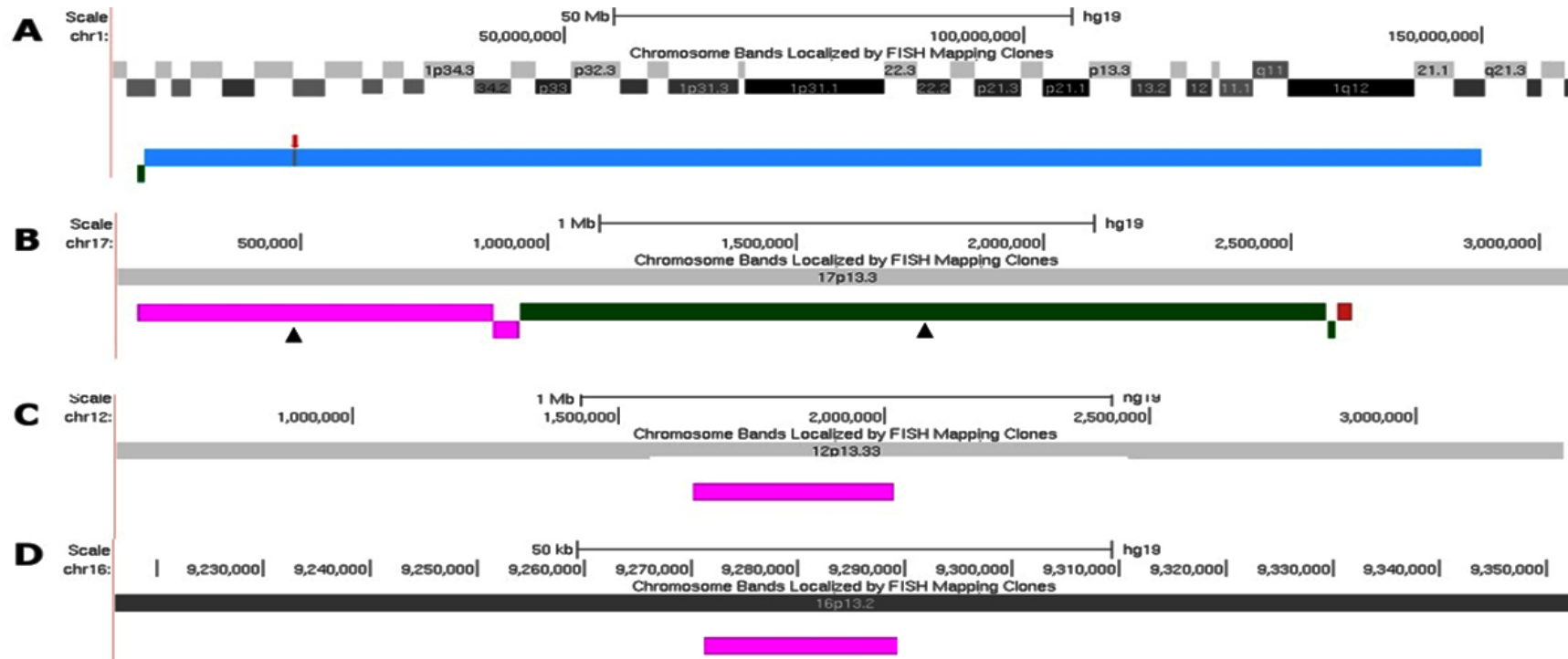


FIGURA VI.41: t(1;17;3;1;12;16) - Esquema ilustrativo da estrutura dos segmentos rearranjados dos cromossomo 1; 17; 12 e 16, após análise por aCGH e MPS. A. No cromossomo 1, ocorreram cinco quebras em 1p36.32, 1p36.12 e 1q21.2. Um dos fragmentos foi perdido (indicado pela seta vermelha). Duas quebras próximas, em 1p32.32, resultaram em um pequeno fragmento (em verde) que foi inserido no der(3). Os outros fragmentos (em azul) foram rearranjado no der(1). O segmento 1p36.32-pter, distal às quebras, foi translocado para o der(17). O segmento 1q21.2-qter, distal às quebras, foi translocado para o der(12). **B.** No cromossomo 17, ocorreram seis quebras, em 17p13.3. Os fragmentos menores (em rosa) foram inseridos em posição invertida no braço longo do der(1). Outro fragmento maior de 17p13.3 (em verde, indicado pela seta) foi inserido em posição invertida no braço curto do der(16). O maior fragmento de 17p13.33pter, distal às cinco quebras, que ocorreram no cromossomo 17. **C.** No cromossomo 12, ocorreram duas quebras em 12p13.33. O segmento entre as quebras (em rosa) foi inserido no der(16), em posição invertida, e o segmento 12p13.33-pter foi translocado também para o der(16). **D.** No cromossomo 16, ocorreram duas quebras em 16q13.2. O segmento entre as quebras foi inserido no der(9) e o segmento 16p32.2-pter, distal às quebras, foi translocado para o der(1). Os cromossomos 3 e 9 não foram representados. No cromossomo 3 a quebra ocorreu em 3q21.1; o segmento distal à quebra foi translocado para o braço longo der(1). No cromossomo 9 a quebra ocorreu em 9q34.2; o segmento distal à quebra foi translocado para o braço longo do der(3).

Relação da translocação t(1;17;3;1;12;16) com o quadro clínico do portador

As análises realizadas mostraram que a translocação aparentemente equilibrada no nível do bandamento G, na verdade, é muito mais complexa, com quebras adicionais e perdas de segmentos cromossômicos, afetando oito genes. Para a maioria desses genes, desconhece-se o efeito clínico da perda de função em heterozigose. O gene *KALRN* (*Kalirin, RhoGEF Kinase*), interrompido no ponto de quebra do cromossomo 3, pode estar relacionado a doença arterial coronariana de manifestação precoce (CHDS5; MIM 608901), tendo Wang et al. (2007) observado associação entre um SNP localizado no intron 1 do gene (rs9289231) e a doença. Não há indícios, entretanto, de que a perda de função do gene cause a doença. Porém, não podemos afastar a possibilidade de a paciente, que tinha apenas dois anos de idade na avaliação clínica, desenvolvê-la futuramente. O rearranjo presente na paciente também levou à interrupção do gene *CACNA2D4* (*Calcium Channel, Voltage-Dependent, Alpha 2/Delta Subunit 4*) no cromossomo 12, cuja perda de função em heterozigose não tem efeito clínico. A homozigose quanto a uma mutação de perda de função no gene *CACNA2D4* foi relatada como causa de uma forma de distrofia de cone (RCD4; MIM 610478), doença retiniana diagnosticada em dois irmãos; os heterozigóticos eram fenotipicamente normais (Wycisk et al., 2006).

Em decorrência de umas das quebras que originou a translocação, o gene *PAFAH1B1* (platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1) foi truncado no cromossomo 17 (Figura V.40). O gene contém 11 exons; a quebra ocorreu entre os exons 5 e 6. A haploinsuficiência do gene *PAFAH1B1* mapeado em 17p13.3 estão relacionadas a lisencefalia clássica ou do tipo I (LIS) (Lo Nigro et al., 1997). A lisencefalia clássica é uma malformação causada por defeito de migração neuronal durante o desenvolvimento embrionário, que resulta em agiria e/ou paquigiria cortical em regiões do córtex cerebral. A doença é caracterizada por córtex anormalmente espesso ou pouco organizado em quatro lâminas primitivas, heterotopia neuronal difusa, ventrículos aumentados e dismórficos e, frequentemente, hipoplasia do corpo caloso. Assim, a perda de função do gene *PAFAH1B1* deve ser a principal causa do quadro clínico da portadora da translocação complexa. O efeito de outros genes afetados pelo rearranjo não pode, contudo, ser descartada.

- **Inserção ins(1)(q32.1p21p34.1)**

Paciente

A paciente foi encaminhada para avaliação genética, aos onze meses de idade, por apresentar atraso de desenvolvimento neuropsicomotor leve, braquicefalia, estrabismo convergente, hipoplasia de pequenos lábios e ânus anteriorizado. Apresentava também dismorfismos faciais: fendas palpebrais oblíquas para o alto, nariz pequeno com narinas antevertidas. A análise cromossômica após bandamento G revelou a inserção de um segmento do braço longo do cromossomo 1 em seu braço curto do cromossomo, ins(1)(q32.1p21p34.1). Esse rearranjo no nível de resolução do bandamento G era aparentemente equilibrado. O exame cromossômico dos genitores da criança têm revelou cariótipos normais.

Investigação da inserção por aCGH.

A análise por aCGH revelou uma deleção de 494 kb em 1p21.2 (Tabela VI.74, Figura VI.42). Os pontos de quebra da inserção não foram investigados por FISH ou MPS.

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Nove genes codificadores de proteína e um de RNA não codificador estão mapeados no segmento da deleção (*PALMD*, *FRRS1*, *AGL*, *SLC35A3*, *HIAT1*, *SASS6*, *CCDC76*, *LRR39*, *DBT*) (Tabela VI.74; Figura VI.42).

Table VI.74: ins(1)(q32.1p21p34.1) – Deleção identificada por aCGH e genes mapeados no intervalo.

Banda	Localização da deleção por aCGH (hg 19)	Tam. (kb)	Genes
1p21.2	chr1:100104421-100699040	494	<i>PALMD</i> , <i>FRRS1</i> , <i>AGL</i> , <i>SLC35A3</i> , <i>HIAT1</i> , <i>SASS6</i> , <i>CCDC76</i> , <i>LRR39</i> , <i>DBT</i>

A inserção ins(1) e o quadro clínico do portador

Nove genes estão incluídos no segmento perdido do cromossomo 1. O quadro clínico da portadora pode, portanto, resultar do efeito conjunto da perda/quebra de vários genes. Entre os nove genes deletados, três foram relacionados a doença. Mutações no gene *AGL* (*glycogen debranching enzyme*) e *DBT* (*dihydrolipoamide*

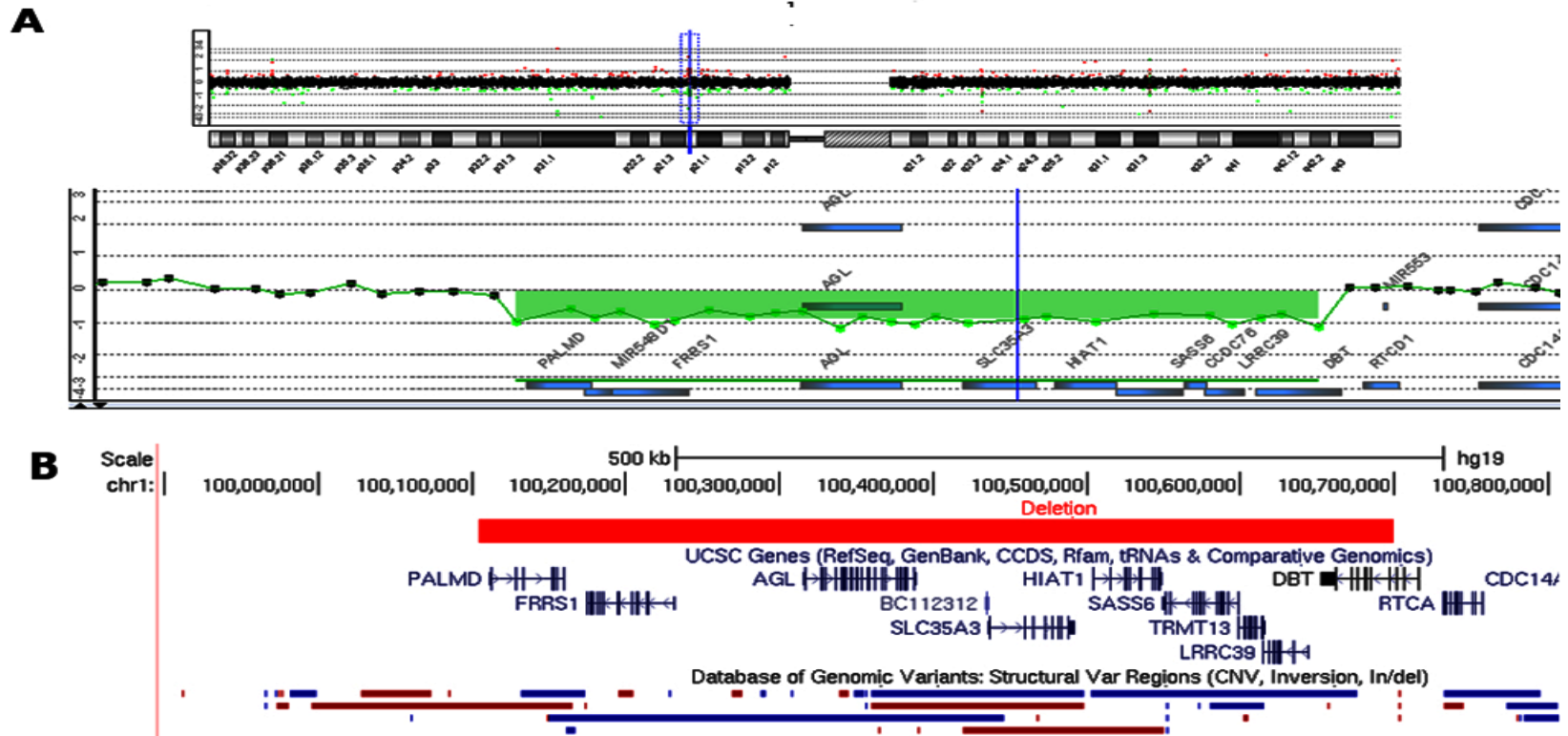


FIGURA VI.42: ins(1)(q32.1p21p34.1) - Deleções no cromossomo 1 em 1p21.2. **A.** Acima, o perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 1 evidencia o segmento deletado no braço longo. Abaixo, o perfil da região 1p21.2 evidencia segmento deletado de 494 kb. Oligonucleotídeos mapeados na região da deleção, em verde. **B.** O mapa do segmento que corresponde à região da deleção em 1p21.2 (em vermelho), mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) mapeados na região (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

branched chain transacylase E2) causam doenças recessivas, de depósito de glicogênio tipo I e da urina do xarope do bordo, respectivamente. Mutações no gene *SLC35A3* (*solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3*), em homozigose, causa deficiência intelectual, artrogripose e convulsões, os heterozigóticos sendo clinicamente normais (Edvardson et al., 2013). Para os outros genes do segmento deletado em 1p21.2, desconhece-se o efeito clínico de mutações em heterozigose. Apesar da ausência de genes candidatos, a complexidade do rearranjo sugere relação causal com o quadro clínico da portadora. Fica ainda a possibilidade de o rearranjo ter truncados genes, pois não investigamos os pontos de quebra da inserção.

VI.3.4. Rearranjo cromossômico associado a microdeleções e microduplicações

- **Inserção ins(16)(p13.1q23q12.1)**

Paciente

O paciente foi encaminhado para avaliação, aos 7 dias de vida, por apresentar deficit pômdero-estatural, microcefalia, hipospádia, polegar aduzido à esquerda e com implantação anômala e pés tortos. Os dismorfismos faciais incluíam orelhas rodadas posteriormente, anti-hélice proeminente à esquerda, fendas palpebrais oblíquas para baixo e relativa retrognatia. As mãos tinham pregas de flexão únicas. A avaliação clínica, aos 7 meses de idade levou à suspeita de síndrome de Townes-Brocks (TBS). O exame cromossômico realizado após bandamento G, revelou uma inserção do cromossomo 16: um segmento do braço longo do cromossomo 16 foi inserido em seu braço curto - ins(16)(p13.1q23q12.1). O exame cromossômico dos genitores da criança revelou cariótipos normais.

Investigação da inserção por aCGH e MPS.

A análise, utilizando aCGH, detectou duas deleções: uma em 16q22.1 (486 kb) e outra, em q22.1-q23.1 (5.78 Mb) (Figura VI.45; Tabela VI.76). A análise também detectou quatro duplicações - em 16p13.3 (178 kb), em 16p12.3 (221kb), em 16p11.2-p11.1 (245 kb) e em 16q23.1 (219 kb), e duas duplicações em 16q24.1 (29 kb e 470 kb) (Tabela VI.76; Figuras VI.43 a VI.44). A duplicação em 16p11.2-p11.1 está mapeada

em região em que várias duplicações estão descritas no DGV, e, portanto, essa deve ser uma variante benigna.

A análise por MPS revelou a complexidade da inserção que é, na verdade, um rearranjo com mais de 20 quebras cromossômicas, todas localizadas no cromossomo 16. Cinco duplicações detectadas por meio de aCGH foram confirmadas e a localização de seus pontos de quebra, refinada (Tabelas VI.75 e VI.76). A duplicação em 16q23.1 e as deleções em 16q22.1 e 16q22.1-q23.1 não puderam ter seus pontos de quebras mapeados por MPS, pois uma ou as duas quebras associadas a essas deleções ou duplicações estão localizadas em regiões de LCR. Por alinharem com várias regiões do genoma, as *reads* mapeadas em LCR são descartadas ao serem alinhadas com o genoma de referência. No entanto, a diminuição e o aumento da cobertura das *reads*, respectivamente, nas regiões dessas deleções e duplicações, confirmou os resultados obtidos por aCGH.

A inserção *ins*(16) originou-se, portanto, a partir de 24 quebras: vinte delas identificadas por MPS e mais quatro quebras, identificadas apenas por aCGH. Os 20 pontos de quebra identificados por MPS foram mapeados em segmentos de 187 pb a 8.586 pb (Tabela VI.76). Com exceção de uma duplicação em tandem, os outros segmentos duplicados foram inseridos em outras regiões do cromossomo 16 derivativo, três deles inseridos em posição invertida.

Genes afetados pelo rearranjo cromossômico

Cinquenta e dois genes estão incluídos nos segmentos perdidos e 20 estão incluídos nos segmentos duplicados (Tabela VI.76). Além disso, oito genes foram interrompidos pelas quebras no cromossomo 16: quatro genes foram truncados nos pontos de quebra das duplicações (*CIQTNF8*, *C16orf45*, *uc021tel.1* e *GSG1L*); quatro genes foram interrompidos nos pontos de quebras de inserções ou inversões (*MGRN1*, *PPL*, *XYLT1* e *VATIL*) e um gene foi interrompido no ponto de quebra de uma das deleções (Tabela VI.75).

A inserção *ins*(16) e o quadro clínico do portador

A caracterização da *ins*(16) por aCGH e MPS mostrou que a inserção citogeneticamente equilibrada é, na verdade, muito mais complexa, tendo sido formado a partir de 24 quebras, estando associada a oito desequilíbrios submicroscópicos (seis duplicações e duas deleções). A extensão das deleções e duplicações variou entre 29 kb

VI.75: Segmentos dos pontos de quebra da ins(16), delimitados por MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. (pb)	Gene truncado
16(1)	16p13.3	chr16:1143837-1145552	1715	<i>CIQTNF8</i>
16(2)	16p13.3	chr16:1326655-1328496	1841	
16(3)*	16p13.3	chr16:4724271-4724544	273	<i>MGRN1</i>
16(4)*	16p13.3	chr16:4934216-4935436	1220	<i>PPL</i>
16(5)	16p13.11	chr16:15598918-15607504	8586	<i>C16orf45</i>
16(6)*	16p12.3	chr16:17328199-17330226	2027	<i>XYLT1</i>
16(7)*	16p12.3	chr16:17566154-17570446	4292	
16(8)	16p12.2	chr16:21589189-21589420	231	<i>uc021tel.1</i>
16(9)	16p12.2	chr16:22710417-22713130	2713	
16(10)	16p12.1	chr16:27988190-27990812	2622	<i>GSGIL</i>
16(11)	16p11.2	chr16:34195979-34199637	3658	
16(12)*	16p11.1	chr16:34391787-34392957	1170	
16(13)*	16p11.1	chr16:34757409-34757596	187	
16(14)	16q11.2	chr16:46499366-46503031	3665	
16(15)	16q12.1	chr16:51374515-51376526	2011	<i>VATIL</i>
16(16)*	16q22.1	chr16:70307586-70311018	3432	
16(17)*	16q23.1	chr16:77910155-77917094	6939	
16(18)	16q24.1	chr16:85232808-85234679	1871	
16(19)*	16q24.1	chr16:85322854-85325763	2909	
16(20)*	16q24.1	chr16:86020876-86023301	2425	

*Quebras que resultaram em deleções ou duplicações.

e 5,7 Mb. Setenta e dois genes estão mapeados nos segmentos deletados ou duplicados e outros nove genes foram truncados pelos pontos de quebra. Para a maioria desses genes, desconhece-se o efeito clínico de mutações em heterozigose. Dentre os 81 genes alterados pelo rearranjo, 13 já foram associados a doenças (*ROGDI*, *SEPT12*, *XYLT1*, *COG4*, *DHODH*, *ZFH3*, *CHST6*, *FA2H*, *CHST6*, *KARS*, *TMEM231*, *IRF8* e *AARS*). A maioria dessas doenças são causadas por mecanismo de herança recessiva, sendo os heterozigóticos clinicamente normais; outros genes estão relacionados ao desenvolvimento de câncer. Apenas mutações em heterozigose no gene *AARS* (*alanyl-tRNA synthetase*), que foi truncado por um dos pontos de quebra da ins(16), são

patogênicas, estando presentes em afetados pela doença neurológica de Charcot-Marie-Tooth tipo 2 (CMT2N). Estas são provavelmente apenas mutações de ganho de função (Latour et al., 2010; McLaughlin et al., 2012), o que é indicativo de que a perda do gene em nosso paciente, com apenas dois anos de idade na avaliação clínica, não cause a doença.

A avaliação clínica da portadora da inserção ins(16) levou à suspeita de síndrome de Townes-Brocks (TBS), doença dominante caracterizada por malformações auriculares, de membros, renal e anal, frequentemente associadas a perda auditiva. A síndrome é causada pela haploinsuficiência do gene *SALL1*, mapeado em 16q12 (Kohlhase et al., 1998). A região codificadora do gene *SALL1* não foi afetada pelas alterações detectadas por aCGH ou MPS. No entanto, um dos pontos de quebra ocorreu a 180 kb 5' desse gene (Figura VI.46). A quebra ocorreu no mesmo domínio topológico do *SALL1* definido em hESC (Dixon et al., 2012), apontando para a possibilidade de alteração de sua região reguladora. Essa hipótese encontra apoio em translocação anteriormente descrita associada à TBS, na qual a quebra no cromossomo 16 também ocorreu aproximadamente 180 kb 5' do gene *SALL1* (Marlin et al., 1999). As alterações do cromossomo 16 detectadas em nosso paciente e a descrita por Marlin et al. (1999) podem ter interrompido elemento(s) regulador(es) ou os separado do gene *SALL1*, levando à alteração de sua expressão e ao fenótipo clínico. A extensa região sem genes *upstream* ao *SALL1* contém vários elementos não codificadores conservados (*conserved non-coding elements*, CNE) (Figura VI.46). Vários CNE nessa região induziram a expressão de gene repórter em embriões de camundongos (VISTA Enhancer Browser), sugerindo que sejam elementos reguladores do *SALL1*. A reavaliação clínica do paciente portador dessa inserção complexa revelou, no entanto, um quadro clínico mais grave em comparação com outros pacientes afetados pela síndrome de Townes-Brocks. O paciente apresenta atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e dismorfismos faciais que não são observados na síndrome. Apesar de não haver genes claramente candidatos entre os 81 alterados pelo rearranjo, o efeito conjunto de perda/ganho de vários genes, deve estar contribuindo para um quadro clínico mais grave.

Tabela VI.76: ins(16)- Deleções e duplicações identificadas por aCGH e delimitadas por MPS e genes mapeados nos intervalos das deleções e duplicações.

CNV	Banda	Localização da deleção ou duplicação por aCGH (hg 19)	Tam. (kb)	Localização da deleção ou duplicação por MPS (hg 19)	Tam. (kb)	Genes
Dup	16p13.3	chr16:4753026-4931019	178	chr16:4724544-4934216	209	<i>MGRN1, NUDT16L1, ANKS3, C16orf71, ZNF500, SEPT12, LOC440335, ROGDI, GLYR1, UBN1, PPL</i>
Dup	16p12.3	chr16:17339544-17560685	221	chr16:17330226-17566154	235	<i>XYLT1</i>
Dup [§]	16p11.2 -p11.1	chr16:34482131-34727365	245	chr16:34392957-34757409	364	<i>LOC283914, LOC146481, LOC100130700</i>
Del	16q22.1	chr16:70322823-70809280	486	*		<i>AARS, DDX19B, DDX19A, ST3GAL2, FUK, COG4, SF3B3, SNORD111B, SNORD111, IL34, MTSS1L, VAC14</i>
Del	16q22.1-q23.1	chr16:71205541-76989164	5783	*		<i>HYDIN, FTSJD1, CALB2, ZNF23, ZNF19, CHST4, TAT, MARVELD3, PHLPP2, AP1G1, SNORD71, ATXN1L, ZNF821, KIAA0174, PKD1L3, DHODH, HTA, PSMD7, LOC283922, CLEC18B, GLG1, RFWD3, MLKL, FA2H, WDR59, ZNRF1, LDHD, ZFP1, CTRB2, CTRB1, BCAR1, CFDP1, TMEM170A, CHST6, CHST5, TMEM231, GABARAPL2, ADAT1, KARS, TERF2IP, CNTNAP4</i>
Dup	16q23.1	chr16:77671477-77890426	219	*		<i>NUDT7, VATIL</i>
Dup	16 q24.1	chr16:85282361-85312181	29	chr16:85234679-85322854	88	Não há
Dup	16 q24.1	chr16:85541469-86011888	470	chr16:85325763-86020876	695	<i>KIAA0182, GINS2, C16orf74, MIR1910, COX4NB, COX4I1, IRF8</i>

* Um ou os dois segmentos dos pontos de quebra da deleção ou duplicação estão localizados em regiões LCR. Ao serem alinhadas com o genoma de referência, *reads* mapeadas em LCR alinham com várias regiões do genoma e são descartadas.

[§] Corresponde a duplicação descrita no DGV.

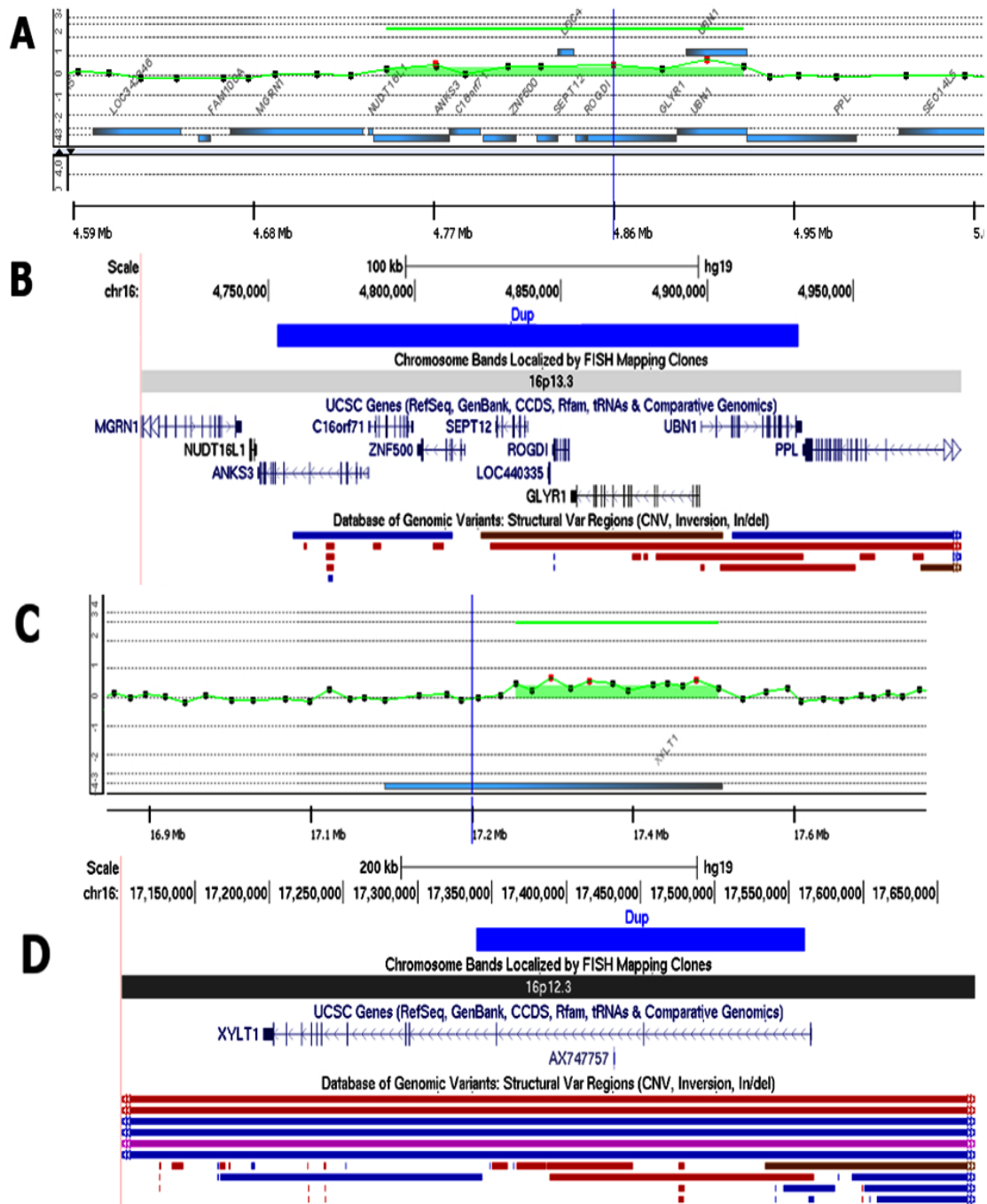


FIGURA VI.43: ins(16)(p13.1q23q12.1) - Duplicações localizadas no braço curto do cromossomo 16. A e C. Os perfis de aCGH (Plataforma 180K) das regiões **A.** 16p13.3 e **C.** 16p12.3 evidenciam segmentos duplicados de 177 e 221 kb, respectivamente. Oligonucleotídeos mapeados em região de duplicação, em vermelho. **B e D.** Os mapas dos segmentos que correspondem às duplicações (em azul) em **(B)** 16p13.3 e **(D)** 16p12.3 mostram os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV) (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

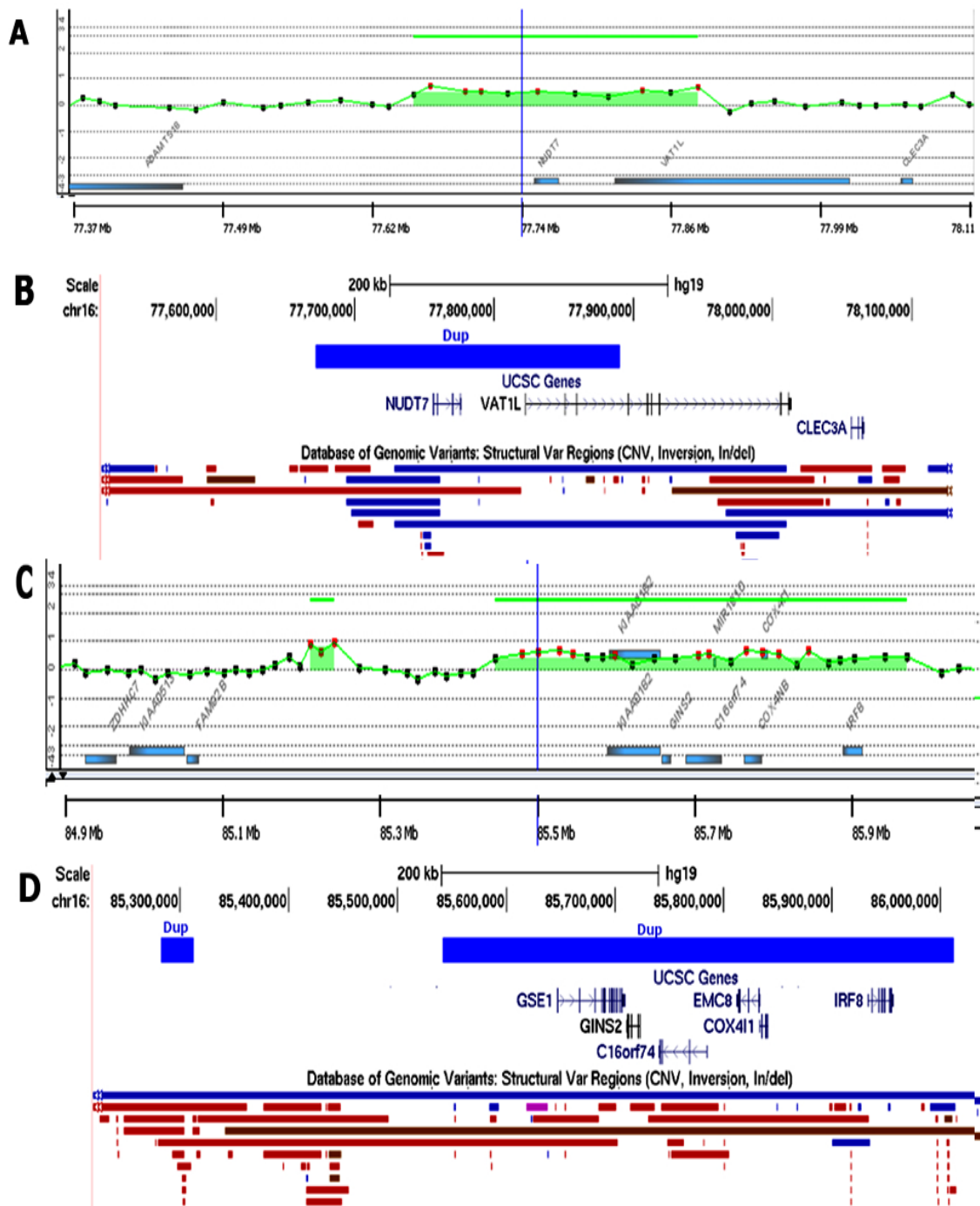


FIGURA VI.44: ins(16)(p13.1q23q12.1) - Duplicações localizados no braço longo do cromossomo 16. A e B. Perfis de aCGH (Plataforma 180K) evidenciam: (A) em 16q23.1, um segmento duplicado de 218kb; (C) em 16q24.1, dois segmentos duplicados de 29 e 270 kb, separados por um segmento sem alteração no número de cópias. Oligonucleotídeos mapeados nas regiões das duplicações, em vermelho. **B e D.** Os mapas dos segmentos que correspondem às regiões das duplicações (em azul), em (B) 16q23.1 e (D) em 16q24.1, mostram os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV); (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

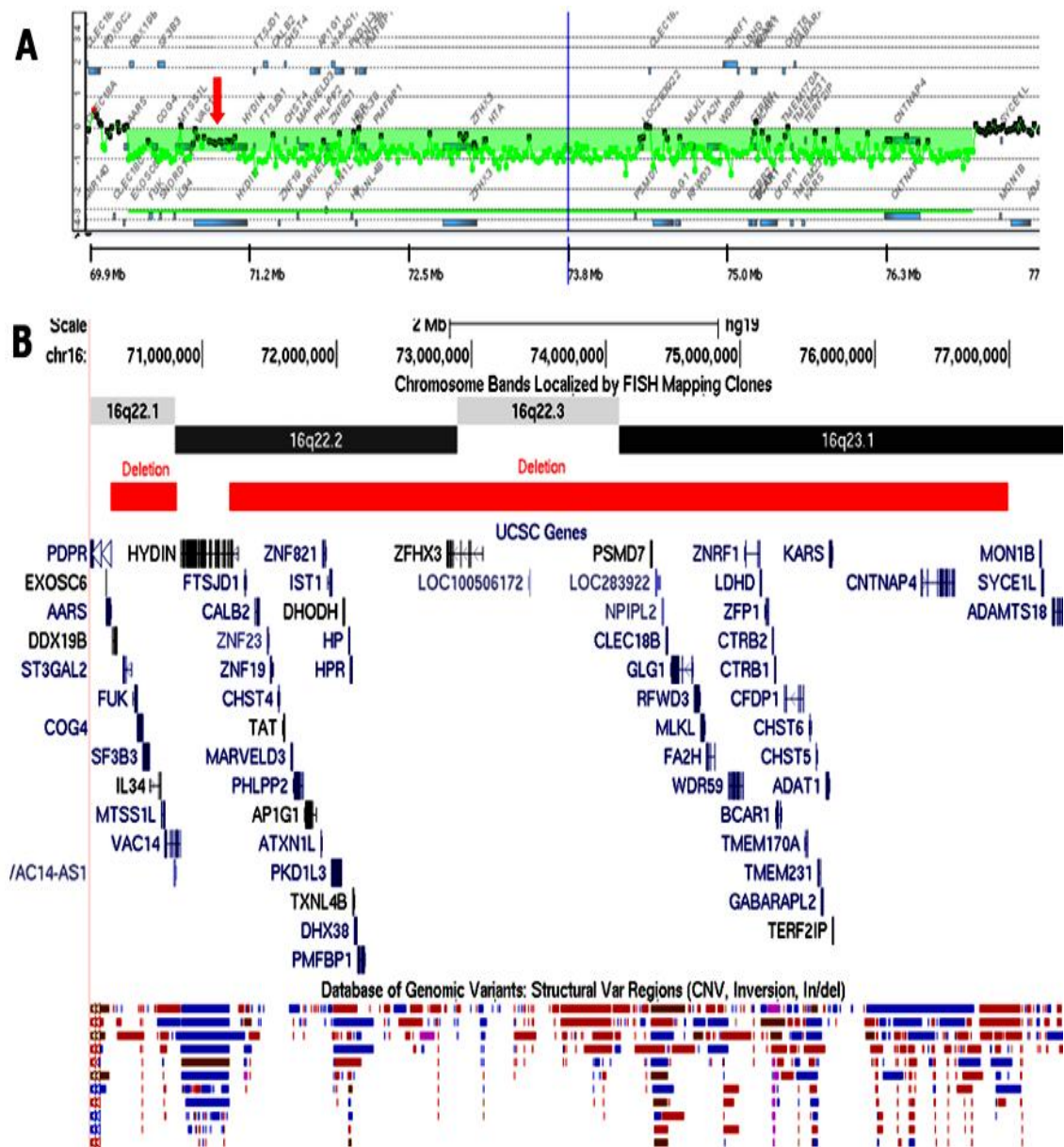


FIGURA VI.45: ins(16)(p13.1q23q12.1) - Deleções localizados no braço longo do cromossomo 16. A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) da região 16q22.1-16q23.1 evidencia dois segmentos deletados de 486 kb e 5,78 Mb separados por um segmento sem alteração no número de cópias (apontado pela seta vermelha); oligonucleotídeos mapeados nas regiões de deleção, em verde. **B.** O mapa do segmento que corresponde à região da deleção em 16q22.1-16q23 (em vermelho) mostra os genes (UCSC genes) e as variações no número de cópias (CNV); (deleções: vermelho; duplicações: azul; deleções e duplicações: marrom) (Database of Genomic Variants). (Adaptado de UCSC, hg 19).

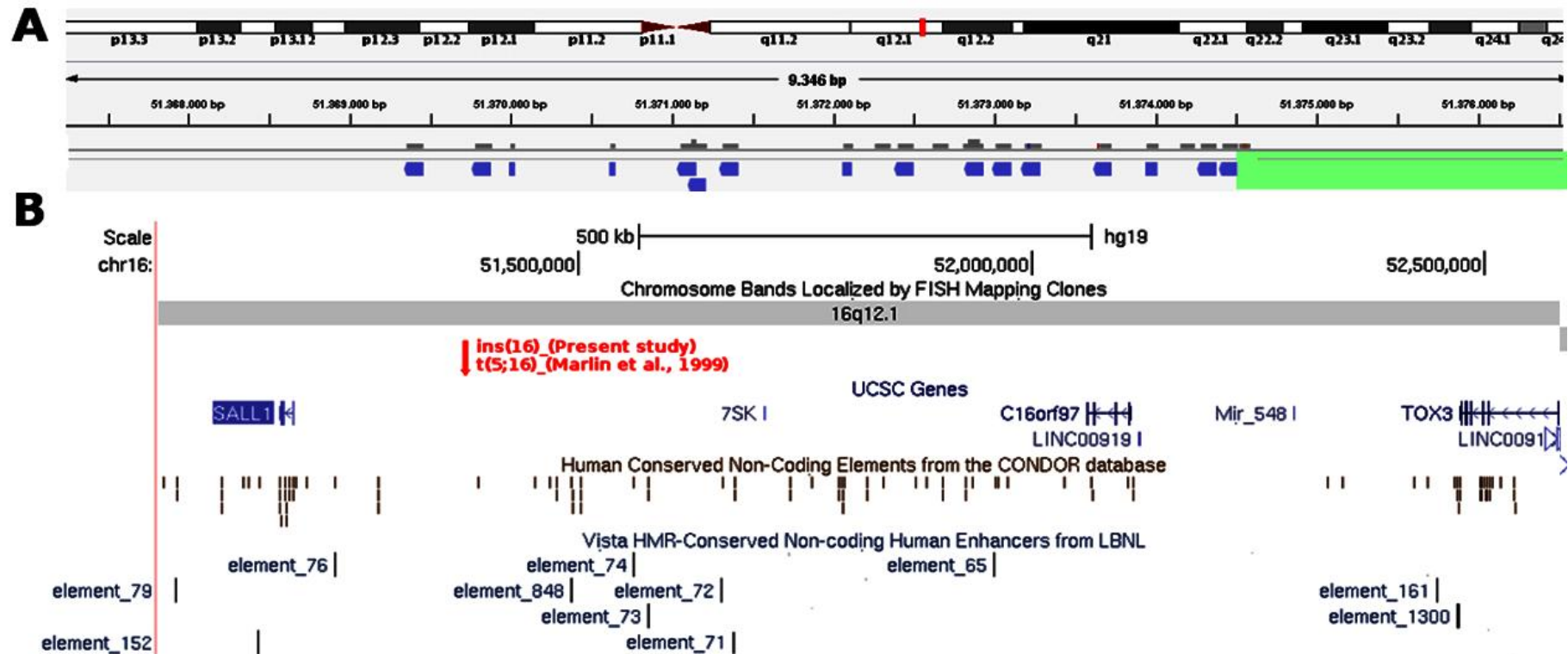


FIGURA VI.46: Análise por MPS da região de uma das quebras da ins(16), em 16q12.1, 180 kb *upstream* ao gene *SALL1*, que provavelmente leva à alteração de sua expressão. A. Após alinhamento dos dados de MPS com o genoma de referência, o perfil do IGV Browser mostra as *reads* discordantes (em azul) mapeadas na região 16q12.1. O segmento que contém o ponto de quebra está representado em verde. **B.** O mapa do segmento mostra que a quebra em 16q12 ocorreu em região desprovida de genes (UCSC Genes). Nesse mesmo segmento ocorreu a quebra da translocação t(5;16) descrita por Marlin et al (1999) em paciente com a síndrome de Townes-Brocks. Elementos não codificadores conservados (Human Conserved Non-Coding elements from the CONDOR database) estão representados. Vários elementos conservados testados apresentaram atividade de *enhancers*, induzindo a expressão de gene repórter em embriões de camundongos (elements 65, 71-74, 848, 161, 1300) (VISTA HMR-Conserved Non-coding Human Enhancers from LBNL); são candidatos a controlar a expressão do gene *SALL1*. A inserção do cromossomo 16 e a translocação t(5;16) podem ter afastado o gene *SALL1* de um ou mais elementos reguladores e alterado a sua expressão.

VI.4 Conclusões

Aliando MPS e aCGH no estudo de rearranjos esporádicos ou herdados de genitores afetados, detectados em probandos com diferentes quadros clínicos, foi possível indicar o mecanismo que impacta o fenótipo de 16 dos 33 rearranjos investigados; em outro paciente uma deleção independente do rearranjo era responsável pelo fenótipo.

Os resultados mostram que deleções ou duplicações de genes (detectadas em 11 dos 33 casos investigados) e/ou a interrupção de genes sensíveis a dosagem (*TCF4*, *NKX2-1*, *DYRKY1A*, *SETBP1*, *CNTNAP2*, *SOX5* e *PAFAH1B1*; detectados em oito dos 33 casos investigados) são a causa dos quadros clínicos. Em três rearranjos, a alteração da região reguladora de genes próximos a quebra - deleção (*GRIA3*) ou interrupção (*FOXG1*, *SALL1*), seriam a principal causa do fenótipo dos portadores.

Além de genes já relacionados a doença, identificamos dois genes, cujas mutações foram previamente consideradas como candidatas a causar comprometimento intelectual, o *SYNCRIP*, deletado em 6q13 no portador da t(6;7), e o *GRIK3*, deletado em 1p34.3 no portador da t(1;2), fornecendo assim evidência adicional de que esses genes estejam relacionados a deficiência intelectual.

Entre os pacientes nos quais a relação entre o rearranjo e o fenótipo permanece incerta, ressaltamos duas translocações que interrompem genes que podem ser novos candidatos (*ESCO1*, *ANKRD19P*).

Apesar de não afetar a estrutura de genes, a t(2;16) indica que a interrupção do domínio topológico do gene *EPHAD4* no cromossomo 2 pode causar malformações de membros, conforme demonstrado em estudos anteriores.

MATERIAL SUPLEMENTAR.

Tabela VI.S1: Os oito rearranjos citogeneticamente equilibrados e o fenótipo dos portadores, nos quais a análise por aCGH não revelou alterações nos cromossomos rearranjados ou em outro cromossomo e não foi possível o mapeamento das quebras por FISH ou MPS.

BCR*	Cariótipo (Bandamento G)	Fenótipo
A13**	46,XX,t(9;20)(q21.11;q13.31)	Atraso de fala e atraso de aprendizagem
A14	46,XX,t(X;22)(q22;p11)	Deficiência intelectual
A18	46,XX,t(X;5)(p21.1;p13.2)	Atraso do desenvolvimento neuromotor, deficiência intelectual e microcefalia
A19	46,XY,t(1;4)(q32.3;q35),t(3;13)(p24.2;q21.2)	Deficiência intelectual e distúrbios faciais
A24	46,XY,t(3;15)(p21.3;q15)	Deficiência intelectual
A27**	46,X,t(X;17)(q11.2;q11.2)	Atraso de aprendizado, hipotonia axial e anomalias pigmentárias sugestivas de hipomelanose de Ito
A28**	46,XX,inv(18)(p11.2q11.2)	Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, hemiplegia, microcefalia e déficit auditivo
B3**	46,XY,inv(7)(p12q22.1)mat	Ectrodactilia em pés, hiper mobilidade de ombros; genitora com ectrodactilia e atraso de aprendizado

* De acordo com a Tabela III.1

** Não foi possível caracterizar os pontos de quebra por MPS, provavelmente devido à presença, nas regiões das quebras, de sequências altamente repetitivas ou de sequências repetidas no genoma.

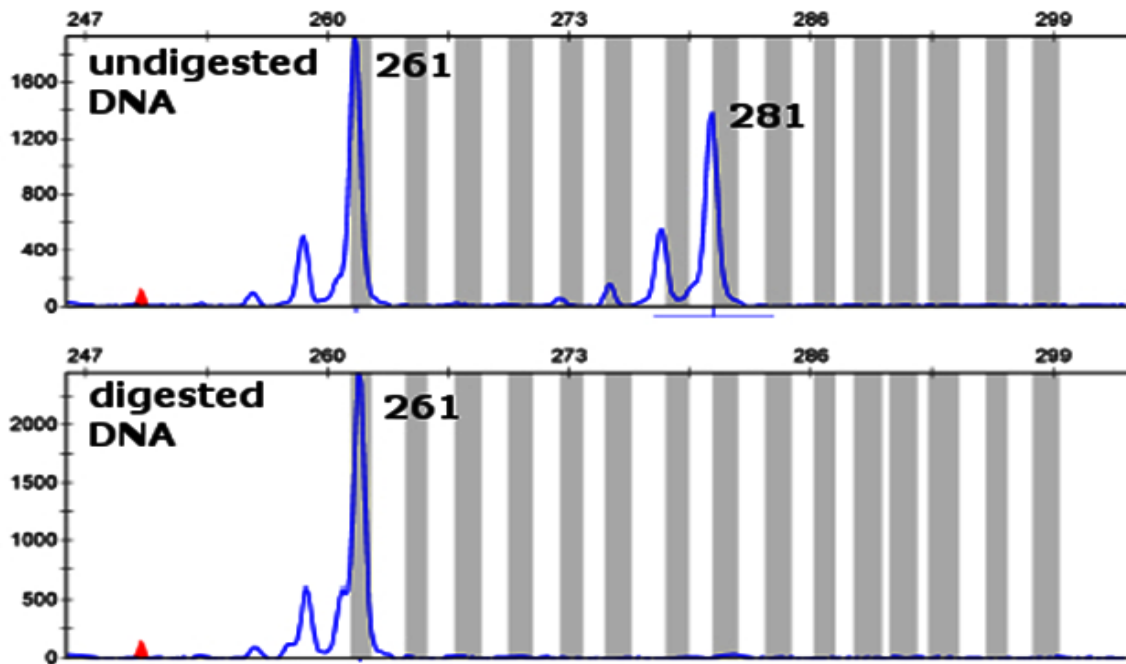


FIGURA VLS1: t(X;5)(p21.1;p13.2) - Padrão de inativação do cromossomo X, determinado com base na metilação do gene AR. Os alelos foram amplificados a partir do DNA genômico não digerido (acima) e digerido (abaixo) pela enzima *HpaII*, sensível à metilação. Após digestão, apenas o alelo metilado, no X inativo, foi amplificado. A razão de inativação (100:0) mostrou que o mesmo alelo está inativo em 100% das células..

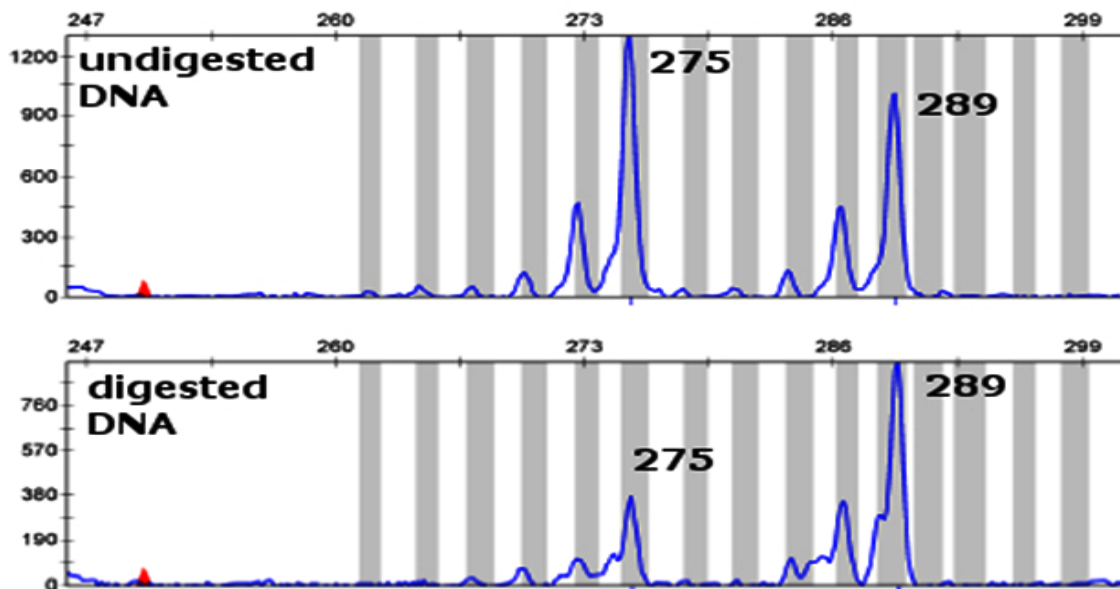


FIGURA VLS2: t(X;17)(q11.2;q11.2) - Padrão de inativação do cromossomo X, determinado com base na metilação do gene AR: Os alelos foram amplificados a partir do DNA genômico, não digerido (acima) e digerido (abaixo) pela enzima *HpaII*, sensível à metilação. Após digestão, apenas o alelo metilado, no X inativo, foi amplificado. A razão de inativação (23:77) mostrou que o mesmo alelo está inativo em 77%.

**VII. A COMPLEXIDADE DE UM REARRANJO
CROMOSSÔMICO FAMILIAL ASSOCIADO
A PERDAS E GANHOS DE SEGMENTOS
SUBMICROSCÓPICOS**

VII. A COMPLEXIDADE DE UM REARRANJO CROMOSSÔMICO FAMILIAL ASSOCIADO A PERDAS E GANHOS DE SEGMENTOS SUBMICROSCÓPICOS.

VII.1 Introdução

Apesar de a maioria dos portadores de rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados serem clinicamente normais, cerca de 7% dos rearranjos equilibrados esporádicos estão associados a alterações fenotípicas. A aplicação de microarrays de DNA ao estudo desses rearranjos tem revelado a complexidade de muitos deles, que incluem microdeleções e duplicações próximas aos pontos de quebra ou neles próprios e que podem explicar os fenótipos alterados (Gribble et al., 2005; De Gregori et al., 2007; Sismani et al., 2008). O estudo de rearranjos familiares que segregam com o quadro clínico facilita a identificação de genes causadores de doença em virtude dos vários indivíduos afetados portadores da alteração cromossômica (Duba et al., 2002; David et al., 2003). No entanto, rearranjos familiares associados a comprometimento intelectual ou malformações congênitas são raros. Nesse trabalho, investigamos um rearranjo cromossômico familiar identificado na análise após bandamento G como uma translocação equilibrada - $t(2;22)(p14;q12)$, que segregava com quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizado associados a dismorfismos craniofaciais e alterações de mãos. A combinação das análises por FISH, aCGH e MPS revelaram que se tratava, na verdade, de rearranjo complexo entre os cromossomos 2, 5 e 22, incluindo 10 quebras: um segmento de 1,42 Mb de 2p14 inseriu-se no braço curto do cromossomo 5; no cromossomo derivativo der(22) um segmento adicional de 6,64 Mb de 5q23.2-23.3 inseriu-se no ponto de quebra; além da inserção do segmento 2p14, no der(5), também foi detectada uma deleção de 1,47 Mb em 5p15.1. O cromossomo der(5) continha ainda mais três segmentos rearranjados em seu braço curto. A segregação de diferentes desequilíbrios submicroscópicos em indivíduos afetados e clinicamente normais permitiu a compreensão da variabilidade clínica observada na família.

VII.2 Pacientes e métodos

VII.2.1 Pacientes

O probando (III-4, Figura VII.1), filho de pais não consanguíneos, nasceu por operação cesareana, com peso de 2.640 g (5^o percentil). Nos primeiros cinco meses de

idade, teve problemas para alimentar-se, com regurgitações frequentes. Sentou sem apoio aos oito meses e andou com um ano e quatro meses de idade. Teve atraso na aquisição da fala, falando apenas palavras isoladas até quatro anos de idade. Examinado no Serviço de Aconselhamento Genético LGH-USP, aos seis anos de idade, sua estatura era de 117 cm (entre os 50^o e 75^o percentis) e seu peso era de 22 kg (entre 50^o e 75^o percentis). Apresentava turricefalia, fâcies achatada, testa curta; sinófris, esboço de epicanto, distância intercantal interna de 28,4 mm (entre 50^o e 75^o percentil), distância intercantal externa de 80 mm (entre 50^o e 75^o percentil), cílios longos, ponte nasal baixa, palato alto e estreito; orelhas pequenas e de implantação baixa e hipoplasia da cartilagem auricular. As mãos apresentavam braquidactilia, sindactilia e clinodactilia de 5^o dedo; havia prega palmar única na mão esquerda. A distância entre os 1^o e 2^o artelhos estava aumentada, em ambos os pés. Tinha dificuldade de aprendizado. Reexaminado aos 15 anos de idade, sua estatura era de 164 cm (25^o percentil), peso de 62,9 kg (75^o percentil) e perímetro cefálico de 55 cm (50^o percentil). Continuava com dificuldades escolares e fora encaminhado para avaliação fonoaudiológica.

A mãe e o irmão mais velho do probando apresentavam sinais clínicos semelhantes ao dele, tendo o irmão dificuldade de aprendizado mais marcante. O irmão mais novo do probando era clinicamente normal.

O irmão mais velho do probando (III-3) nasceu por operação cesareana, a termo, pesando 3.250 g (entre os 25^o e 50^o percentis). Andou com um ano e dois meses de idade. O exame clínico, aos oito anos, revelou estatura de 135 cm (percentil 90^o) e peso de 33 kg (entre os percentis 90^o e 97^o). Apresentava turricefalia, fâcies achatada, testa alta, esboço de sinófris, epicanto, distância intercantal interna de 30 mm (entre 50^o e 75^o percentil) e externa de 82 mm (entre os percentis 75^o e 97^o), ponte nasal baixa, palato alto e estreito e orelhas de implantação baixa. As mãos apresentavam braquidactilia, além de clinodactilia de 5^{os} dedos. Tinha dificuldade de aprendizado grave. Reexaminado aos 17 anos de idade, a estatura era de 174 cm (entre os 25^o e 50^o percentis), o peso, de 71,2 kg (entre os 25^o e 75^o percentis). O paciente tinha graves dificuldades escolares.

Aos 32 anos, a mãe do probando (II-4) tinha estatura de 155 cm (entre o 10^o e o 25^o percentis) e peso de 73 kg (entre os percentis 90^o e 97^o). Apresentava turricefalia, hipoplasia da porção média da face, orelhas de implantação baixa com lobo hipoplásico, ligado e com fissuras, ponte nasal baixa, boca com cantos voltados para baixo,

braquidactilia e clinodactilia de 5^o dedos, bilateralmente. Teve dificuldade de aprendizado, cursando até a 8^a série do ensino fundamental.

A avó materna (I-2), um tio (II-6) e uma tia (II-3) do probando também apresentavam sinais clínicos semelhantes aos dos outros membros afetados da família e graus variáveis de dificuldade de aprendizado, sendo o tio mais afetado. Essas pessoas não foram examinadas pela equipe médica do Serviço de Aconselhamento Genético LGH-USP, que pôde apenas avaliar suas fotografias. A avó do probando faleceu aos 77 anos, devido a problemas cardíacos.

O exame cromossômico realizado em linfócitos de sangue periférico após bandamento G identificou em todos os membros afetados da família uma translocação recíproca entre o braço curto do cromossomo 2 e o braço longo do cromossomo 22 $t(2;22)(p14;q12)$ (Figura VII.1). A translocação não estava presente no irmão fenotipicamente normal do probando.

VII.2.2 Metodologia

FISH, aCGH e MPS foram realizados conforme descrito no Capítulo III – Pacientes e Métodos.

VII.3 Resultados

Em estudo anterior do laboratório, os pontos de quebra da translocação foram mapeados utilizando FISH (Fonseca, Tese de doutorado, IB-USP, 2005). O gene *SLC1A4* está contido nesse segmento [*solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4*] que, portanto, foi interrompido pela quebra no cromossomo 2. No cromossomo 22, o ponto de quebra foi mapeado, em 22q12.2, num segmento de aproximadamente 22 kb.

Prosseguimos a análise da translocação em nosso mestrado, com a busca de duplicações e deleções submicroscópicas, por meio de a-CGH. No probando (III-4), foram detectadas duas alterações no cromossomo 5: uma deleção de 1,4 Mb em 5p15.1 (Figura VII.2, Tabela VII.1) e uma duplicação de 6,6 Mb em 5q23.2–q23.3 (Figura VII.3, Tabela VII.1). A hibridação de sondas mapeadas no segmento duplicado do braço longo do cromossomo 5 mostrou que a sequência adicional estava inserida no ponto de quebra do cromossomo derivativo 22, der(22) (Figura VII.3). A investigação dessas alterações do cromossomo 5 foi realizada em outros membros da família por aCGH ou FISH. A deleção no cromossomo 5 foi detectada na avó (I-2), na mãe (II-4) e na tia (II-

3) do probando, todas afetadas, mas também em seu irmão clinicamente normal (III-5); não estava, entretanto, presente em dois indivíduos afetados, o tio (II-6) e o irmão (III-3) do probando (Figura VII.1). Portanto, a deleção em 5p15.1 não segregava com o quadro clínico na família. Por outro lado, a duplicação no braço longo do cromossomo 5 estava segregando com o quadro clínico, juntamente com a translocação: estava presente em todos os afetados, mas não no irmão clinicamente normal do probando. A análise por aCGH revelou que o irmão afetado (III-3) do probando possui, além da duplicação em 5q23.2-q23.3, uma deleção de um segmento de 1,2 Mb, em 2p14 (Figura VII.4). Na família, somente o tio (II-6) do probando também era portador dessa deleção (Figura VII.4B). Entretanto, uma duplicação desse segmento do cromossomo 2 foi detectada por aCGH no irmão fenotipicamente normal (III-5) do probando. FISH da sonda RP11-263L17 (chr2:65,420,105-65,745,898), mapeada na região duplicada, revelou, além dos sinais nos braços curtos dos cromossomos 2, um sinal adicional no braço curto do cromossomo 5. Portanto, o segmento de 2p14 adicional inseriu-se no cromossomo 5 (Figura VII.4C). No probando e em sua mãe, tia e avó, o segmento de 2p14 também estava inserido em um dos cromossomos 5. Denominamos de der(5) esse cromossomo 5 com a inserção.

A complexidade desse rearranjo mostrou a necessidade de investigá-lo neste trabalho por MPS, que foi realizado utilizando-se amostra de DNA do probando. A deleção e duplicação do cromossomo 5 foram confirmada por MPS e suas extensões foram delimitadas, em segmentos de 1,47 Mb e 6,64 Mb, respectivamente (Tabelas VII.1-VII.3). Os pontos de quebra do cromossomo 2 e 22, previamente delimitados por FISH foram refinados em segmentos de < 6kb (Tabela VII.2). A análise por MPS revelou que o braço curto do der(5) era mais complexo, com três pontos de quebra adicionais que resultaram em três segmentos rearranjados no braço curto. Assim a análise por MPS da t(2;5;22) confirmou os dados obtidos por aCGH e FISH e identificou maior complexidade no cromossomo 5 rearranjado (Figura VII.1A).

Ao elucidar a estrutura dos cromossomos derivativos pudemos compreender a segregação desses cromossomos e os diferentes desequilíbrios submicroscópicos detectados nos membros da família (Figura VII.1B). Os cromossomos der(2), der(5) e der(22), foram detectadas na probando (III-4), em sua genitora (II-4), tia materna (II-3) e avó materna (I-2), que eram, portanto, portadores da deleção em 5p15.1 e de uma duplicação do segmento 5q23.2-q23.3. O irmão afetado (III-3) e o tio materno (II-6) herdaram apenas os cromossomos der(2) e der(22), e portanto, são, portadores de

deleção em de 2p14 e da duplicação do segmento 5q23.2-q23.3; o irmão clinicamente normal (III-5) herdou o der(5), explicando assim a duplicação do segmento de 2p14 e a deleção em 5p15.1 que possui.

Todos os afetados os afetados da família eram portadores da duplicação de 6,67 Mb do segmento do braço longo do cromossomo 5 inserido no der(22). Como a super expressão do gene *LMNB1*, mapeado no segmento duplicado, causa leucodistrofia autossômica dominante do adulto (ADLD), avaliamos a expressão do *LMNB1* por PCR em tempo real quantitativo e não detectamos expressão aumentada no probando ou em sua genitora (Figura VII.6). Os genes *FBN2* e *MARCH3*, também mapeados no segmento duplicado, apresentaram expressão aumentada no probando e em sua genitora (Figura VII.6).

VII.4 Discussão

Estudamos uma aparente t(2;22)(p14;q12) familiar que segregava com quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizado associados a dismorfismos craniofaciais e alterações de mãos. A identificação de duplicações e deleções submicroscópicas por meio de a-CGH e o mapeamento das quebras por FISH e MPS revelaram que se tratava, na verdade, de rearranjo complexo entre os cromossomos 2, 5 e 22, incluindo 10 quebras (Figura VII.1). Todos os afetados da família eram portadores dos cromossomos derivativos der(2) e der(22). O der(5) não segregava com o quadro clínico, tendo sido detectado em indivíduo fenotipicamente normal da família. Os dois indivíduos mais afetados da família, não possuem o der(5), e portanto, possuem deleção do segmento de 2p14 inserido nesse cromossomo. Quatro genes estão mapeados no segmento de 1,42 Mb em 5p15.1, que está deletado em quatro portadores da translocação e no irmão fenotipicamente normal do probando (Figura VII.2). De acordo com o DGV, a região contém algumas CNV, e a deleção pode constituir variante rara, sem significado para o desenvolvimento.

Em consequência da presença do der(22), todos os afetados são portadores da duplicação de 6,64 Mb do braço longo do cromossomo 5 (5q23.2-q23.3) (Figuras VII.1 e VII.3). Os 18 genes duplicados são candidatos para o quadro clínico, por aumento da dosagem de seus produtos. Há na literatura alguns relatos de duplicações parciais puras do cromossomo 5, que incluem o segmento 5q23.2-q23.3 (revisão em Schmidt et al., 2013). Todas elas, entretanto, são duplicações extensas (maiores do que 14 Mb), não permitindo a comparação dos quadros clínicos com aquele da família aqui relatada.

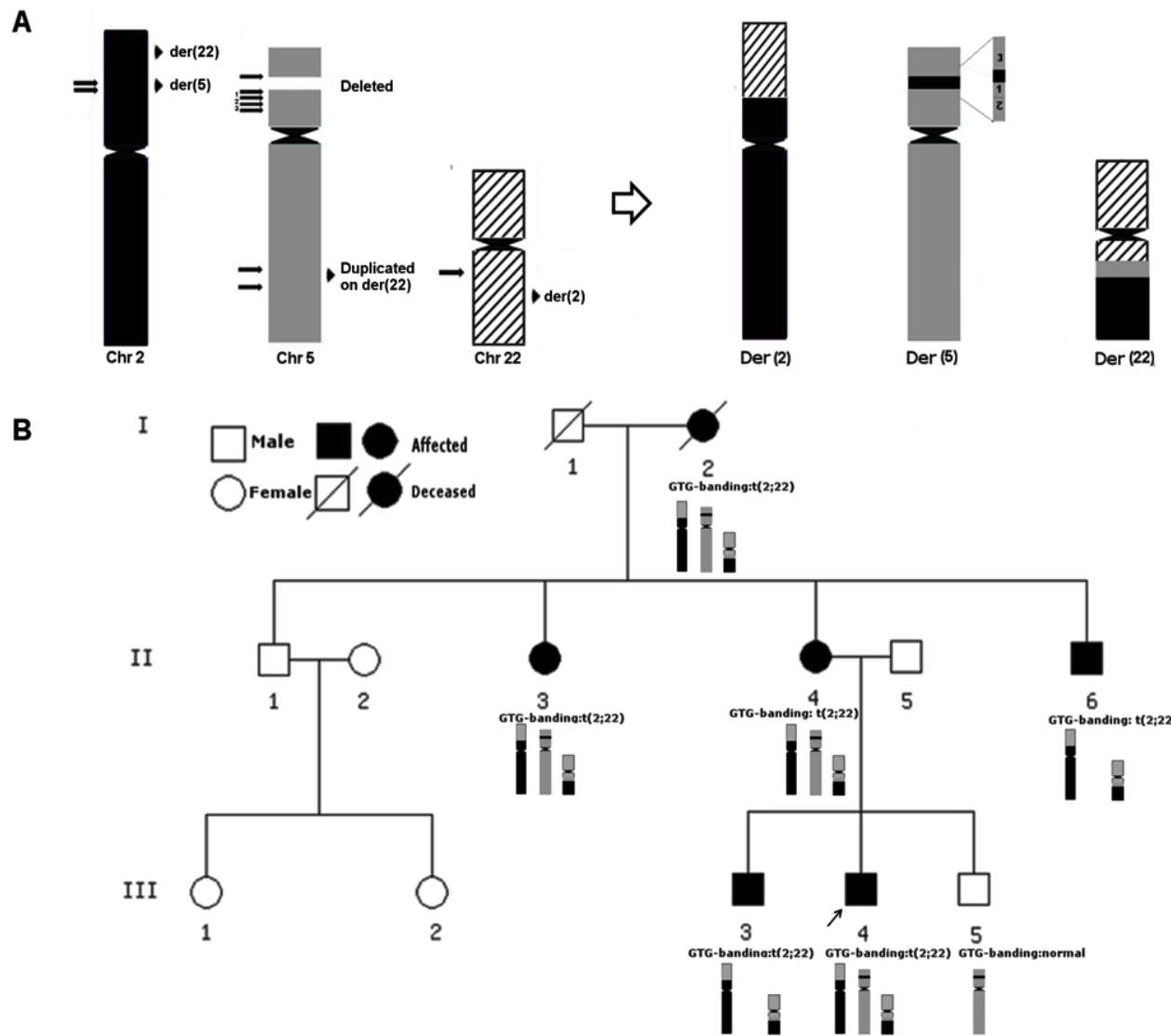


Figura VII.1: A estrutura dos cromossomos derivativos 2, 5 e 22, e sua segregação na família portadora da t(2;22): (A) A combinação das análises por FISH, aCGH e MPS revelaram que se tratava, na verdade, de rearranjo complexo entre os cromossomos 2, 5 e 22, incluindo 10 quebras: um segmento de 1,4 Mb de 2p14 inseriu-se no braço curto do cromossomo 5; no cromossomo derivativo der(22) um segmento adicional de 5q23.2-23.3 inseriu-se no ponto de quebra; além da inserção do segmento 2p14, no der(5) também foi detectada uma deleção de 1,4Mb em 5p15.1. O cromossomo der(5) continha ainda mais três segmentos rearranjados em seu braço curto, um desses fragmentos foi inserido em posição invertida. (B) Os cromossomos der(2), der(5) e der(22), foram detectadas no probando (III-4), em sua genitora (II-4), tia materna (II-3) e avó materna (I-2), que, portanto, eram portadores da deleção em 5p15.1 e de uma duplicação do segmento 5q23.2-q23.3; o irmão afetado (III-3) e o tio materno (II-6) herdaram os cromossomos der(2) e der(22) e portanto, são, portadores de uma deleção em 2p14 e da duplicação do segmento 5q23.2-q23.3; o irmão clinicamente normal (III-5) herdou o der(5) e, assim, era portador de duplicação de segmento de 2p14 e de deleção em 5p15.1.

Tabela VII.1 Deleções e duplicações identificadas por aCGH e delimitadas por MPS e genes mapeados nos intervalos das deleções e duplicações.

Tipo de CNV	Banda	Localização da deleção ou duplicação por aCGH	Tamanho (Mb)	Localização da deleção ou duplicação por MPS	Tamanho (Mb)	Genes
Del	5p15.1	chr5:15097402-16551445	1,45	chr5:15073606-16552845	1,47	<i>FBXL7, MARCH11, ZNF622, FAM134B</i>
Dup	5q23.2q23.3	chr5:123798118-130432974	6,63	chr5:123790174-130437756	6,64	<i>ALDH7A1, PHAX, MARCH3, LMNB1, FBN2, SLC12A2, SLC27A6, ADAMTS19, CTXN3, CHSY3, MEGF10, ZNF608, GRAMD3, C5orf48, ISOC1</i>
Del	2p14	chr2:65091268-66337825	1,2	chr2:65220481-66646777	1,42	<i>CEP68, RAB1A, ACTR2, SPRED2</i>

Tabela VII.2: Pontos de quebra envolvidos na t(2;5;22), identificados por FISH, aCGH e MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por FISH		Localização dos pontos de quebra por aCGH		Localização dos pontos de quebra por MPS		Gene truncado
		Posição (hg 19)	Tam. kb	Posição (hg 19)	Tam. kb	Posição (hg 19)	Tam. pb	
2(1)	2p14	chr2:65209004-65265044	56040			chr2:65218054-65220481	2427	<i>SLC1A4</i>
2(2)	2p14	chr2:66540604-66723065	182461			chr2:66646777-66652554	5777	<i>MEIS1-AS3</i>
5(1) *	5p15.1			chr5:15065696-15097402	31707	chr5:15069309-15073606	4297	
5(2) *	5p15.1			chr5:16551445-16590384	38940	chr5:16552845-16557142	4297	<i>FAM134B</i>
5(3)	5p15.1					chr5:18178446-18182480	4034	
5(4)	5p14.3					chr5:21162845-21167142	4297	
5(5)	5q23;2					chr5:25131744-25133892	2148	
5(6) *	5q23.2			chr5:123737596-123798118	60523	chr5:123785877-123790174	4297	
5(7) *	5q31.1			chr5:130432974-130476355	43382	chr5:130437756-130442053	4297	
22	22q12.1	chr22:28654643-28691257	36614			chr22:28658943-28660443	1500	<i>TTC28</i>

*Pontos de quebra da deleção (1 e 2) e duplicação do cromossomo 5 (6 e 7) .

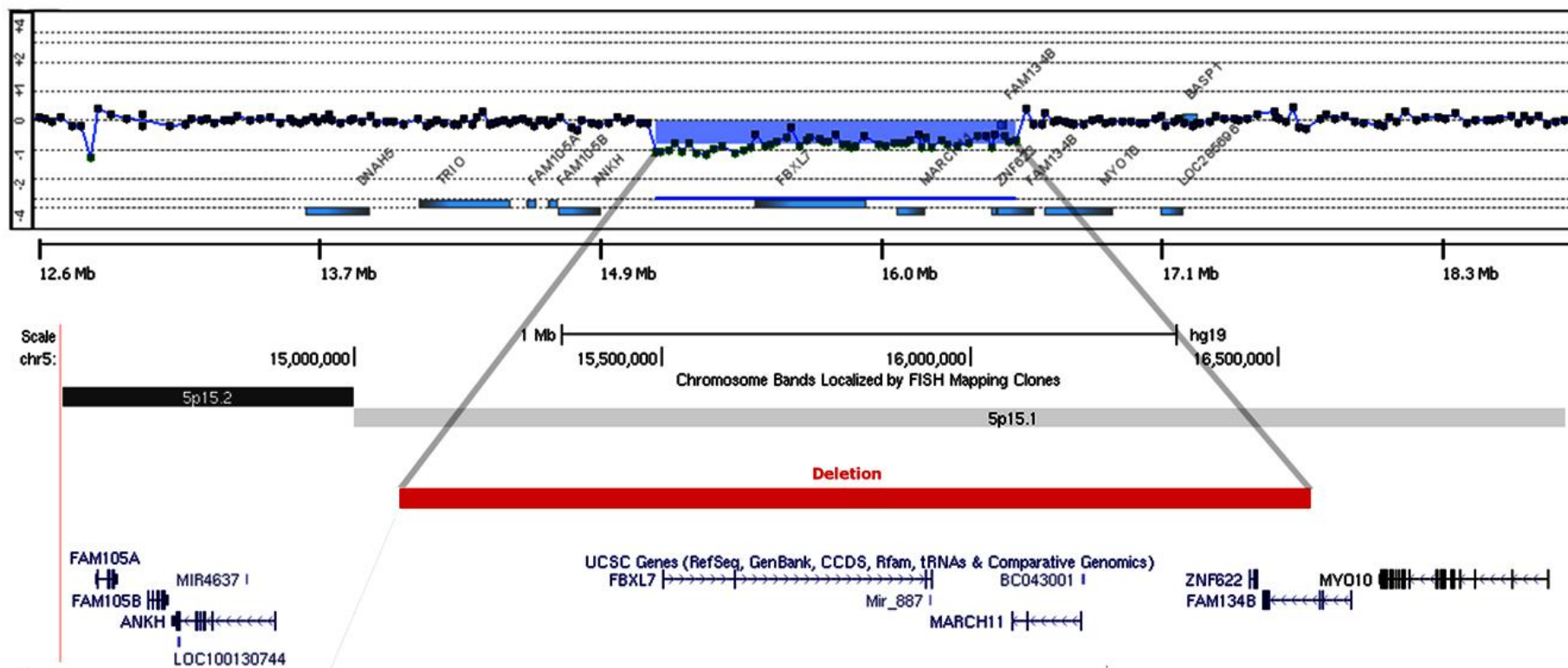


Figura VII.2. Deleção no cromossomo 5 do probando: O perfil do cromossomo 5 mostra a deleção em 5p15.1 detectada por a-CGH (Plataforma 105A, Agilent). Abaixo o mapa do segmento de 1,4 Mb que corresponde à deleção, mostra os genes localizados no segmento deletado (em vermelho).

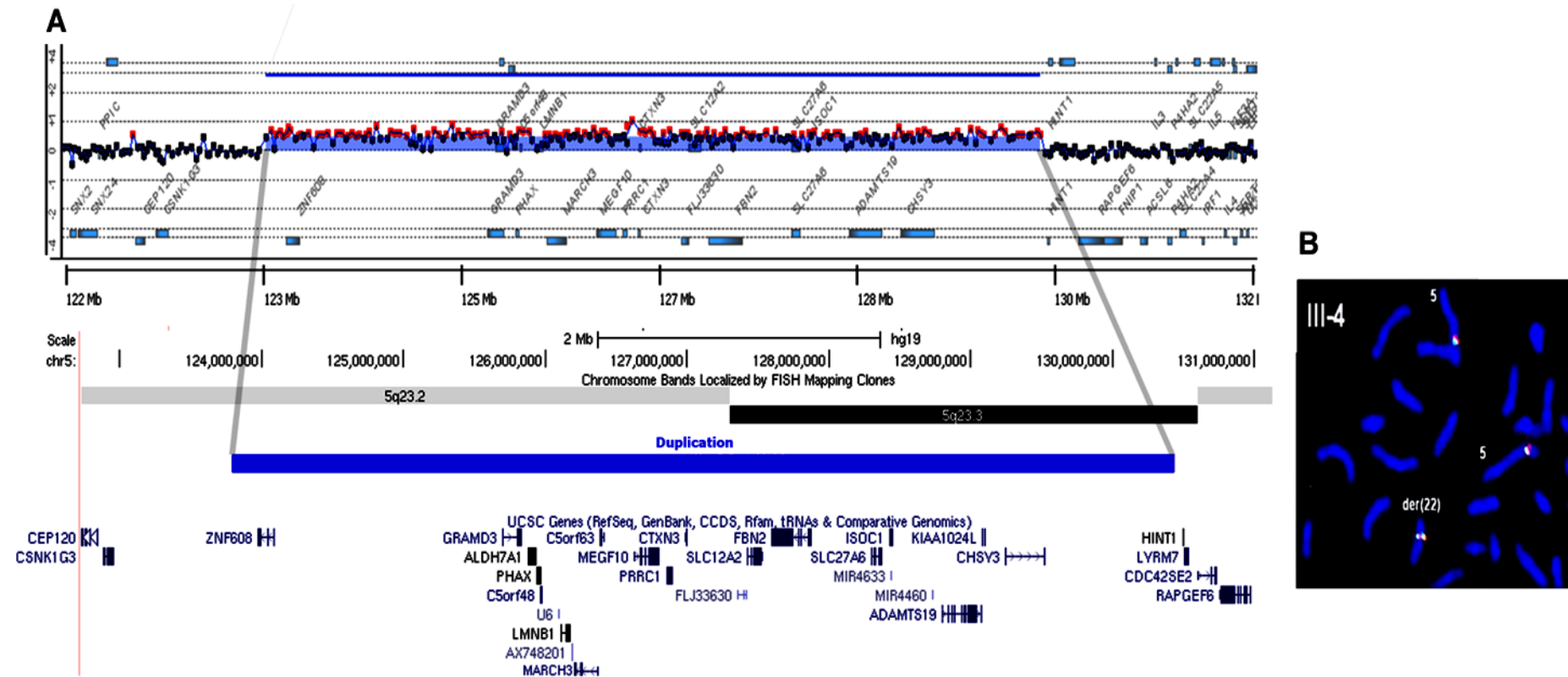


Figura VII.3: Duplicação no cromossomo 5 do probando: (A) O perfil do cromossomo 5 mostra a duplicação em 5q23.2-23.3 detectada por a-CGH (Plataforma 105A, Agilent). (A). Abaixo os mapas dos segmento de 6,64 Mb, que corresponde a duplicação, mostra o gene localizado no segmento duplicado (em azul). (B) Hibridação in situ fluorescente dos clones RP11-48C14 (sinal vermelho) e RP1-236L2 (sinal verde) em metafases do probando: os sinais de hibridação estão presentes nos dois cromossomos 5 e também no cromossomo derivativo 22, der(22).

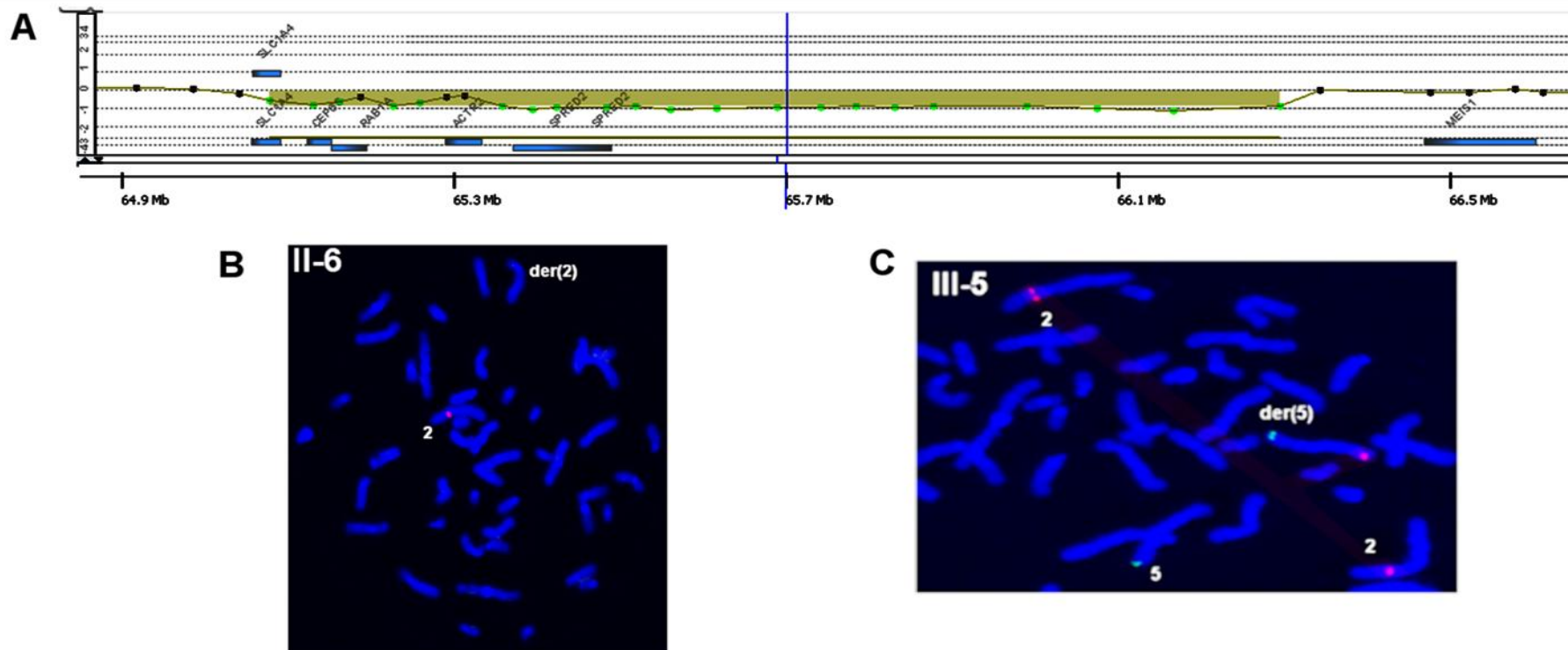


Figura VII.4: Deleção em 2p14 no irmão (III-3) e no tio (II-6) afetados do probando e duplicação em 2p14 no irmão clinicamente normal (III-5). (A) aCGH (Plataforma 60K, Agilent Technologies) em III-3: O segmento deletado está representado pela linha ocre. (B) Hibridação in situ fluorescente em metáfases do tio do afetado (II-6) do clone RP11-263L17 (sinal vermelho), mapeado em 2p14: o sinal de hibridação está presente apenas no cromossomo 2 normal, mostrando que o tio do afetado também era portador da deleção em 2p14. (C) Hibridação in situ fluorescente da sonda RP11-263L17 (sinal vermelho) e da sonda controle RP11 281O15 mapeada no braço longo do cromossomo 5 (sinal verde) em metáfases do irmão clinicamente normal do probando (III-5): os sinais de hibridação estão presentes nos dois cromossomos 2 e também no braço curto de um dos cromossomos do par 5. Portanto o segmento adicional de 2p14 está inserido no braço curto do cromossomo 5.

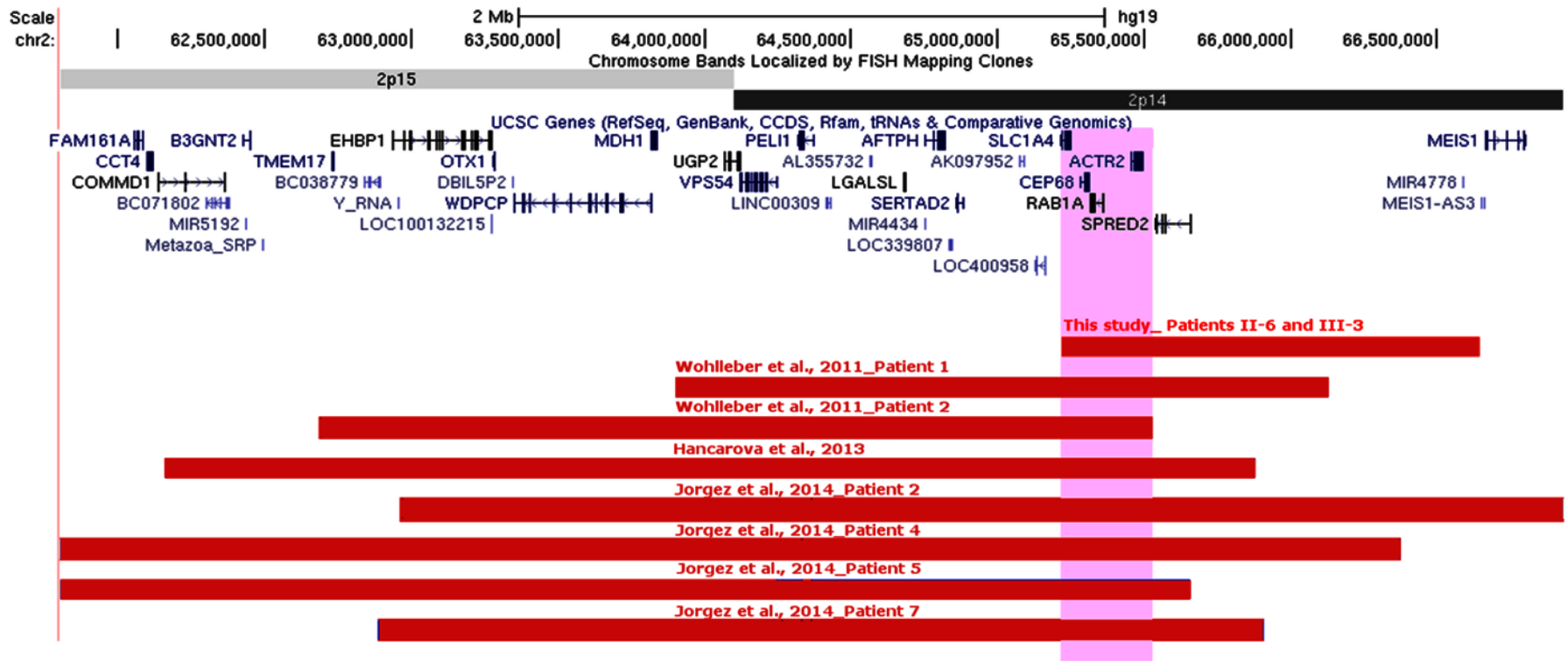


Figura VII.5: Deleções em 2p14p15 previamente descritas em indivíduos com comprometimento intelectual: O mapa do segmento de 1,4 Mb, correspondente à deleção detectados no irmão (III-3) e tio do probando (III-3) (em vermelho), mostra os cinco genes localizados na região e as outras sete deleções previamente descritas em indivíduos com comprometimento intelectual (Wohlleber et al., 2011; Hancarova et al., 2013; Jorgez et al., 2014). Os genes *CEP68*, *RAB1A* e *ACTR2* estão contidos no segmento deletado em todos os nove pacientes (em rosa), e são candidatos a causar comprometimento intelectual na síndrome de microdeleção 2p15p14 (Adaptado do UCSC, hg 19)

Tabela VII.3: Segmentos de junção das quebras da t(2;5;22) delimitados por MPS.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita
22(1)/2(2)	22(1)	+	2(2)	+
5(1)/5(4)	5(1)	-	5(4)	-
5(5)/2(1)	5(5)	-	2(1)	+
2(2)/5(2)	2(2)	-	5(2)	+
5(3)/5(4)	5(3)	-	5(4)	-
5(3)/5(5)	5(3)	+	5(5)	+
22(1)/5(6)	22(1)	-	5(6)	+
5(7)/2(1)	5(7)	+	2(1)	-

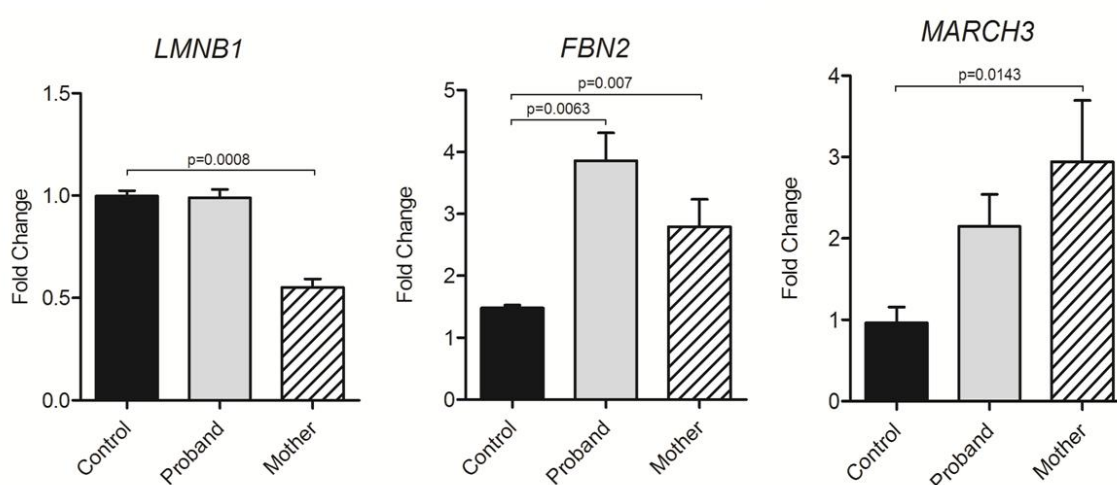


FIGURA VII.6: Análise da expressão dos genes *LMNB1*, *FBN2* e *MARCH3* por PCR em tempo real quantitativo em portadores da translocação t(2;5;22). (A) A análise da expressão do gene *LMNB1* no probando mostrou níveis de expressão do gene comparáveis a controles normais, enquanto que, na mãe do probando, os níveis de expressão do *LMNB1* foram compatíveis com a expressão de um único alelo. (B e C) A análise da expressão dos genes *FBN2* e *MARCH3* no probando e sua mãe revelou níveis elevados em comparação a controles normais.

Mutações de ponto em três outros genes mapeados em 5q23.2-q23.3 foram relacionadas a doenças: *ALDH7A1* (convulsões neonatais dependentes de piridoxina), *FBN2* (aracnodactilia contratural congênita) e *MEGF10* (miopatia, problemas respiratórios e disfagia). Outros 14 genes mapeados em 5q23.2-23.3 não foram previamente relacionados a doença (*PHAX*, *MARCH3*, *SLC12A2*, *SLC27A6*, *ADAMTS19*, *CTXN3*, *CHSY3*, *ZNF608*, *GRAMD3*, *C5orf48*, *C5orf63*, *ISOC1*, *PRRC1*, *KIAA1024L*). Não há dados que permitam avaliar possíveis efeitos clínicos que *ALDH7A1*, *FBN2*, *MEGF10* ou outros genes mapeados em 5q23.2-23.3 possam ter, quando duplicados. São, portanto, candidatos posicionais.

Dentre os genes mapeados em 5q23.2-q23.3, conhecem-se apenas duplicações patogênicas do gene *LMNB1*, na leucodistrofia autossômica dominante do adulto (ADLD; MIM 169500). ADLD é doença neurológica de progressão lenta, caracterizada por desmielinização. As manifestações iniciais são autonômicas, seguindo-se sinais piramidais e ataxia (Schuster et al., 2011). Os afetados têm uma cópia extra do gene *LMNB1*, resultando em aumento dos níveis do RNA mensageiro (Meijer et al., 2006; Padiath et al., 2006; Brussino et al., 2009; Schuster et al., 2011) e da proteína LMNB1, detectado no cérebro e em leucócitos do sangue periférico (Schuster et al., 2011). Em virtude da manifestação tardia da doença, com início entre as quarta e sexta décadas de vida, investigamos se algum dos portadores do rearranjo apresentava sintomas. Nenhum dos adultos na quinta década de vida (mãe, tia e tio do probando), apresentou queixa que levasse à suspeita da doença. A avó do probando, falecida aos 70 anos em virtude de problemas cardíacos, de acordo com a família, também não manifestou sinais da doença. Para avaliarmos se a ausência de sinais na família seria resultado de níveis normais de lamina B, avaliamos a expressão do gene *LMNB1* por PCR em tempo real quantitativo. Apesar de estar duplicado, no probando observamos níveis de expressão do *LMNB1* comparáveis aos de controles normais, enquanto que, na mãe do probando, os níveis de *LMNB1* eram compatíveis com a expressão de um único alelo (Figura VII.6). A expressão diminuída na mãe em comparação ao seu filho pode estar relacionada à diferença de idades (Dreesen et al., 2013). Avaliamos também a expressão dos genes *FBN2* e *MARCH3*, mapeados no segmento 5q23.2-q23.3 duplicado. No probando e em sua mãe, ambos os genes eram expressos em níveis elevados, em comparação com controles normais (Figura VII.6). Esses dados indicam que as cópias extras dos genes *FBN2* e *MARCH3* inseridas no cromossomo der(22) são expressas, enquanto que a cópia extra do *LMNB1* está silenciada. Esses resultados mostram que a ausência de expressão aumentada do *LMNB1* no probando e em sua mãe não resultou de silenciamento de todo o segmento 5q23.2-q23.3 inserido no der(22), devido ao “efeito de posição”. As duplicações do *LMNB1* previamente associadas à ADLD têm entre 128 kb e 478 kb de extensão; em comum há um segmento de aproximadamente ~72kb (chr5:126,102,443-126,174,517), que inclui toda a região codificadora do gene *LMNB1*, e as regiões 9.8 kb *upstream* e 1.8 kb *downstream* ao gene (Giorgio et al., 2013). O segmento duplicado nos afetados está incluído no intervalo da duplicação na família aqui descrita. Um *enhancer* do *LMNB1* recentemente isolado mapeado 120 kb *upstream* ao *LMNB1* (Giorgio et al.,

2015) também foi translocado para o der(22). Todas as duplicações já associadas a *ADLD* ocorreram em tandem, sugerindo que a disposição dos elementos reguladores em relação ao alelos do *LMNBI* seja essencial para elevados níveis do gene serem atingidos. O silenciamento da cópia do gene *LMNBI* localizada no cromossomo der(22) pode ser explicada pela ausência de sequência(s) reguladora(s) do gene no segmento duplicado e translocado para o der(22). Alternativamente, o silenciamento da cópia do gene *LMNBI* no der(22) pode ser resultado da interferência de sequências ectópicas do cromossomos 2 e 22. Ainda, outros genes mapeados no segmento duplicado do cromossomo 5 poderiam afetar a expressão de *LMNBI*, embora não haja indícios de *feedback* negativo com outros genes localizados próximos.

Outra alteração comum a todos os afetados foi a haploinsuficiência do gene *SLCIA4* mapeado em 2p14 e altamente expresso no sistema nervoso. O gene foi interrompido em um dos pontos de quebra do cromossomo 2 (Tabela VII.2). Codifica um transportador de aminoácido neutro, que é expresso principalmente em músculo, pâncreas e cérebro. A expressão do gene em neurônios primários está associada à absorção de L-serina. Recentemente foi demonstrado que mutações nesse gene, em homozigose, causam deficiência intelectual, microcefalia e hipomielinização (Srouf et al., 2015; Damseh et al., 2015; Heimer et al., 2015). No entanto, a perda de uma das cópias do gene em heterozigose não tem efeito clínico, já que um dos genitores portadores de mutação em heterozigose era clinicamente normal. Esses dados mostram que a interrupção do gene *SLCIA4* não contribui para o fenótipo da família portadora da t(2;5;22). O RNA não codificador *MEIS1-AS3*, no cromossomo 2, e o gene *TTC28*, no cromossomo 22, também foram interrompidos; suas funções são desconhecidas.

É interessante que a deleção em 2p14, consequente à ausência do der(5), está restrita aos dois afetados que aparentam maior déficit cognitivo. Recentemente, foram identificados seis portadores de microdeleções em 2p14-p15, sugerindo a existência de um novo locus para deficiência intelectual (Wohlleber et al., 2011; Hancarova et al., 2013; Jorgez et al., 2014) (Figura VII.5). No segmento comum às seis microdeleções descritas anteriormente e à deleção em 2p14 no irmão e no tio afetados do probando, estão mapeados quatro genes: *SLCIA4*, *CEP68*, *RAB1A* e *ACTR2*. Como a haploinsuficiência do gene *SLCIA4* não parece ser patogênica, sugerimos que o(s) gene(s) *CEP68*, *RAB1A* e *ACTR2* seja(m) candidato(s) para a deficiência intelectual na nova síndrome de microdeleção em 2p14-p15. O gene *SLCIA4* está interrompido em todos pacientes afetados da família portadora da t(2;5;22), outro indicio que mostra que

a dificuldade de aprendizado mais grave no tio e no irmão do probando deve decorrer da haploinsuficiência de *CEP68*, *RAB1A*, *ACTR2*. O gene *CEP68* é necessário para coesão do centrôssomo. As proteínas CEP têm importante papel na neurogênese no cérebro humano em desenvolvimento, conforme demonstrado pelo efeito clínico das mutações em homozigose em genes da família CEP (*MCPHI*, *CDK5RAP2*, *ASPM*, *CENPJ* and *STIL*), que causam microcefalia (Hussain et al., 2012). O *RAB1A* codifica uma GTPase que controla o transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi. O *ACTR2* codifica um importante constituinte do complexo ARP2/3. Esse complexo está localizado na superfície celular e é importante para a manutenção do formato da célula e de sua mobilidade. Os genes *RAB1A* e *ACTR2* também são candidatos já que atuam na diferenciação neuronal e no direcionamento dos axônios (Wohlleber et al., 2011). Vale salientar que a duplicação correspondente do segmento de 2p14 não está associada a alterações do desenvolvimento, já que foi detectada no irmão normal do probando. Não foi descrita antes. Apesar de não podermos descartar a possibilidade de manifestação tardia, a presença de uma duplicação em 2p14 em indivíduo fenotipicamente normal, alerta para a complexidade da interpretação de desequilíbrios submicroscópicos, já que a deleção do mesmo segmento está associada a deficiência mental moderada.

VII.5 Conclusões

Ao elucidar a complexidade da translocação t(2;5;22) utilizando aCGH, MPS e MPS, nossos resultados mostraram a importância de reconstruir a estrutura precisa de cromossomos derivativos para estabelecer correlações genótipo-fenótipo. Em decorrência da segregação dos cromossomos derivativos 2, 5 e 22 nos indivíduos afetados e clinicamente normal foi possível compreender a variabilidade clínica observada na família. A microdeleção de 1,42 Mb em 2p14 detectada nos dois afetados da família com maior comprometimento intelectual sugere que os genes *CEP68*, *RAB1A* e/ou *ACTR2*, mapeados nessa região, sejam candidatos a causarem deficiência intelectual na síndrome de microdeleção em 2p14p15, anteriormente descrita. A ausência de sinais de ADLD na família aqui descrita foi confirmada pela análise da expressão do gene *LMNB1* que, apesar de duplicado, não tem expressão exacerbada nos dois membros da família testados. Esses resultados mostram a importância de analisar a expressão do gene *LMNB1* em portadores de duplicação já que sua expressão aumentada causa doença neurológica grave de manifestação tardia.

**VIII. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS
ASSOCIADOS A QUADROS CLÍNICOS E
HERDADOS DE GENITORES
FENOTIPICAMENTE NORMAIS.**

VIII. Rearranjos cromossômicos associados a quadros clínicos e herdados de genitores fenotipicamente normais.

VIII.1 Introdução

Os rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados ocorrem em um a cada 500 nascimentos (Jacobs e Hassold, 1986) e a maioria desses rearranjos é herdada. Uma criança que herdou o mesmo rearranjo presente num genitor fenotipicamente normal pode apresentar sinais clínicos, levando geralmente à conclusão de que a associação entre o rearranjo e o fenótipo seja casual (Wenger et al., 1995). No entanto, o ponto de quebra pode ter inativado ou interrompido um gene, cuja haploinsuficiência não tenha consequências clínicas, mas que se manifeste na presença de alelo alterado herdado do outro genitor, num padrão recessivo de herança (Hearn et al., 2002; Lesnik Oberstein et al., 2006). A ocorrência de UPD também é outra possibilidade (Dupont et al., 2002).

A aplicação de aCGH na análise de rearranjos herdados de indivíduos normais, revelou que microdeleções ou duplicações originadas de permuta desigual na meiose do genitor portador do rearranjo podem ser a causa do fenótipo (Delahaye et al., 2007). Ciccone et al. (2005) caracterizaram uma translocação equilibrada $t(7;10)(p12.2;q26.3)$ de origem paterna. No cromossomo der(10) foi detectada uma microduplicação *de novo* distante do ponto de quebra, em 10q21.1-10q23.31 e o estudo com microssatélites confirmou a origem paterna da duplicação. Os autores sugerem que o segmento duplicado teria resultado de recombinação entre o cromossomo 10 normal e o derivativo. Schluth-Bolard et al. (2009) analisaram rearranjos cromossômicos equilibradas associados a sinais clínicos, mas herdados de genitores não afetados. Em dois rearranjos, uma inversão $inv(1)(p21q13)$ e uma inserção $ins(7; 4)(q31; q27q32)$, ambas herdadas das mães, foram detectadas microdeleções *de novo* nos pontos de quebra dos cromossomos 1 e 4. A identificação de perdas ou ganhos no rearranjo presente na criança afetada também pode revelar a complexidade do rearranjo presente no genitor fenotipicamente normal. Em uma inversão equilibrada $inv(9)(q32q34.3)$ herdada da mãe, a criança apresentava duas alterações *de novo*: uma microduplicação em 9q22-31.1 e uma microdeleção em 9q32-33.1 (South et al. 2010). A análise por FISH em metáfases da mãe revelou que o rearranjo era na verdade uma dupla inserção intracromossômica no cromossomo 9: o segmento 9q32q33.1 inseriu-se em 9q21 e o

segmento 9q31q31.1 inseriu-se em 9q34. Numa outra criança portadora de inserção $ins(1;5)(q32;q15q33)$ citogeneticamente equilibrada, também herdada da mãe fenotipicamente normal, a análise por aCGH revelou duas alterações *de novo*: uma deleção em 5q33–5q34 e uma duplicação em 6p24–6p22. A análise por FISH em metáfases da mãe mostrou que o segmento 5q33–5q34 estava inserido no cromossomo 6 e um segmento de 6p24–6p22 estava inserido em 1q32 (South et al., 2010).

Com este estudo, nosso objetivo é identificar mecanismos pelos quais rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados herdados de indivíduos fenotipicamente normais possam estar associados de maneira causal a determinados quadros clínicos.

VIII.2 Metodologia

Nosso trabalho compreendeu a investigação de onze rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos herdados de indivíduos fenotipicamente normais. A busca por microdeleções e duplicações foi realizada por aCGH. Os pontos de quebra de seis rearranjos foram mapeados por MPS.

VIII.3 Resultados e discussão

A análise por aCGH não revelou microdeleções ou microduplicações associadas aos 11 rearranjos herdados de genitores clinicamente normais, indicando que desequilíbrios submicroscópicos nos cromossomos rearranjados não são a causa do quadro clínico. Com exceção de um paciente que será discutida adiante, em 10 pacientes também não foram detectadas CNV patogênicas ou raras, em qualquer outro cromossomo.

Aplicamos também a técnica de MPS na análise de sete desses 11 rearranjos para mapear os pontos de quebra. Em duas translocações (BCRs C2 e C3), os dados de MPS não permitiram identificar as regiões das quebras, provavelmente porque se localizam em regiões repetitivas do genoma. Os pontos de quebra dos outros cinco rearranjos foram mapeados por MPS e, quatro deles também foram sequenciados por pelo método de Sanger. Os resultados revelaram que esses rearranjos interromperam gene(s). Em uma inversão $inv(3)(p12\sim 13p25\sim 26)mat$, os pontos de quebra em 3p26.1 e 3p14.1 interromperam, respectivamente, o gene do RNA não codificador *LMCD1* (*LMCD1-AS1*, *antisense RNA 1 (head to head)*) e o gene *FAM19A4* (*family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A4*) (Tabelas VIII.2 e

Tabela VIII.1: Rearranjos aparentemente equilibrados herdados de indivíduos fenotipicamente normais e o quadro clínico dos portadores.

BCR*	Cariotipo (Bandamento G)	Fenótipo
C1	46,XX,inv(12)(p11.2q24.1)mat	Hiperextensão dos ligamentos, deslocamento de quadril, oligodontia e comprometimento de aprendizado
C2**	46,XY,t(6;15)(q23.1;q22.1)mat	Hipertrofia articular, , pregas palmares únicas, pés planos e refluxo gastroesofágico
C3**	46,XY,t(6;22)(q14;q11)mat	Deficiência intelectual
C4	46,XY,inv(2)(q12q33)pat	Deficiência intelectual
C5	46,XY,inv(2)(p11q13)mat	Deficiência intelectual
C6	46,XY,inv(12)(q15q24.2)mat	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
C7	inv(17)(p11.2q21)pat	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
C8	t(13;17)(q21.2;p13) mat	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor , hipotonia axial, catarata bilateral e dificuldades de alimentar-se
C9	46,XY,inv(3)(p12~13p25~26)mat	Polegar trifalângico e polidactilia preaxial
C10	46,XY,t(2;9)(q14.2;p22)pat	Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e microcefalia
C11	46,XY,t(1;7)(q23.1;p13)pat	Deficiência intelectual grave, dismorfismos craniofaciais, ausência de deambulação e de fala

* De acordo com a Tabela III.1

**Não foi possível caracterizar os pontos de quebra por MPS provavelmente devido à presença de sequências altamente repetitivas ou de sequências repetidas no genoma (e.g. *Low copy repeats*/ duplicações segmentares) nas regiões das quebras.

e VIII.3). Em outra inversão, inv(12)(q15q24.2)mat, a quebra em 12q15 truncou o gene *RAB3IP* (*RAB3A interacting protein*) (Tabela VIII.4 e VIII.5). Não há relato de associação dos genes *LMCD1-AS1*, *FAM19A4* ou *RAB3IP* com doença. Em uma translocação t(2;9)(q14.2;p22)pat o ponto de quebra em 9p23 interrompeu o gene *MPDZ* (*Multiple PDZ domain protein*) (Tabela VIII.6 e VIII.7). Mutações no gene *MPDZ* em homozigose causa uma forma congênita de hidrocefalia (Al-Dosari et al., 2013). A translocação t(1;7)(q23.1;p13)pat interrompeu o gene *PBX1* (*PBX1 pre-B-cell leukemia homeobox 1*) em 1q23.3 (Tabelas VIII.8 e VIII.9). Esse gene quando truncado pela translocação t(1;19)(q23;p13) *PBX1* causa leucemia linfóide aguda (LLA), em decorrência da formação do gene híbrido *E2A/PBX1* (Kamps et al., 1991). Apesar de o efeito clínico da perda de função dos genes *PBX1*, *MPDZ*, *FAM19A4* ou *LMCD1-AS1* em heterozigose ser desconhecida, os rearranjos presentes nos indivíduos afetados foram herdadas de seu pais clinicamente normais, sugerindo que a interrupção desses genes não seja a principal causa do quadro clínico. O fenótipo dos portadores dessas

translocações ou inversões também não sugere que a interrupção do *PBX1*, *MPDZ*, *RAB3IP*, *FAM19A4* ou *LMCD1-AS1* tenha “desmascarado” alelo recessivo no cromossomo não rearranjado. Diante desses dados não é possível estabelecer relação causal entre os rearranjos e o quadro clínico de seus portadores.

A inversão *inv(12)(p11.2q24.1)mat* também foi investigada por MPS e os segmentos de junção das quebra foram sequenciados pelo método de Sanger. O gene *PPFIPQ1* [*PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)*] foi interrompido em 12p11.23 e o gene *POLR3B* (*polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B*) foi interrompido em 12q23.3. Essa inversão foi detectada em uma paciente com hiperextensibilidade articular, deslocamento do quadril, oligodontia e comprometimento de aprendizado. Desconhece-se o efeito clínico da perda de função de uma das cópias desses genes. A mãe e a irmã fenotipicamente normais da paciente são portadoras da mesma inversão pericêntrica, sugerindo que a interrupção do genes *POLR3B* e *PPFIPQ1* não contribua para o fenótipo. Apesar de a inversão do cromossomo 12 ser equilibrada, a análise por aCGH revelou a perda de um segmento de aproximadamente 8,7 Mb no cromossomo 8, em 8p22 - 8p21.2 na paciente (Tabela VIII.10; Figura VIII.1). Sessenta e um genes estão localizados no segmento perdido do cromossomo 8 e essa deleção cromossômica deve estar contribuindo para o quadro clínico. Um paciente descrito no DECIPHER (269825), é portador de uma deleção que se sobrepõe quase que totalmente à deleção em nossa paciente, apenas o genes *TUSC3* (*tumor suppressor candidate 3*; deletado em nossa paciente) e o genes *ADAMDEC1* e *ADAM7* (deletados no paciente 269825) não estão incluídos no segmento comum. O paciente 269825 apresenta criptorquidia bilateral, hipotonia muscular infantil, atraso

Tabela VIII.2: Segmentos dos pontos de quebra da *inv(3)* (BCR C9) delimitados por MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Banda	Gene Truncado
3(1)	3p25.1	chr3:8519305-8520593	1289	3p25.1	<i>LMCD1</i>
3(2)	3p14.1	chr3:68954422-68954600	179	3p14.1	<i>FAM19A4</i>

Tabela VIII.3 : Segmentos de junção das quebras da *inv(3)* delimitados por MPS.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita
3(1)/ 3(2)	3(1)	+	3(2)	+
3(1)/ 3(2)	3(2)	-	3(1)	-

Tabela VIII.4: Segmentos dos pontos de quebra da inv(12) (BCR C6) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene Truncado
12(1)	12q15	chr12:70180759:70181167	409	chr12:70180810	<i>RAB3IP</i>
12(2)	12q24.11	chr12:110319907:110320470	564	chr12:110320027-110320028	

Tabela VIII.5: Segmentos de junção das quebras da inv(12) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Junção do PQ	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
12(1)/ 12(2)	12(1)	+	12(2)	+	*
12(2) /12(1)	12(2)	-	12(1)	-	del 12(2):AG

tabela VIII.6: Segmentos dos pontos de quebra da t(2;9) (BCR C10) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Localização dos pontos de quebra por MPS	Tam. pb	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Banda	Gene Truncado
2(1)	chr2:125848381-125848559	179	chr2:125848503	2q14.3	
9(1)	chr9:13259557-13259960	404	chr9:13259958-13259959	9p23	<i>MPDZ</i>

Tabela VIII.7: Segmentos de junção das quebras da t(2;9) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger

Junção do PQ	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
2/9	2	+	9	+	*
9/2	9	-	2	-	del 9:AG

VIII.8: Segmentos dos pontos de quebra da t(1;7) (BCR 11) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. (pb)	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene truncado
1	1q23.3	chr1:164844858-164845517	659	chr1:164845238-164845239	<i>PBX1</i>
7	7p14.1	chr7:41201321-41202317	996	chr7:41201432-41201443	

Tabela VIII 9: Segmentos de junção das quebras da t(1;7) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
1/7	1	-	7	-	Dup(2pb) TA; Ins(CA)
7/1	7	+	1	+	Del 7: 12pb; Ins:CTGGCAG

Tabela VIII.10: Deleção identificada por aCGH e delimitada por MPS na propórita portadora da inv(12), e genes mapeados nos intervalos da deleção.

Banda	Localização da deleção por aCGH (hg 19)	Tam. (pb)	Localização da deleção por MPS	Tam. kb	Genes
8p22p21.2	chr8:15460343-24215797	8755454	chr8:15438678-24235380	8796	<i>TUSC3, MSRI, FGF20, EFHA2, ZDHHC2, CNOT7, VPS37A, MTMR7, SLC7A2, PDGFRL, MTUS1, FGL1, PCMI, ASAH1, NAT1, NAT2, PSD3, SH2D4A, CSGALNACT1, INTS10, LPL, SLC18A1, ATP6V1B2, LZTS1, GFRA2, DOK2, XPO7, NPM2, FGF17, EPB49, FAM160B2, NUDT18, HR, REEP4, LGI3, SFTPC, BMP1, PHYHIP, POLR3D, PIWIL2, SLC39A14, PPP3CC, SORBS3, PDLIM2, C8orf58, KIAA1967, BIN3, EGR3, PEPQ4, RHOBTB2, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF10A, CHMP7, R3HCC1, LOXL2, ENTPD4, SLC25A37, NKX3-1, NKX2-6, STC1, ADAM28.</i>

Tabela VIII. 11: Segmentos dos pontos de quebra da inv(12) e da t(X;19) detectadas na mãe da propósita, delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Chr (Quebra)	Banda	Localização dos pontos de quebra por MPS (hg 19)	Tam. (pb)	Localização dos pontos de quebra por Sanger	Gene truncado
8(1)	8p22	chr8:15436266-15438678	2412		<i>TUSC3</i>
8(2)	8p21.2	chr8:24235380-24236701	1321		<i>LOC1019</i>
12(1)	12p11.23	chr12:27763597-27763880	283	chr12:27763605-27763607	<i>PPFIBP1</i>
12(2)	12q23.3	chr12:106786926-106787459	533	chr12:106786927-106786936	<i>POLR3B</i>
19(1)	19p13.3	chr19:5497122-5497417	295		
19(2)	19p13.3	chr19:6173465-6173839	374		<i>ACSBG2</i>
X(1)	Xq13.1	chrX:68626824-68626867	43		

Tabela VIII.12: Segmentos de junção das quebras da inversão (12) e da translocação t(X;19) delimitados por MPS e sequenciados pelo método de Sanger.

Segmento de Junção	Ponto de Quebra 1	Fita	Ponto de Quebra 2	Fita	Modificação no segmento de junção
12(1)/12(2)	12(1)	-	12(2)	-	del 12(1):AGT
12(2)/12(1)	12(2)	+	12(1)	+	del 12(2):10pb; Ins20pb
8(1)/8(2)	8(1)	-	8(2)	+	
X(1)/19(2)	X(1)	+	19(2)	+	
19(2)/ X(1)	19(2)	-	X(1)	-	
19(1)/8(2)	19(1)	+	8(2)	-	
8(1)/19(1)	8(1)	+	19(1)	-	

leve do desenvolvimento neuropsicomotor e defeito do septo ventricular. Dentre os 61 genes deletados na portadora da inv(12), cinco já foram associados a câncer (*MSRI*, *PDGFRL*, *PCMI*, *LZTS1*, *TNFRSF10B*). Outros quatro genes também foram relacionados a doenças, (*TUSC3*, *VPS37A*, *ASAH1*, *BMP1*), mas apenas mutações em homozigose no *TUSC3* resultam em deficiência intelectual. Os outros genes causam paraplegia espástica familiar (*VPS37A*), lipogranulomatose de Farber e atrofia muscular espinhal (*ASAH1*) e osteogênese imperfeita (*BMP1*). Ressalta-se, no entanto, que a perda de função dos genes *TUSC3*, *VPS37A*, *ASAH1* e *BMP1* em heterozigose não tem efeito clínico. Apesar de não haver candidatos individuais entre os genes deletados da região 8p22p21.2 o quadro clínico da paciente pode resultar também do efeito conjunto da perda de vários genes nesse segmento.

Além da inversão pericêntrica do cromossomo 12, a mãe e a irmã fenotipicamente normais da paciente também são portadoras de uma translocação aparentemente equilibrada entre o braço longo do cromossomo X e o braço curto do cromossomo 19, t(X;19)(q13;p13) (Figura VIII.2). Esse rearranjo não estava presente na

propósita. A análise por aCGH revelou que a mãe e a irmã não eram portadoras da deleção do cromossomo 8, ou de qualquer outro desequilíbrio submicroscópico não descrito como CNV benigna. No entanto, FISH utilizando a sonda RP11-618M23 mapeada na região da deleção em 8p22p21.2, mostrou que o segmento perdido do cromossomo 8 na propósita está localizado no cromossomo X translocado em sua mãe e irmã (Figura VIII.2A). Para compreender a estrutura dos cromossomos derivativos 8, X e 19, os rearranjos detectados na mãe da paciente foram mapeados por MPS (Tabelas VIII.11 e VIII.12). Os resultados do sequenciamento confirmaram a inserção do segmento 8p22p21.2, deletado na propósita, no ponto de quebra do der(X) em sua mãe. Assim, a mãe e a irmã eram portadoras de rearranjo cromossômico mais complexo do que a translocação t(X;19) identificada na análise por bandamento G: além da troca de segmentos entre o braço longo do cromossomo X e o braço curto do cromossomo 19, o cromossomo 8 perdeu um segmento intersticial - 8p22p21.2, que foi inserido no der(X). Desse modo, não houve perda ou ganho de segmentos, mas troca de suas posições e, portanto, esse rearranjo cromossômico está equilibrado na mãe e na irmã da propósita: [inv(12)(p11.2q24.1),t(X;8;19)(p21.2p22;q13;p13)]. A paciente herdou o der(8) que não continha o segmento 8p22p21.2 e o cromossomo X normal da mãe, explicando assim a deleção do cromossomo 8 detectada por aCGH (Figura VIII.2B). Os dados de MPS também confirmaram não haver relação entre a inv(12) e a t(X;8;19). Os resultados de MPS também permitiram refinar os pontos de quebra de ambos os rearranjos. Além dos genes *PPFIBP1* (*PRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)*) e *POLR3B* (*polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B*) no cromossomo 12, o gene *TUSC3* e o gene do RNA não codificador *LOC101929294*, no cromossomo 8, e o gene *ACSBG2* (*acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2*) no cromossomo 19 foram interrompidos nos pontos de quebra. A investigação desse rearranjo familiar evidencia que rearranjos complexos associados a quebras gênicas podem não ter impacto clínico, apesar de não podermos afastar a ocorrência de doenças de manifestação tardia, como câncer.

Também determinamos o padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico da mãe da paciente, com base na metilação do gene *AR*. A análise revelou desvio de inativação total, com o mesmo cromossomo inativo em 100% das células (Figura VIII.3). Apesar de não avaliarmos qual dos cromossomos X está inativado, admitimos que o cromossomo X normal está inativo e o der(X) ativo. Esse padrão torna as células funcionalmente equilibradas quanto aos segmentos translocados.

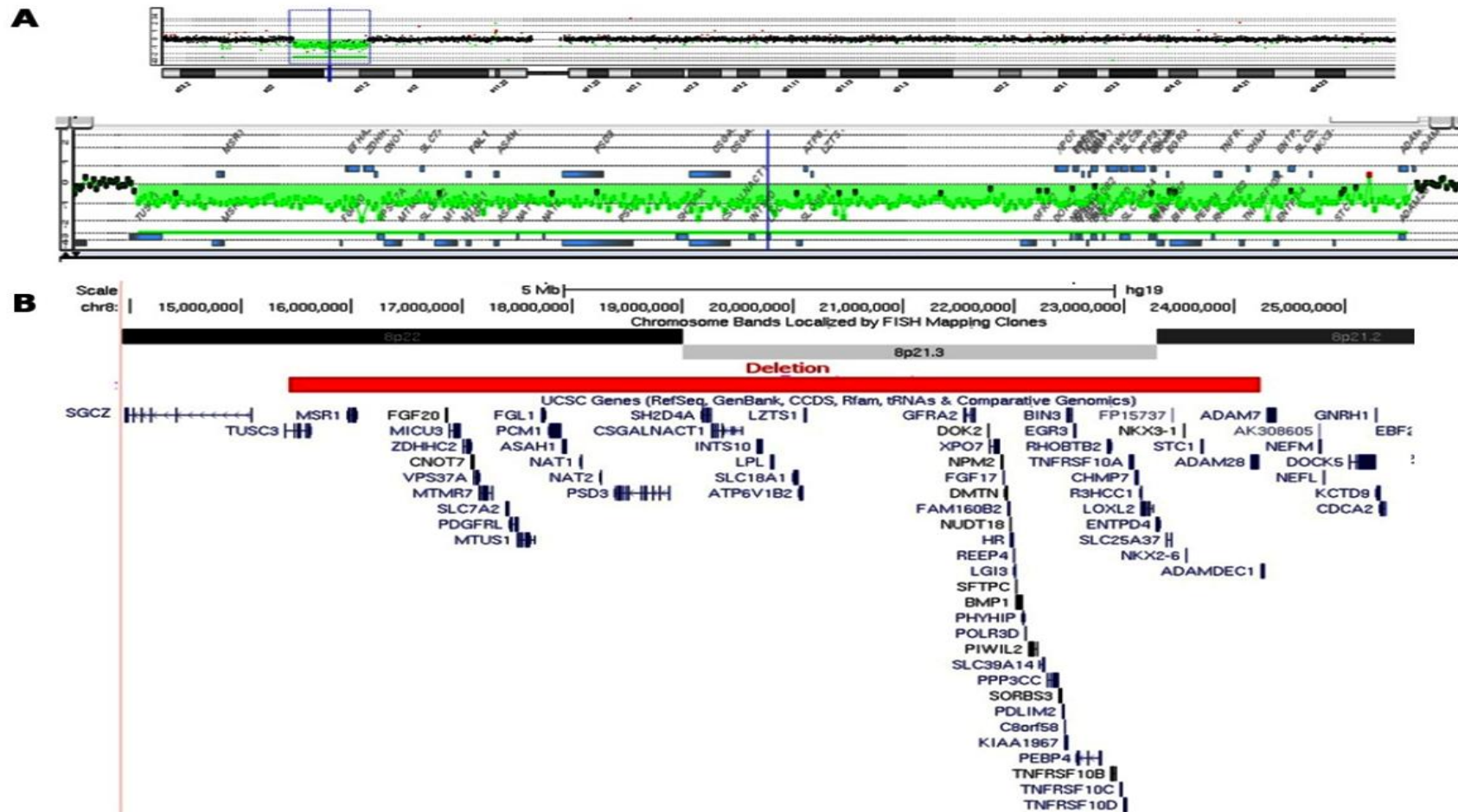


FIGURA VIII.1: Deleção no cromossomo 8 em 8p22p21.2 na propórita portadora da inv(12)(p11.2q24.1)mat: A. O perfil de aCGH (Plataforma 180K) do cromossomo 8 evidencia o segmento deletado de 8,7 Mb em 8p22p21.2. Oligonucleotídeos mapeados no segmento deletado, em verde. Essa deleção não está relacionada com a inversão do cromossomo 12. B. O mapa do segmento que corresponde à região da deleção em 8p22p21.2 (em vermelho) mostra os genes mapeados na região (UCSC genes) (Adaptado de UCSC, hg 19).

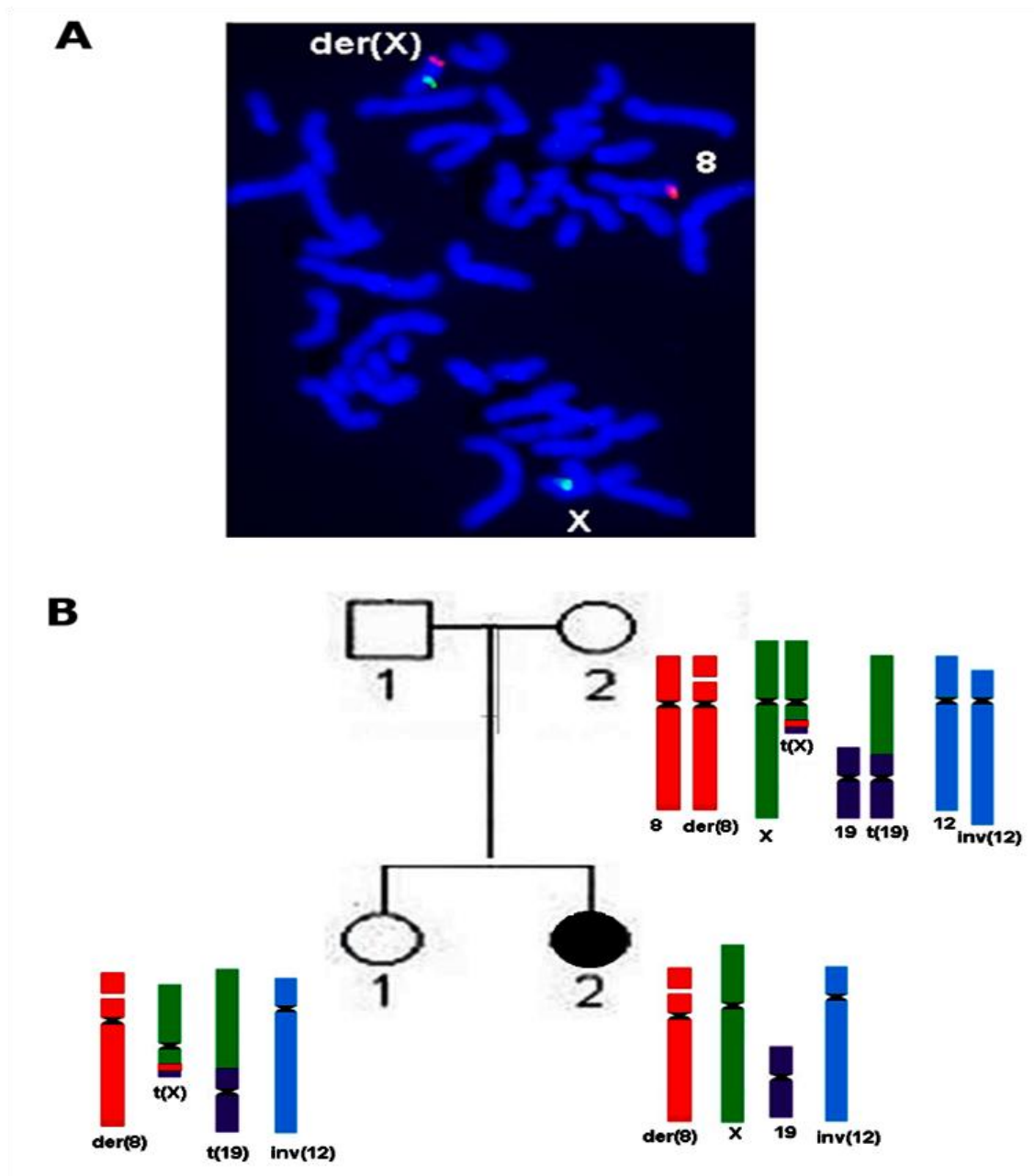


Figura VIII.2. Translocação $t(X;8;19)$ na mãe da propósita portadora da $inv(12)(p11.2q24.1)$ e da deleção do cromossomo 8: **A.** FISH em metáfases da mãe da propósita revelou sinais de hibridação (em vermelho) da sonda RP11-618M23 (mapeada em 8p21.3), no cromossomo 8 normal e no cromossomo der(X). Esse resultado indica que o segmento deletado na criança está inserido no cromossomo X translocado, em sua mãe. Uma sonda do braço curto do cromossomo X foi usada como controle (sinal verde). O mesmo resultado foi observado em metáfases de sua filha fenotipicamente normal. **B** Segregação dos cromossomos translocados: a criança afetada herdou o cromossomo X normal e o cromossomo der(8) que não contém o segmento 8p22p21.2, explicando assim a deleção dessa região detectada por aCGH. Os dados de MPS revelaram que a inversão do cromossomo 12, presente na propósita e em sua mãe e irmã, é um rearranjo independente e provavelmente, constitui alteração sem impacto sobre o fenótipo.

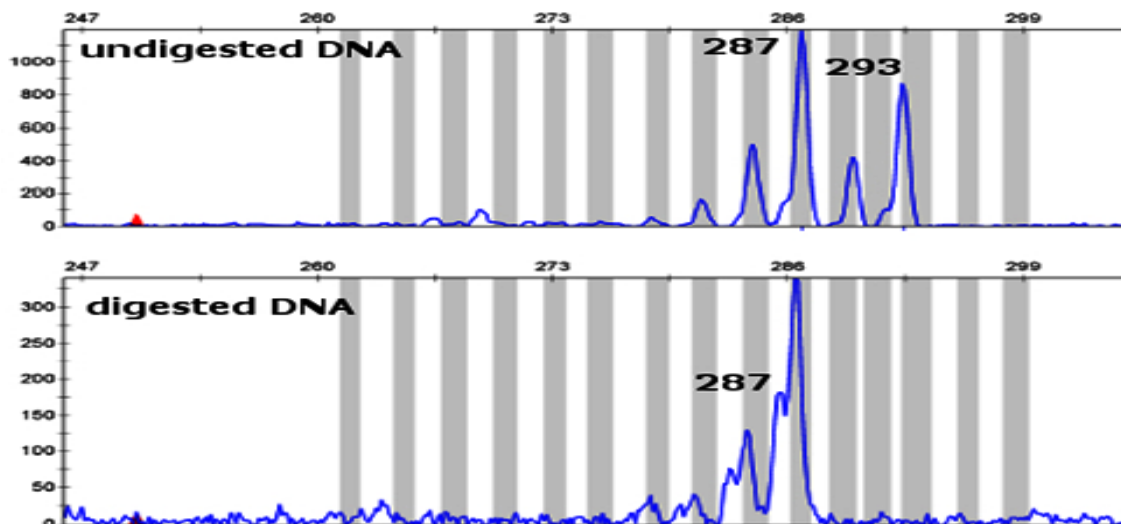


FIGURA VIII.3. - Padrão de inativação do cromossomo X na portadora da t(X;8;19), determinado com base na metilação do gene AR: Os alelos foram amplificados a partir do DNA genômico, não digerido (acima) e digerido (abaixo) pela enzima *HpaII*, sensível à metilação. Após digestão, apenas o alelo metilado, no X inativo, foi amplificado. A razão de inativação (100:0) mostra que o mesmo alelo está inativo em 100% das células.

VIII.4 Conclusão

Rearranjos equilibrados detectados em indivíduos afetados, mas herdados de genitores clinicamente normais, são, em geral, considerados como não tendo relação com o quadro clínico. A aplicação de aCGH ao estudo desses rearranjos veio confirmar que microdeleções e duplicações, resultado de permuta desigual, podem ser a causa do quadro clínico nesses casos. A ausência de estudos que investiguem um número grande de rearranjos herdados é uma limitação importante, pois não há dados que indiquem a proporção desses rearranjos associados a perdas ou ganhos de segmentos críticos. Em nosso estudo, a investigação de onze rearranjos não revelou perdas ou ganhos nos cromossomos rearranjados. Por outro lado, demonstramos que aCGH constitui ferramenta essencial na busca de mecanismos patogênicos, como demonstrado na análise da portadora de inv(12)mat sem efeito clínico, que revelou a presença de uma deleção de 8,7 Mb no cromossomo 8, provável causa do fenótipo. A investigação por MPS dos pontos de quebra de outros quatro rearranjos também não identificou genes que possam contribuir para o fenótipo. No entanto a caracterização precisa desses rearranjos - inclusive da t(X;8;19) presente na mãe da propósita com a deleção crítica do cromossomo 8 e da inv(12), foram importantes para identificar genes que não são sensíveis a dosagem, pois também estavam truncados em indivíduos clinicamente normais.

**IX. MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE REARRANJOS
CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS:
MAPEAMENTO DOS SEGMENTOS DE JUNÇÃO
POR *MATE-PAIR SEQUENCING* E
SEQUENCIAMENTO DE *SANGER*.**

IX. MECANISMOS DE FORMAÇÃO DE REARRANJOS CITOGENETICAMENTE EQUILIBRADOS: MAPEAMENTO DOS SEGMENTOS DE JUNÇÃO POR MATE-PAIR SEQUENCING E SEQUENCIAMENTO DE SANGER.

IX.1 Introdução

Para elucidar os mecanismos de formação de rearranjos cromossômicos, as sequências dos segmentos participantes devem ser determinadas no nível de pares de bases. Antes da disponibilização das técnicas de sequenciamento de nova geração, os mecanismos responsáveis pela formação de rearranjos cromossômicos equilibrados eram pouco conhecidos, porque as técnicas -FISH, *Southern blotting*, *inverse PCR* ou *long-range PCR*- que permitiam delimitar segmentos sequenciáveis pelo método de Sanger tornavam o processo laborioso e complexo. Os poucos rearranjos citogeneticamente equilibrados que tiveram sequenciados os pontos de junção dos fragmentos, utilizando essas técnicas, na maioria translocações e inversões simples, evidenciaram a junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining*; NHEJ), como o mecanismo predominante para sua formação. (Higgins et al., 2008; Lieber et al., 2010; Gohring et al., 2010). Quebras reparadas por NHEJ resultam em junções sem alterações em relação à sequência referência (*blunt fusions*) ou contendo pequenas (<10 pb) deleções, inserções ou duplicações (Gu et al., 2008).

O sequenciamento de nova geração (NGS) aliado ao sequenciamento de Sanger dos pontos de junção facilitou a elucidação dos rearranjos equilibrados no nível dos pares de bases (Talkowskiet al., 2011; Chen et al., 2008; Chen et al., 2011; Sobreira et al., 2011; Kloosterman et al.,2012; Chiang et al., 2012; Nazaryan et al., 2014). O estudo de maior número de rearranjos confirmou NHEJ como o mecanismo predominante na formação de rearranjos citogeneticamente equilibrados. Mas, apesar da ausência de homologia entre as sequências dos segmentos que se unem, em cerca de 30% dos rearranjos equilibrados foram detectadas micro homologias de dois ou mais pares de bases entre as sequencias participantes dos rearranjos (Chianget al., 2012), sugerindo que mecanismos baseados em micro homologia possam contribuir também para a formação de alterações estruturais equilibradas (Kloosterman et al.,2012). Um mecanismo de formação similar ao NHEJ, mas baseado em micro homologia é o *microhomology-mediatedend-joining* (MMEJ). Trata-se de mecanismo de reparo de quebras de dupla fita do DNA que utiliza micro homologia de cinco a 25 pares de bases

para alinhar as extremidades quebradas antes de torná-las compatíveis (McVey et al., 2008). O processo de MMEJ resulta predominantemente em deleções, em geral maiores que as observadas no reparo por NHEJ; mas inserções também podem ser observadas. Outros mecanismos que requerem a presença de micro homologia são *fork stalling and template switching* (FoSTeS; Lee et al., 2007) e *microhomology-mediated break-induced replication* (MMBIR; Hastings et al., 2009), ambos baseados na troca de forquilha durante a replicação do DNA. A mudança de forquilha exige a presença de micro homologia com os sítios invadidos, para o *priming* da extremidade 3' reiniciar a replicação. FoSTeS e MMBIR são mecanismos propostos para explicar um número crescente de alterações estruturais, principalmente deleções e duplicações (Zhang et al., 2009). No entanto, há poucos rearranjos equilibrados cuja formação estaria associada a erros de replicação de DNA; um desses casos é a translocação t(X;22) que detectamos em uma menina com a doença de Pelizaeus Merzbacher (Fonseca et al., 2013).

Uma importante contribuição da aplicação do NGS ao estudo de rearranjos equilibrados é a possibilidade de investigar os mecanismos de formação de rearranjos complexos (Kloosterman et al., 2012; Chiang et al., 2012). Apesar da natureza complexa desses rearranjos já poder ser identificada na resolução do bandamento G, a análise por NGS frequentemente identifica pontos de quebras adicionais, mostrando que esses rearranjos são formados por múltiplas quebras (>10), mesmo os constitucionais. O mecanismo de *chromothripsis*, inicialmente proposto como modelo para a formação de rearranjos somáticos extremamente complexos (>100 quebras) identificados em tumores (Stephens et al., 2011), também foi proposto para explicar a formação de rearranjos complexos constitucionais. Nesse mecanismo, em uma única célula da linhagem germinativa, agentes endógenos ou exógenos induziriam, simultaneamente, múltiplas quebras na dupla fita do DNA, resultando em fragmentação cromossômica; as múltiplas quebras seriam reparadas por NHEJ ou MMEJ (Kloosterman et al., 2011; Kloosterman et al., 2012; Chiang et al., 2012; Nazaryan et al., 2014). O *clustering* das quebras e a predominância de rearranjos equilibrados ou associados a microdeleções menores do que 1 Mb são características comuns de rearranjos constitucionais formados por *chromothripsis*.

Com o objetivo de compreender os mecanismos geradores dos rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados, aliamos o mapeamento dos pontos de quebra e junção por MPS ao sequenciamento dos fragmentos de junção pelo método de Sanger, caracterizando-os no nível de pares de bases.

IX.2 Material e Métodos

Vinte rearranjos citogeneticamente equilibrados foram investigados, aplicando-se sequenciamento de nova geração – *Mate-Pair Sequencing*, MPS (Tabelas IX.1 e IX.S1). Com base nos segmentos dos pontos de quebra delimitados por MPS (entre 100 pb e 5 kb), foi realizado o sequenciamento dos segmentos de junção de 17 rearranjos, pelo método de Sanger (Tabela IX.1). Os *primers* desenhados para amplificação dos segmentos para o sequenciamento de Sanger estão descritos na Tabela IX.S2.

A metodologia utilizada está descrita no Capítulo III – Pacientes e Métodos.

IX.3. Resultados e Discussão

Neste estudo, em que nosso objetivo foi identificar os mecanismos de formação dos rearranjos citogeneticamente equilibrados, incluímos 20 rearranjos - 13 translocações, três inversões e quatro rearranjos complexos (CCR), cujos pontos de quebra foram mapeados por MPS (Tabelas IX.1 e IX.S1). A análise prévia por aCGH havia indicado que oito desses 20 rearranjos continham deleções nos cromossomos rearranjados (Tabela IV.1). Os dados de MPS revelaram que três translocações simples eram rearranjos complexos ($t(10;21)(q21.2;q22.2)$, $t(5;18)(q33.3;q21.1)$, e $t(10;21)(p13;q22)$; Tabela IX.1 e IX.S1). Os pontos de quebra da $t(X;17)(q21\sim22;p11.1)$ não puderam ser mapeados por MPS, provavelmente porque a quebra em 17p11.1 ocorreu em região altamente repetitiva.

Os segmentos de junção das quebras de 17 dos 20 rearranjos foram sequenciados pelo método de Sanger, com o objetivo de compreender os mecanismos de formação (Tabelas IX.1 e IX.2). Nove translocações, três inversões e um rearranjo complexo tiveram todos os fragmentos de junção sequenciados; também foram sequenciados 17 fragmentos de junção de quatro rearranjos complexos, totalizando 51 fragmentos sequenciados (Tabela IX.1). As junções de dois rearranjos complexos, a translocação complexa $t(10;21)$ e inserção $ins(16)$ não foram sequenciadas; esses rearranjos foram mapeadas apenas por MPS (Tabela IX.S1).

A análise por aCGH revelou uma deleção de 100 kb em Xq25 na paciente portadora da $t(X;17)$ (Tabela IV.1). Sequenciamos o fragmento de junção dessa deleção. Nesse fragmento de junção foi detectada uma inserção de 36 pb (Tabela IX.S3). Como os dados obtidos por MPS não permitiram identificar as regiões das quebras da translocação, por supostamente se localizarem em regiões repetitivas, não está claro se a deleção constitui evidência de que a translocação seja um rearranjo mais

complexo, ou se a deleção é evento independente da translocação. Por essa razão, as quebras dessa deleção não foram consideradas em nossa análise dos dados combinados.

Dentre as 51 quebras, 23 (45%) ocorreram em elementos repetidos, principalmente SINE (6) e LINE (9) (Tabela IX.3). Dois estudos anteriores mostraram a presença de elementos repetidos em 44% (8/18) (Higgins et al., 2008) e 39% (55/141) (Chiang et al., 2012) dos pontos de quebras de rearranjos equilibrados, sugerindo que essas regiões sejam mais suscetíveis a quebra.

Sete das 51 junções eram *blunt fusions*, ou seja, sem alterações em relação ao genoma de referência (Tabelas IX.1 e IX.2). Deleções, inserções e duplicações foram detectadas nas demais junções de fragmentos.

Não observamos homologia (>70 pb) entre as sequências participantes desse rearranjo citogeneticamente equilibrado. Sequências homólogas não alélicas são responsáveis pela formação de alterações estruturais recorrentes, por meio do mecanismo de recombinação homóloga não alélica (*non-allelic homologous recombination*; NAHR; Shaw e Lupski, 2004). Raramente rearranjos não recorrentes, como os investigados neste estudo, são formados por NAHR. Por outro lado, micro homologia de 2 pb a 30 pb de extensão foram observadas em 20 junções (Tabelas IX.1 e IX.2). No entanto, na maioria dessas junções (16), a micro homologia era de 2 pb a 4 pb de extensão e em nove, de uma única base. A pequena extensão de micro homologia também foi detectada em estudo anterior (Chiang et al., 2012). Nossos dados aliados aos da literatura apontam, assim, para o mecanismo de NHEJ, que não requer a presença de similaridade entre as sequências participantes do rearranjo, como o principal mecanismo responsável pela formação de alterações estruturais citogeneticamente equilibradas. Junções do tipo *blunt fusion* ou contendo del/dup/ins <10 pb, típicas de NHEJ, foram observadas na maioria das quebras investigadas neste estudo apoiando a ocorrência desse mecanismo (Tabela IX.2). Deve-se salientar que, apesar de NHEJ não requer similaridade entre as sequências para reparar quebras de dupla fita, micro homologia de 1 pb - 4 pb de extensão é frequentemente utilizada pelas enzimas atuantes no NHEJ (Ma et al., 2003; Lieber et al., 2010). Assim, a presença de micro homologia de 1pb -4 pb de extensão pode apenas refletir a ocorrência de NHEJ, ao invés de sugerir mecanismos baseados em micro homologias.

Observamos diferença entre as características das junções de rearranjos simples (translocações e inversões), em sua maioria com sinais de NHEJ, e de rearranjos complexos (Tabelas IX.1 e IX.2). As junções dos rearranjos complexos eram

heterogêneas, com sinais de NHEJ ou MMEJ, ou eram junções que não podiam ser explicadas por esses mecanismos, por conterem deleções/inserções de mais 30 pb e não estarem associadas a micro homologies. Essa heterogeneidade também foi observada em rearranjos complexos investigados em outros estudos (Chiang et al., 2012; Kloosterman et al., 2012). Esses dados podem sugerir que múltiplos mecanismos atuam na formação de rearranjos complexos, nos quais a extensa reorganização cromossômica é mediada por NHEJ, embora o reparo mediado por homologia (MMEJ) ou até mesmo mecanismos de troca de forquilha (MMBIR) possam contribuir também para sua formação (Chiang et al., 2012). Alternativamente, a complexidade das junções de rearranjos complexos pode indicar que esses rearranjos sejam formados a partir de mecanismo ainda não esclarecido (Chiang et al., 2012).

Tabela IX.3. Distribuição dos 23, dentre 51 pontos de quebra, que ocorreram em elementos repetidos no genoma

Elemento repetido	Número de quebras
SINE	6
LINE	9
LTR	3
Outros	5
Total	23/51

Tabela IX.1: Características de 51 segmentos de junção de 17 rearranjos citogeneticamente equilibrados, sequenciados pelo método de Sanger.

Localização do ponto de quebra			Gene	Elemento Repetido	Modificações de sequências nas regiões das quebras			Segmento de junção	Inserção na junção	Homologia na junção
Chr (Quebra)	Banda	Sequenciamento Sanger (hg 19)			Del	Dup	Subst			
t(2;18)(q33;q21.3)										
2(1)	2q33.1	chr2:197,989,283	<i>ANKRD44</i>	L1ME4a (LINE)	T			der(2)		
18(1)	18q21.2	chr18:52,895,525-52,895,527	<i>TCF4</i>		AGG			der(18)		
t(2;16)(q36.1;q24.1)										
2(1)	2q35	chr2:220,991,633-220,991,636			GGTA			der(2) ⁽¹⁾		TATA
16(1)	16q24.1	chr16:86,214,739-86,214,741		(CA)n Simple_repeat	ATA			der(16) ⁽¹⁾		AT
t(14;15)(q13;q22.1)										
14(1)	14q13.3	chr14:36,987,151-36,987,153	<i>NKX2-1</i>		TCA			der(14)		C
15(1)	15q21.3	chr15:58,813,620-58,813,620	<i>LIPC</i>	L2c (LINE)				der(15)		C
t(11;18)(q13.1;q21.31)										
11(1)	11q13.1	chr11:65,167,008	<i>FRMD8</i>					der(11)*		CC
18(1)	18q21.2	chr18:52,940,666	<i>TCF4</i>				A>T	der(18)		
t(1;7)(q23.1;p13)pat										
2(1)	1q23.3	chr1:164,845,238-164,845,239		(TA)nSimple_repeat		TA		der(1)	CA	
7(1)	7p14.1	chr7:41,201,432-41,201,443	<i>PBX1</i>		AGAAAATAA CTA		C>T	der(7)	CTGGCAG	
t(4;14)(q27;q13)										
4(1)	4q26	chr4:114,870,849-114,870,853	<i>ARSJ</i>	MIRb (SINE)	GACTT			der(4)		G
14(1)	14q12	chr14:29,630,920-29,630,929			GCCCTGGCT			der(14)		TA
t(2;9)(q14.2;p22)pat										
2(1)	2q14.3	chr2:125,848,503						der(2)*		
9(1)	9p23	chr9:13,259,958-13,259,959	<i>MPDZ</i>	AluSz6 (SINE)	GA			der(9)		

* *Blunt fusion*

(1) Os segmentos de junção estão representados na Figura IX.1

(Continua)

Tabela IX.1. Características de 51 segmentos de junção de 17 rearranjos citogeneticamente equilibrados, sequenciados pelo método de Sanger (Continuação)

Localização do ponto de quebra			Gene	Elemento Repetido	Modificações de sequências nas regiões das quebras			Segmento de junção	Inserção na junção	Homologia na junção
Chr (Quebra)	Banda	Sequenciamento de Sanger (hg 19)			Del	Dup	Sub			
t(4;18)(p15.2;q11.2)										
4(1)	4p15.2	chr4:25,625,622-25,626,074		FLAM_A(SINE)	453 pb			der(4) ⁽²⁾		30pb
18(1)	18q11.2	chr18:19,176,209-19,176,676	<i>ESCO1</i>	AluSx1 (SINE)	468pb			der(18) ⁽²⁾		AA
t(6;7)(q12;q31)										
6(1)	6q12	chr6:67599069-67601717		L1MB1 (LINE)	2649 pb		A>C	der(6)		AGT;CCAA
7(1)	7q31.33	chr7:124,998,970-124,998,990	LOC	Tigger1(DNA	21pb ⁽³⁾			der(7)	29pb ⁽⁴⁾	
inv(2)(q14.3q31.1)										
2(1)	2q14.3	chr2:123,415,047						Proximal ⁽⁵⁾	23pb	
2(2)	2q24.3	chr2:169,177,334-169,177,335				GA		Distal		AGA
inv(12)(p11.2q24.1)mat										
12(1)	12p11.23	chr12:27,763,605-27,763,607	<i>PPFIBP1</i>	LCR	AGT			Proximal ⁽⁶⁾	20pb	
12(2)	12q23.3	chr12:106786927-106786936	<i>POLR3B</i>		TGCAGGTGT			Distal	C	
inv(12)(q15q24.2)mat										
12(1)	12q15	chr12:70,180,810	<i>RAB3IP</i>					Proximal*		T
12(2)	12q24.11	chr12:110,320,027-110,320,028		L2a(LINE)	AG			Distal		GT

* *Blunt fusion*

(2) Os segmentos de junção estão representados na Figura IX.2

(3) Deleção de 21 pb de sequência do cromossomo 7: CTTTGAAGATATTGTGGGTTTC

(4) Inserção no segmento de junção do der(7): AAATCTAGCATGTAGCATGCATGAAATCT

(5) O segmento de junção proximal da inversão está representado na Figura IX.3

(6) O segmento de junção proximal da inversão está representado na Figura IX.3

(Continua)

Tabela IX.1. Características de 51 segmentos de junção de 17 rearranjos citogeneticamente equilibrados, sequenciados pelo método de Sanger (Continuação)

Localização do ponto de quebra			Gene	Elemento Repetido	Modificações de sequências nas regiões das quebras			Segmento de junção	Inserção na junção	Homologia na junção
Chr (Quebra)	Banda	Sequenciamento de Sanger (hg 19)			Del	Dup	Subst			
ins(2)(p13;q11.2q21)ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)										
2(1)	2p22.3	chr2:34,769,728-34,769,734	<i>LTR13A</i>	L1PA8(LINE)	TACTCAC			12(1)/18(2)		A
2(2)	2p16.1	chr2:59,400,457-59,400,501		LTR13A (LTR)	45pb			18(1)/12(1)		
2(3)	2q24.3	chr2:166,101,746-166,101,774	<i>SCN2A</i>	THE1C (LTR)	29pb ⁽⁷⁾			18(1)/18(3)	A	
2(4)	2q31.1	chr2:170,409,621		SINE(AluSz)				18(2)/18(3)		CAGG
2(5)	2q31.1	chr2:171,158,061	<i>MY30B</i>					2(1)/2(5)		AT
2(6)	2q32.3	chr2:194,336,428		MER52-int (LTR)				2(6)/2(3)		G
18(1)	18q11.2	chr18:20,297,220-20,297,230			TAAGCT TCCTG			2(4)/2(2) ⁽⁸⁾		GC
18(2)	18q21.33	chr18:59,348,240-59,348,249				CAGGGC TTAT		2(1)/2(2) ⁽⁸⁾		CTTC
18(3)	18q21.33	chr18:60,692,183				C		2(3)/2(6)		G
12(1)	12p12.1	chr12:23,836,959				A				
t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)										
7(1)	7q33	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
7(2)	7q33	chr7:138,161,719	<i>TRIM24</i>	L1MC4a (LINE)						
7(3)	7q34	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
7(4)	7q34	-----	-----	-----	-----	-----	-----			

----- Junção não foi sequenciada pelo método de Sanger

(7) Sequência da deleção: ACCCTGTGGGAGATAATTTAATCACGGGG (29pb)

(8) Os segmentos de junção 2(1)/2(2) e 2(4)/2(2) estão representadas na Figura IX.5

(Continua)

Tabela IX.1. Características de 51 segmentos de junção de 17 rearranjos citogeneticamente equilibrados, sequenciados pelo método de Sanger (Continuação)

Localização do ponto de quebra			Gene	Elemento Repetido	Modificações de sequências nas regiões das quebras			Segmento de junção	Inserção na junção	Homologia na junção
Chr (Quebra)	Banda	Sequenciamento de Sanger (hg 19)			Del	Dup	Subst			
t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13) (continuação)										
7(5)	7q34	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
7(6)	7q34	chr7:140,110,888	<i>RAB19</i>					7(1)/11(2)	-----	-----
7(7)	7q34	chr7:140,246,784	<i>DENND2A</i>					11(3)/11(2)	CTTTTA ATTAAAA	
7(8)	7q34	chr7:140,988,569	<i>TMEM178B</i>					11(1)/7(12)	-----	-----
7(9)	7q35	chr7:144,718,524						7(11)/7(12)		AGGA
7(10)	7q35	chr7:145,362,397						7(13)/11(5) ⁽⁹⁾		AGCAAC
7(11)	7q35	chr7:145,395,870-145,396,006				137pb		11(4)/7(13)	-----	-----
7(12)	7q35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	7(14)/7(8)*		G
7(13)	7q35	-----	-----	-----	-----	-----	-----	7(9)/7(10)*		
7(14)	7q35	-----	<i>CNTNAP2</i>					7(11)/10(1)	AAA	
10(1)	10p12.1	chr10:27,981,375-27,981,377	<i>MKX</i>			TCC		7(14)/7(5)	-----	-----
11(1)	11p14.1	chr11:27,873,348-27,873,356		CTrich(Low_com)		TTTCTG TCC		7(3)/7(4)	-----	-----
11(2)	11p14.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	7(2)/7(6)	GAGT	
11(3)	11p14.1	chr11:28,938,918		L1PB3 (LINE)				7(7)/ 10(1) ⁽⁹⁾	180bp	AAGGAAG
11(4)	11p13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	11(1)/11(5) ⁽⁹⁾		CC
11(5)	11p12	chr11:38,000,754-38,000,760 chr11:38,000,643-38,000,644				CCAATG AC				

----- Junção não sequenciada *Blunt fusion

(9) Segmentos de junção representados nas Figuras IX.7 e IX.8

(Continua)

Tabela IX.1. Características de 51 segmentos de junção de 17 rearranjos citogeneticamente equilibrados, sequenciados pelo método de Sanger (Continuação)

Localização do ponto de quebra			Gene	Elemento Repetido	Modificações de sequências nas regiões das quebras			Segmento de junção	Inserção na junção	Homologia na junção
Chr (Quebra)	Banda	Sequenciamento de Sanger (hg 19)			Del	Dup	Sub			
t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1)										
1(1)	1p36.32	-----	-----	-----	-----	-----	-----	16(1)/1(2)	-----	-----
1(2)	1p36.32	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1(3)/1(4)	-----	-----
1(3)	1p36.32	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1(5)/17(5)⁽¹⁰⁾	TCCT;ATG CCCTCAT CC;CTCCT	
1(4)	1p36.32	-----	-----	-----	-----	-----	-----	17(4)/17(3)	-----	-----
1(5)	1q21.2	chr1:149901881-149901952	<i>MTMR11</i>		A	T;CCC ACTCA C;TCTT CA		17(2)/3(1)*		
3(1)	3q21.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	9(1)/17(3)	-----	-----
9(1)	9q34.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	17(4)/1(1)	-----	-----
12(1)	12p13.33	chr12:1639450-1639469		G-rich (Low_complexity)	GGGGAGGA GGCGCGGGA GGC			1(2)/3(1)	-----	-----
12(2)	12p13.33	chr12:2,019,214-2,019,264	<i>CACNA2D4</i>	L1MB5 (LINE)	52pb			12(1)/12(2)⁽¹⁰⁾	76pb	GGGTG
16(1)	16p13.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	12(1)/17(2)		GGG
16(2)	16p13.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	17(1)/16(2)	-----	

----- Junção não sequenciada

* *Blunt fusion*

(10) As junções 1(5)/17(5), 12(1)/12(2), 1(5)/12(2) estão representadas na Figura IX.9; 26 pb da sequência de 35 pb inserida na junção 1(5)/12(2) corresponde a sequência de 5p15.1 (chr5:17,345,203-17,345,228)

Tabela IX.1. Características de 51 segmentos de junção de 17 rearranjos citogeneticamente equilibrados, sequenciados pelo método de Sanger (Continuação)

Localização do ponto de quebra			Gene	Elemento Repetido	Modificações de sequências nas regiões das quebras			Segmento de junção	Inserção na junção	Homologia na junção
Chr (Quebra)	Banda	Sequenciamento de Sanger (hg 19)			Del	Dup	Sub			
t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1) (continuação)										
17(1)	17p13.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1(5)/12(2) ⁽¹⁰⁾	35pb	
17(2)	17p13.3	chr17: 890,827						9(1)/16(2)	-----	-----
17(3)	17p13.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
17(4)	17p13.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
17(5)	17p13.3	chr17:2,589,431								
17(6)	17p13.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
t(10;21)(q21.2;q22.2)										
10(1)	10p14	chr10:11,766,440-11,766,442		AluJr (SINE)		AAT		10(1)/21(2)		T
10(2)	10q21.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	21(1)/10(2)	-----	-----
10(3)	10q21.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	10(3)/10(2)	-----	-----
21(1)	21q22.13	-----	-----	-----	-----	-----	-----	10(1)/21(2)	-----	-----
21(2)	21q22.13	chr21:38,809,417-38,809,418	<i>DYRK1A</i>			TA		21(1)/10(3)		A

- Junção não sequenciada

* *Blunt fusion*

(10) As junções 1(5)/17(5), 12(1)/12(2), 1(5)/12(2) estão representadas na Figura IX.9; 26 pb da sequência de 35 pb inserida na junção 1(5)/12(2) corresponde a sequência de 5p15.1 (chr5:17,345,203-17,345,228)

(Continua)

Tabela IX.1. Características de 51 segmentos de junção de 17 rearranjos cromossômicos equilibrados, sequenciados pelo método de Sanger (Continuação).

Localização do ponto de quebra			Gene	Elemento Repetido	Modificações de sequências nas regiões das quebras			Segmento de junção	Inserção na junção	Homologia na junção
Chr (Quebra)	Banda	Sequenciamento de Sanger (hg 19)			Del	Dup	Sub			
t(5;18)(q33.3;q21.1)										
5(1)	5q33.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5(1)/5(5)	-----	-----
5(2)	5q33.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5(4)/18(6)	-----	-----
5(3)	5q33.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	18(1)/18(4)	-----	-----
5(4)	5q33.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	18(5)/18(3) *		CA
5(5)	5q33.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	18(4)/5(2)	-----	-----
5(6)	5q33.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5(3)/18(2)	-----	-----
18(1)	18q12.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	18(3)/5(6)	-----	-----
18(2)	18q12.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
18(3)	18q12.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
18(4)	18q12.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
18(5)	18q12.3	chr18:42,573,538-42,573,539	<i>SETBP1</i>	L1ME3E(LINE)						
18(6)	18q12.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----			

----- Junção não sequenciada

**Blunt fusion*

Tabela IX.2: Resumo das características dos 51 segmentos de junção das quebras de translocações, inversões e rearranjos complexos (CCR), determinadas após sequenciamento de Sanger.

Segmentos de Junção	Translocações	Inversões	CCR	Todos
<i>Blunt fusions</i>	2	1	4	7
Com modificações	16	5	23	44
Total	18	6	27	51
Deleções (pb)				
1-10	9	3	3	15
11-20	1		2	3
21-30	1		1	2
31-40				0
41-100			2	2
100-300			1	1
301-1000	2			2
>10000	1			1
Total				26
Duplicações (pb)				
1-10	1	1	8	10
Total				10*
Inserções (pb)				
1-10	2	1	4	7
11-20		1	2	3
21-30	1	1		2
31-40			1	1
41-10			1	1
100-300			1	1
Total				14**
Substituições (pb)				
1	3			3
Total				3
Micro homologia (pb)				
1 pb	3	1	5	9
2 pb a 4 pb	6	2	8	16
5 pb a 10 pb	1		3	4
11pb a 20 pb				0
21 pb a 30 pb	1			1
Total				29***

* Dois segmentos de junção contêm duas duplicações de 1-10 pb

** Um segmento de junção [junção 1(5)/17(5) da t(1;17;3;1;12;16)] tem inserções de 3pb, 12 pb e 20 pb

*** O fragmento de junção da t(6;7), no der(6) tem micro homologia de 3pb e de 10bp; no segmento de junção 2(4)/2(2) da ins(2) há micro homologia de 2pb e 3 pb.

IX.3.1 Mecanismos de formação das translocações

Nove translocações tiveram os segmentos de junção das quebras sequenciados (Tabela IX.1). Em seis translocações, foram detectadas deleções de 1 pb a 12 pb, em uma [t(2;9)(q14.2;p22)pat; t(1;7)(q23.1;p13)] ou ambas as junções [t(2;18)(q33;q21.3), t(2;16)(q36.1;q24.1), t(14;15)(q13;q22.1), t(4;14)(q27;q13)]. A translocação t(1;7) também continha pequenas inserções (2 pb e 7 pb), em ambos os fragmentos de junção, e uma duplicação de 2 pb de sequência do cromossomo 1. A t(11;18)(q13.1;q21.31), a única das nove translocações que não incluía deleções, estava associada a uma única substituição de nucleotídeo no der(18). Dos 14 fragmentos de junção sequenciados dessas sete translocações, em apenas quatro foi detectada micro homologia, de 2pb – 4 pb de extensão (Tabela IX.2). A ausência de homologia entre as sequências participantes das translocações ou a presença de micro homologia de pequena de extensão, e a ocorrência de deleções <12 pb ou, mais raramente, inserções e duplicações pequenas são indicativos de NHEJ como o mecanismo formador dessas sete translocações (Figura IX.1).

Duas translocações - t(4;18)(p15.2;q11.2) (Figura IX.2) e t(6;7)(q12;q31) -diferiram das outras sete investigadas. Apesar de essas translocações terem resultado também em perdas nos pontos de quebra, essas deleções incluíam um número maior de pares de bases [21 pb e 2649 pb na t(6;7); 453 pb e 468 pb na t(4;18)]; no fragmento de junção do der(7) também foi detectada um inserção de 29 pb. No der(7) havia ainda micro homologia de 3 pb e 10 pb; no der(4) foi identificado um segmento de micro homologia de 30 pb. A presença de micro homologia com extensão >5 pb e de deleções nos segmentos que flanqueiam as quebras de ambas as translocações constitui evidência de MMEJ (Ottaviani et al., 2014). Por outro lado, na translocação t(6;7), a inserção de 29 pb detectada na junção no der(7) não é característica de mecanismos de *end-joining*. Inserções longas podem-se originar de sequências de outras regiões do genoma, devido a eventos de troca de forquilha, característico de mecanismos baseados em replicação; no entanto, a sequência da inserção no der(7) não corresponde a outras regiões do genoma humano. Uma deleção de 700 kb em 6q13 também foi detectada no portador da t(6;7), estando contida no segmento translocado para o cromossomo 7; as quebras que a originaram ocorreram a uma distancia de 17 Mb da quebra da translocação, podendo ou não ser evento independente. Quanto à translocação t(4;18), elementos Alu podem ter contribuído para sua formação. A quebra do cromossomo 4 ocorreu em um elemento FLAM_A (família Alu) e o segmento da deleção inclui um extenso elemento AluSx1. A quebra do cromossomo 18 ocorreu em um elemento AluSx1 e, próximo à quebra, está localizado outro elemento da família Alu (AluJb). Estudos *in vivo* demonstraram que elementos Alu podem mediar a formação de translocações por meio de MMEJ ou pela via *single strand annealing* (SSA)

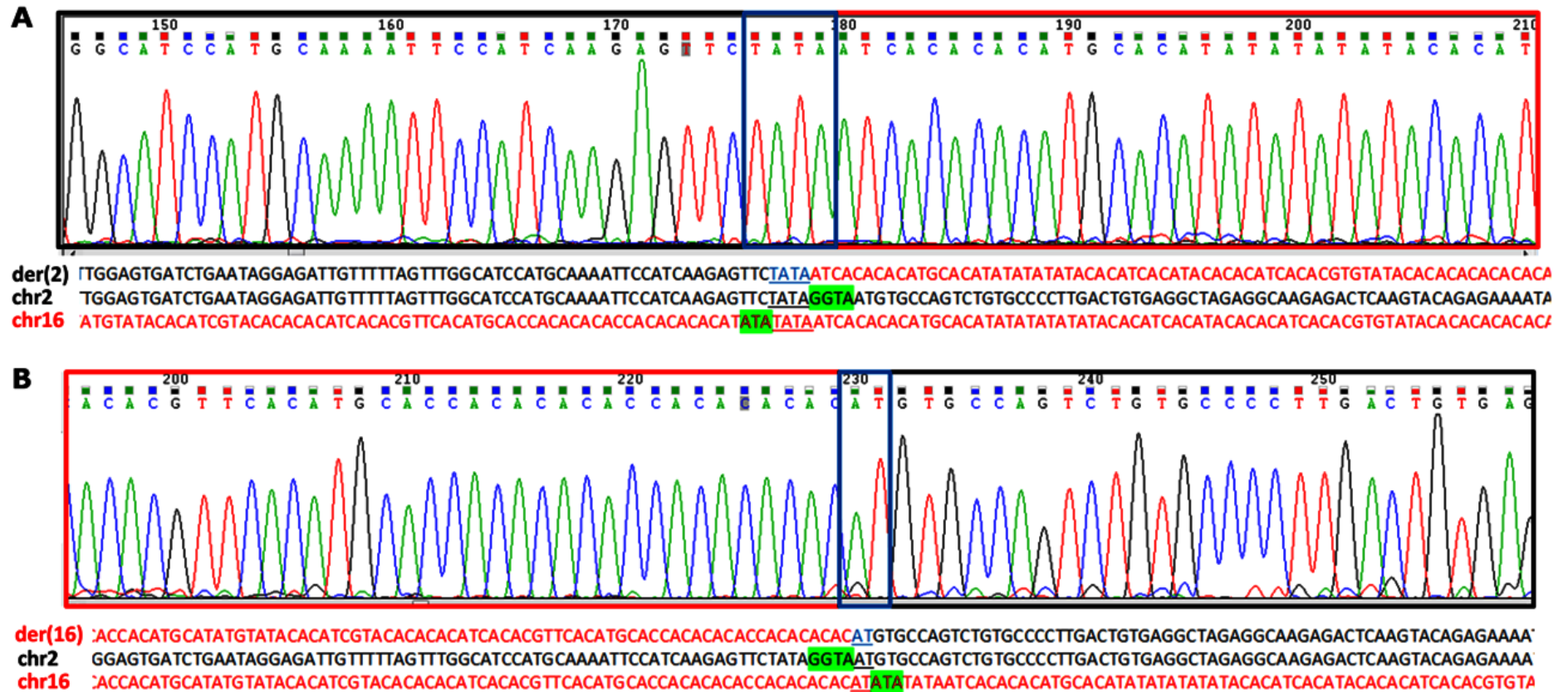


Figura IX.1: Sequenciamento de Sanger dos segmentos de junção da translocação $t(2;16)(q36.1;q24.1)$. As sequências das junções (A) no der(2) e (B) no der(16) são mostradas. As sequências dos cromossomos derivados são comparadas com as sequências referência dos cromossomos participantes da translocação (as sequências dos cromossomos 2 e 16 são representados, respectivamente, em preto e vermelho). Observam-se as junções das quebras das translocações, com perdas de três e quatro pares de bases (GGTA e ATA, em verde), provável resultado do reparo das quebras por NHEJ. Notam-se também micro homologia nos pontos de quebras (TATA e AT, grifadas), nos quais sequências são compartilhadas por ambos os cromossomos participantes da translocação.

a via SSA é favorecida pela indução de quebras na dupla fita do DNA nas proximidades de elementos Alu idênticos, enquanto que quebras próximas a elementos Alu divergentes resultaram em translocações formadas por MMEJ (Elliott et al., 2005). A presença de elementos Alu divergentes nas regiões das quebras apoia MMEJ, como mecanismo na formação da translocação t(4;18).

IX.3.2 Mecanismos de formação das inversões

Foram sequenciados os segmentos de junção das quebras de três inversões (Tabelas IX.1 e IX.2). Uma das inversões - inv(12)(q15q24.2)mat - continha uma deleção de 2 pb em uma das junções dos pontos de quebra, enquanto a outra junção não apresentava modificações (*blunt fusion*), padrão compatível com NHEJ. As outras duas inversões - inv(12)(p11.2q24.1)mat e inv(2)(q14.3q31.1)dn - continham inserções de 20 pb e 23 pares de bases, respectivamente, em um dos segmentos de junção (Figura IX.3). Essas inserções não correspondem a sequência do genoma de referência humano, afastando mecanismos de reparo baseados em troca de forquilha de replicação. Na inv(12)(p11.2q24.1)mat também havia deleções de 3 pb e 9pb. A ausência de micro homologia e a presença de inserções de segmentos ≥ 20 pb tornam peculiar o mecanismo de formação dessas inversões.

IX.3.3 Mecanismos de formação de rearranjos complexos

Investigamos sete rearranjos complexos por MPS, três deles identificados, após bandamento G, como rearranjos decorrentes de duas quebras, (Tabelas IX.1, IX.S1). Sequenciamos, pelo método de Sanger, 27 segmentos de junção de quebras, em cinco desses rearranjos (Tabelas IX.1 e IX.2). Não foram sequenciados os fragmentos de junção de dois rearranjos complexos, identificados após bandamento G como translocação - t(10;21)(p13;q22), e inserção ins(16)(p13.1q23q12.1) (Tabela IX.S1).

Dos cinco rearranjos complexos estudados no nível de pares de bases, ins(2)(p13;q11.2q21)ins(12;18)(p11;q21.3q11.2) foi o único que teve todos os segmentos de junção sequenciados. A análise por MPS revelou que esse rearranjo era formado por duas inserções independentes, totalizando 10 quebras que resultaram em nove junções (Tabela IX; Figura IX.4). Apesar da extensa reorganização cromossômica associada à formação desse rearranjo, apenas uma deleção de 700 kb foi identificada em 2q31. Essa deleção não parecia ter relação com a inserção do cromossomo 2, em virtude da distância que a separava das quebras da inserção, em 2p13, 2q11.2 e 2q21. Entretanto, a análise por MPS mostrou que houve reorganização cromossômica dos segmentos distais e proximais à deleção. Dessa forma, foi possível concluir que a deleção não constituía evento independente. Nos nove fragmentos de junção sequenciados por Sanger foram observadas duplicações e deleções.

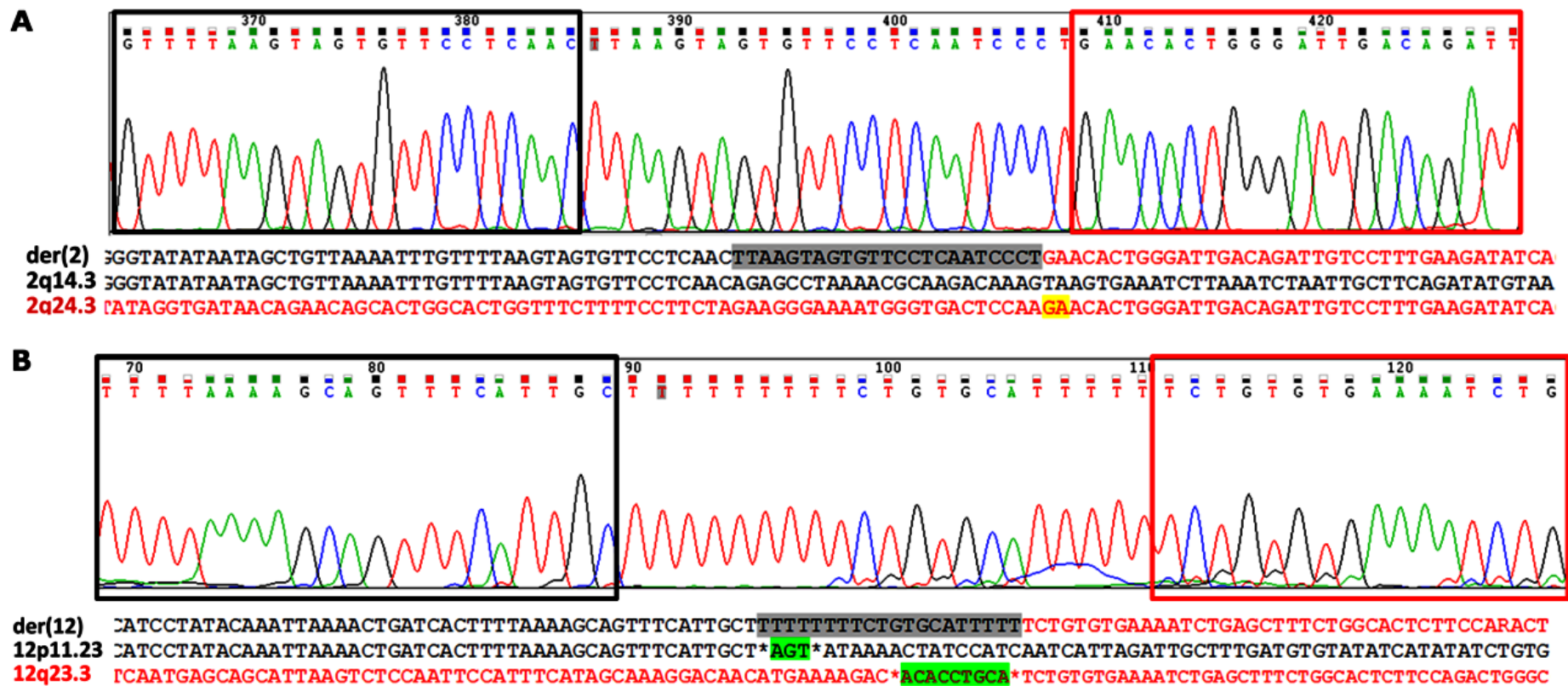


Figura IX.3: Sequenciamento de Sanger das junções das inversões *inv(2)(q14.3q31.1)dn* e *inv(12)(p11.2q24.1)mat* revela inserções. **A.** Sequência da junção proximal no *der(2)*. **B.** Sequência da junção proximal no *der(12)*. As sequências dos cromossomos derivativos são comparadas com as sequências referência dos cromossomos 2 e 12: sequências de 2q14.3 e 2q24.3, em preto e vermelho, respectivamente, em **A**; sequências de 12p11.23 e 12q23.3, em preto e vermelho, respectivamente, em **B**. As regiões das quebras são indicadas por asteriscos. Observam-se inserções (em cinza) de 20 e 23 pares de bases, respectivamente, em um dos segmentos de junção das inversões *inv(2)* e *inv(12)*. Essas inserções não correspondem a sequência do genoma de referência humano. Na *inv(2)* foi detectada também duplicação GA na sequência de 2q24.3 (**A**; em amarelo); na *inv(12)* ocorreram deleções nas sequências de 12p11 e 12q23 (**B**; em verde).

Apesar de o rearranjo incluir deleções e duplicações, na sua maioria <11 pb, duas quebras no cromossomo 2 resultaram em deleções de 29 pb e 45 pb (Figura IX.5). Em três junções, não havia homologia entre as sequências participantes das quebras ou foi identificada micro homologia de poucos pares de bases - 1 pb (duas quebras), 2 pb (uma quebra) e 4 pb (três quebras). Embora NHEJ explique a formação da maioria das junções, a complexidade das junções no cromossomo 2 sugere que MMEJ também possa ter atuado na formação desse rearranjo (Figura IX.5).

Em três dos cinco rearranjos complexos [t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1);t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35;p14p13);t(10;21)(p13;q22)], a extensa reorganização cromossômica aliada ao *clustering* de pontos de quebras sugere o mecanismo de *chromotripsis* como responsável pela sua formação. *Chromotripsis* foi inicialmente proposto como mecanismo para a formação de rearranjos aparentemente equilibrados somáticos identificados em células tumorais (Stephens et al., 2011). A análise por NGS de múltiplas linhagens celulares de diferentes tipos de câncer revelou, em 2% a 3% das células, rearranjos com mais de 100 quebras que resultaram em várias deleções e duplicações. O *clustering* de pontos de quebras sugeriu que os rearranjos não poderiam ter-se formado por eventos múltiplos e independentes, em subclones diferentes, o que foi apoiado pela análise estatística. A ausência de homologia e a presença de inserções ou microdeleções de poucos pares de base nos pontos de quebra indicou o mecanismo de NHEJ no reparo das extremidades quebradas. Os autores propuseram que os rearranjos teriam ocorrido em um único evento catastrófico, que denominaram de *chromothripsis* (*chromos*, cromossomo; *thripsis*, fragmentação). Posteriormente rearranjos constitutivos com características de *chromothripsis* foram identificados em indivíduos com atraso do desenvolvimento e malformações congênitas (Kloosterman et al. 2011; Chiang et al., 2012; Kloosterman et al. 2012; Nazaryan et al., 2014). Nesses casos, no entanto, a complexidade dos rearranjos era menor em comparação aos rearranjos tumorais. O número de quebras era menor (< 25) e os rearranjos eram, em sua maioria, equilibrados, estando raramente, associados a perdas de segmentos. Foi sugerido que as diferenças entre rearranjos somáticos e germinativos poderiam refletir diferenças no mecanismo de *chromothripsis* na linhagem germinativa e na somática (Kloosterman et al., 2013). Embora *chromothripsis* deva ocorrer como evento único em um mesmo ciclo celular, não está claro se é evento pré-zigótico ou se ocorre em estágios pós-zigóticos iniciais (Kloosterman et al., 2013). A primeira possibilidade é apoiada por estudos que demonstram a origem paterna dos rearranjos constitutivos (Kloosterman et al., 2011; Kloosterman et al., 2013).

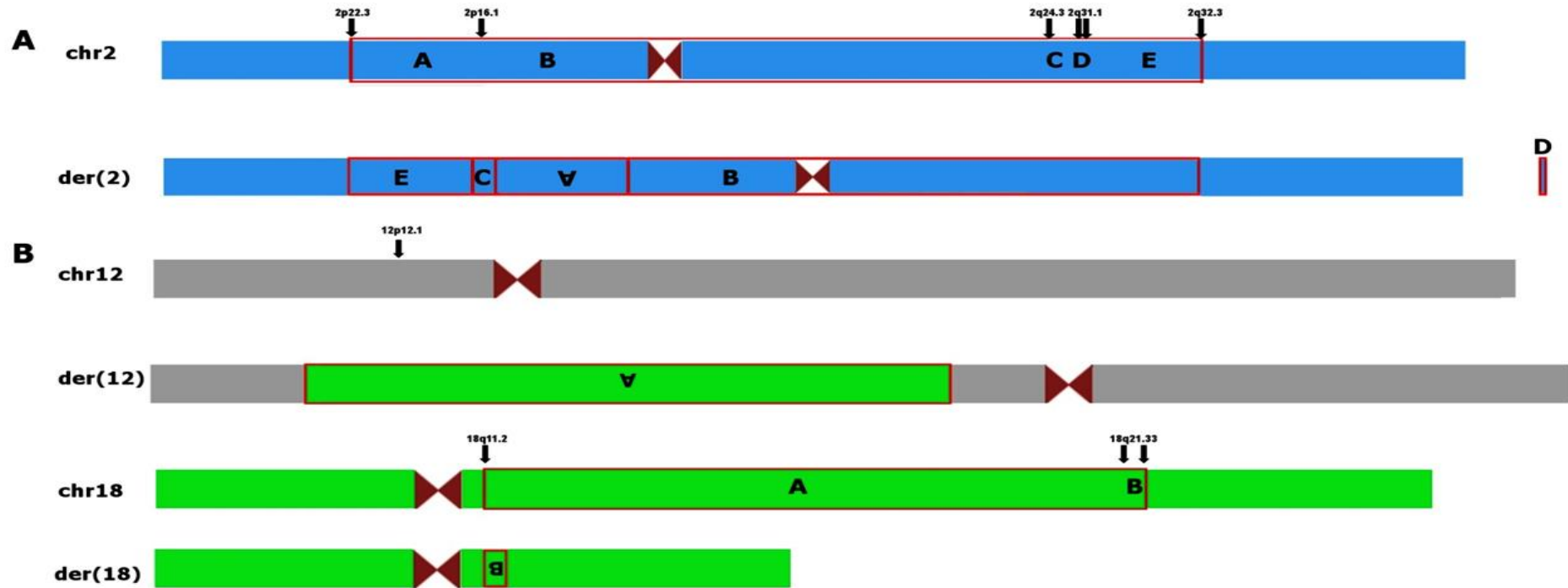


Figura IX.4: Estrutura dos cromossomos derivativos da *ins(2)(p13;q11.2q21)* e *ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)*, após as análises por aCGH, MPS e sequenciamento de Sanger dos segmentos de junção das quebras. A figura mostra os cromossomos derivativos 2 (azul), 12 (cinza) e 18 (verde) e a localização das quebras das duas inserções. Os segmentos rearranjados dos cromossomos estão delimitados por retângulos vermelhos. **A. *ins(2)(p13;q11.2q21)*.** As seis quebras do cromossomo 2 resultaram em extensa reorganização cromossômica, com segmentos reinseridos em outras regiões do cromossomo, um deles, em posição invertida (segmento A). Um dos fragmentos foi perdido (segmento D), correspondendo à deleção de 700 kb inicialmente detectada em 2q31.1, por aCGH. **B. *ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)*.** No cromossomo 18 ocorreram três quebras; o segmento maior (A) foi inserido, em posição invertida, em 12p12.1; o segmento menor (B) foi rearranjado em posição invertida no der(18).

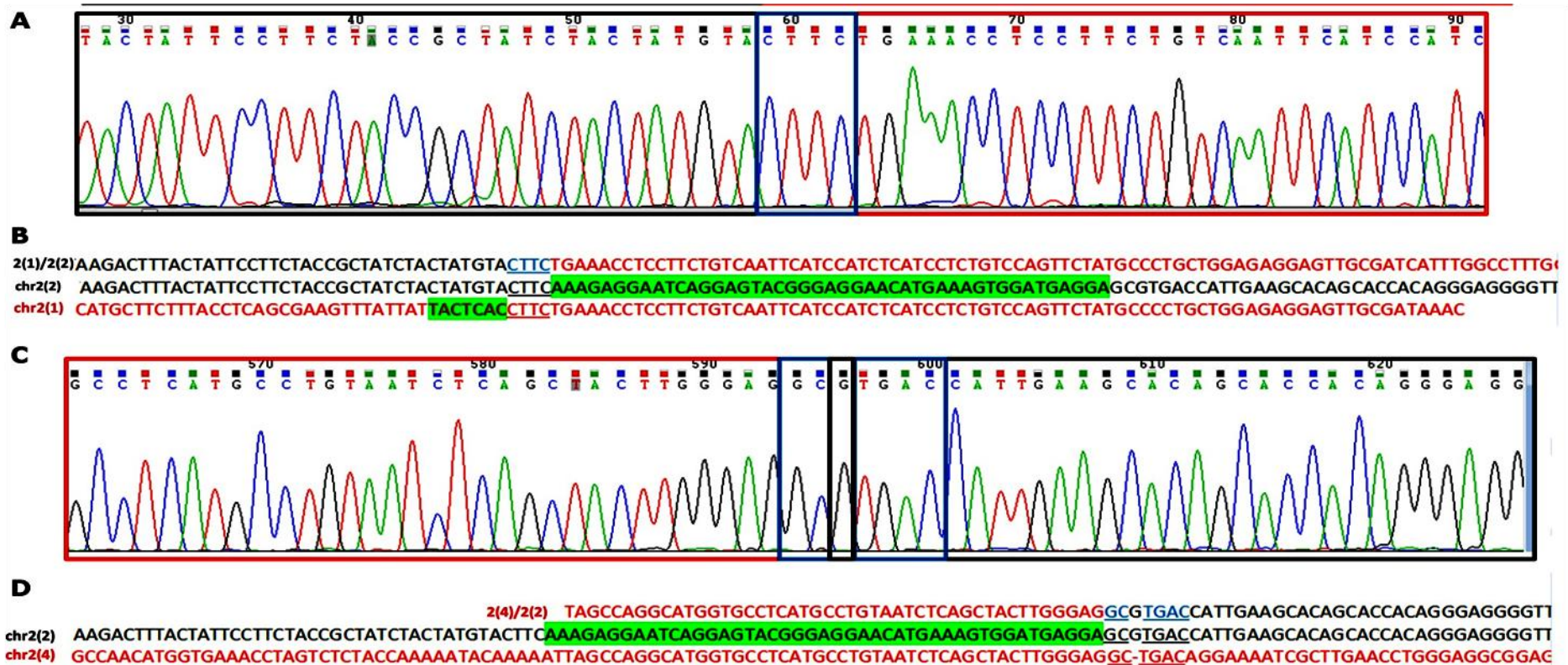


Figura IX.5: Complexidade das junções das quebras da inserção *ins(2)(p13;q11.2q21)*. A figura mostra as seqüências de dois segmentos de junção no cromossomo derivativo 2: **A.** Junção das quebras em 2p22.3 e 2p16.1 [Quebras 2(1) e 2(2) na Tabela IX.1]. **B.** Comparação da seqüência do cromossomo der(2) com a seqüência referência do cromossomo 2; a seqüência de 2p16.1 está representada em preto e a seqüência de 2p22.3, em vermelho. **C.** Junção das quebras em 2p16.1 e 2q31.1 [Quebras 2(2) e 2(4) na Tabela XI.1]. **D.** Comparação da seqüência do cromossomo der(2) com a seqüência referência do cromossomo 2; a seqüência de 2p16.1 está representada em preto e a seqüência de 2q31.1, em vermelho. As regiões de micro homologia estão representadas em azul nos cromossomos derivativos e grifadas nas seqüências referência. Nota-se micro homologia de quatro (CTTC) (A e B), dois (GC) e quatro (TGAC) (C e D) pares de bases nos pontos de quebras de ambas os segmentos de junção. As quebras em 2p22.3 e 2p16.1 estão associadas a deleções de 7 pb e de 45 pb, respectivamente (em verde). A presença de micro homologia aliada à extensão de uma das deleções sugere que MMEJ pode ter atuado na formação desse rearranjo.

Apesar de os fatores que induzem a ocorrência de *chromothripsis* não terem sido elucidados, um número crescente de evidências sugere que os micronúcleos tenham papel fundamental na ocorrência desse mecanismo (Crasta et al., 2012; Zhang et al., 2015). Os micronúcleos são estruturas formadas em decorrência de erros mitóticos que levam a atraso anafásico dos cromossomos ou de erros na replicação do DNA ou de reparo que geram fragmentos cromossômicos acêntricos (Terradas et al., 2010). Recentemente foi demonstrado experimentalmente que o isolamento de um ou alguns poucos cromossomos que sofreram atraso anafásico em micronúcleos pode levar à formação de rearranjos cromossômicos complexos, típicos de *chromothripsis* (Zhang et al., 2015). Nesse estudo os autores induziram a formação de micronúcleos pelo tratamento com agentes que causam erros mitóticos; os cromossomos segregados nos micronúcleos sofreram fragmentação e reorganização. Após a mitose, os cromossomos derivativos presentes nos micronúcleos podem ser reincorporados no núcleo das células filhas, integrando no genoma nuclear mutações originadas no micronúcleo (Crasta et al., 2012). O *clustering* de pontos de quebras característico de *chromothripsis*, seria explicado pelo fato de os cromossomos estarem confinados nos micronúcleos. A instabilidade cromossômica nos micronúcleos demonstra a importância da arquitetura nuclear e do envelope nuclear para a manutenção da instabilidade genômica em células eucarióticas.

O rearranjo $t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)$ foi formado a partir de 20 quebras (14 no cromossomo 7, cinco no cromossomo 11 e uma quebra no cromossomo 10) (Tabela IX.1, Figura IX.6). Os 14 pontos de quebra do cromossomo 7 estão localizados em um segmento de aproximadamente 11 Mb em 7q33-q35, enquanto que as cinco quebras no cromossomo 11 estão distribuídas em um segmento de aproximadamente 10 Mb em 11p14.1-p12. No cromossomo 7 derivativo, foram detectadas cinco deleções no segmento 7q33-q35 e outra deleção do segmento 11p14.1-p13 (Tabela IV.1).

Na $t(10;21)$ (Tabela IX.S1), as oito quebras no braço curto do cromossomo 10, em 10p14-p13, e as sete quebras no braço longo do cromossomo 10, em 10q25.2-q26.3, localizam-se, respectivamente, em segmentos de 4,5 Mb e 17 Mb. As três quebras do cromossomo 21, em 21q22.12q22.3, ocorreram em um segmento de 9 Mb. No braço curto, em 10p14 e 10p13, foram detectadas duas deleções; outras duas deleções foram detectadas no braço longo em 10q26.2 e 10q26.2-q26.3 (Tabela IV.1).

Na $t(1;17;3;1;12;16)$, quatro das cinco quebras do cromossomo 1 e as cinco quebras do cromossomo 17 localizam-se, respectivamente, em segmentos de 17 Mb e 2,4 Mb, em 1p36.32 e 17p13.3. Foram detectadas duas deleções nos braços curtos dos cromossomos 1 e 17 em 1p36.12 e 17p13.3 (Tabela IV.4).

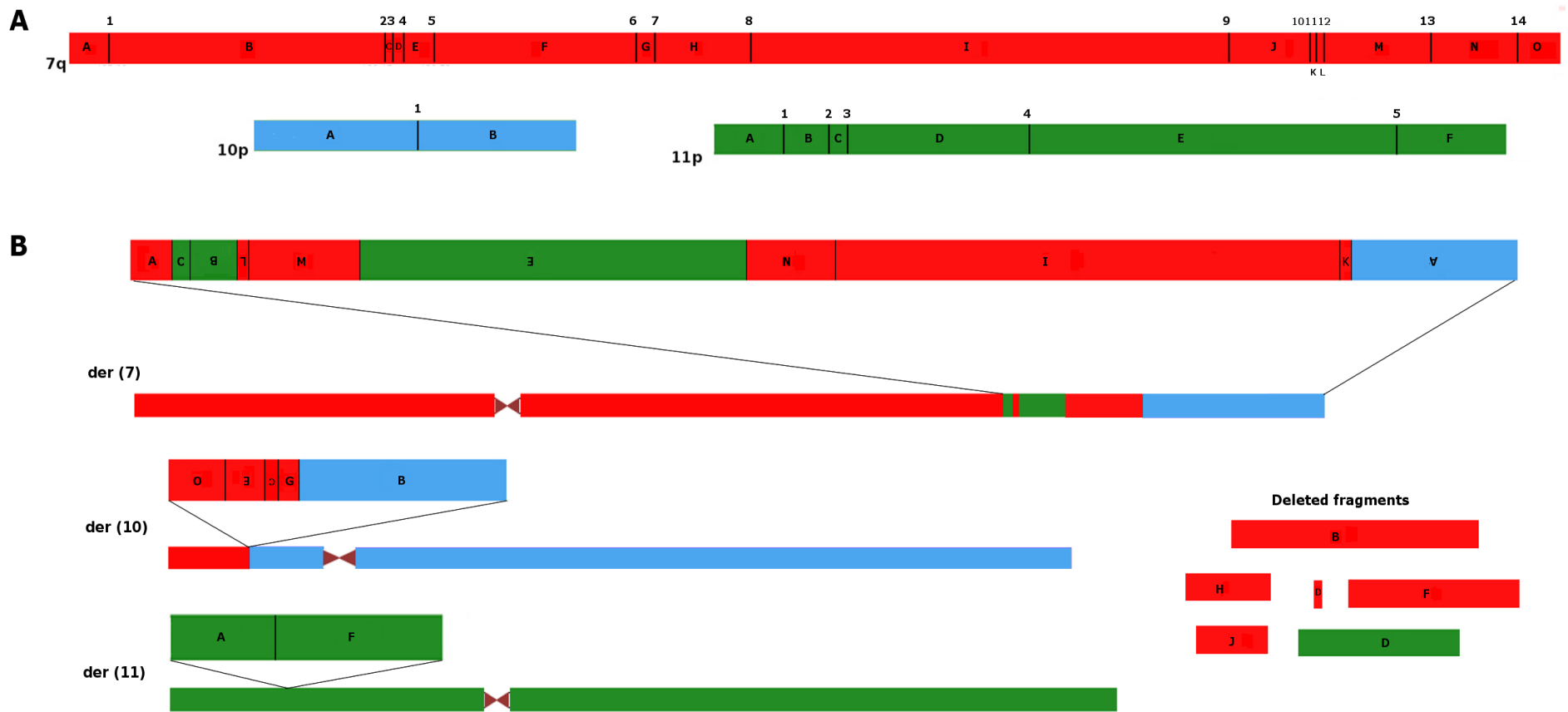


Figura IX.6: Chromotripsis como mecanismo de formação para a $t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)$. **A.** O rearranjo complexo foi formado a partir de 20 quebras, 14 em 7q33-q35 e cinco em 11p14.1-p12. Uma quebra ocorreu em 10p12.1. A distribuição das quebras nos cromossomos 7 e 11 evidencia o *clustering* em segmentos de 11 e 10 Mb, respectivamente. **B.** Estrutura dos cromossomos derivativos 7 (vermelho), 10 (azul) e 11 (verde), após análise por aCGH, MPS e sequenciamento Sanger. As 20 quebras resultaram em vários fragmentos e a estrutura final dos cromossomos derivativos revela a extensão reorganização inter e intracromossômica, com a presença de vários segmentos inseridos em posição invertida. Seis fragmentos foram perdidos, correspondendo às deleções dos cromossomos 7 e 11 detectadas por aCGH. A extensa reorganização cromossômica aliada ao *clustering* de pontos de quebras sugere o mecanismo de *chromotripsis* na formação desse rearranjo.

Esses três rearranjos contribuem para o entendimento do mecanismo de *chromothripsis*, ao evidenciar o *clustering* de quebras e mostrar a extensa reorganização dos cromossomos derivativos. Os três rearranjos incluem deleções, não associadas a mecanismo de reparo, que podem estar contribuindo para o quadro clínico; assim, a ausência de variações de números de cópias em rearranjos constitutivos, decorrentes de *chromotropsis*, que foram anteriormente descritos deve refletir a viabilidade dos conceitos e não constituir característica dos rearranjos constitutivos que os diferencie daqueles associados a câncer, como foi sugerido por Kloosterman (2013). Apesar de as quebras desses três rearranjos terem gerado inúmeros fragmentos, a maioria deles foi reinserida nos cromossomos derivativos, apoiando a hipótese de que o mecanismo de *chromothripsis* ocorra em compartimento celular fechado de uma única célula (por exemplo, um micronúcleo).

Sequenciamos os fragmentos de junção das quebras de dois dos três rearranjos que provavelmente foram formados por *chromothripsis*, para compreender o mecanismo de reparo. Da $t(7;10)ins(7;11)$, sequenciamos 10 dos 14 fragmentos de junção (Tabela IX.1). Dois segmentos de junção foram identificados como resultantes de *blunt fusion*; os oito remanescentes continham deleções, inserções e duplicações. A maioria dessas alterações incluía menos de 10 pb, mas uma deleção de 137 pb no cromossomo 7 também foi identificada. Em outra junção complexa de segmentos dos cromossomos 7 e 10, foi observada uma inserção de 180 pb. Essa inserção correspondia a dois segmentos do cromossomo 11, que também participava do rearranjo (Figuras IX.7 e IX.8). Nas junções dessa inserção foi detectada micro homologia de três, seis e sete pares de bases. Apesar de em quatro junções não ter sido observada micro homologia, favorecendo o mecanismo de NHEJ, a complexidade de outras três junções associadas a micro homologia é indicativa de que MMEJ possa ter atuado na formação desse rearranjo complexo.

Sequenciamos cinco dos 14 segmentos de junção da $t(1;17;3;1;12;16)$ e apenas uma das junções foi identificada como *blunt fusion* (Tabela IX.1). Embora houvesse deleções e duplicações de segmentos <10pb, a maioria das deleções e inserções abrangia de 20 pb a 76 pb. No segmento de junção mais complexo, que incluía uma inversão do cromossomo 12, foi detectada uma inserção de 76 pb; a maior parte do segmento inserido (66 pb) correspondia a um segmento do cromossomo 1, também participante do rearranjo; no cromossomo 1, o sequenciamento de um dos segmentos de junção revelou a deleção dessa sequência (Figura IX.9). Em uma das junções da inserção, foi detectada micro homologia de 5 bp entre sequências dos cromossomo 1 e 12, o que pode ter favorecido MMEJ. Outra junção de segmentos dos cromossomos 1 e 12 também continha um inserção de 35 pb que, em sua maior parte (26pb), correspondia a segmento do braço curto cromossomo 5, que não foi identificado como participante do rearranjo (Tabela IX.1). Inserções longas originadas

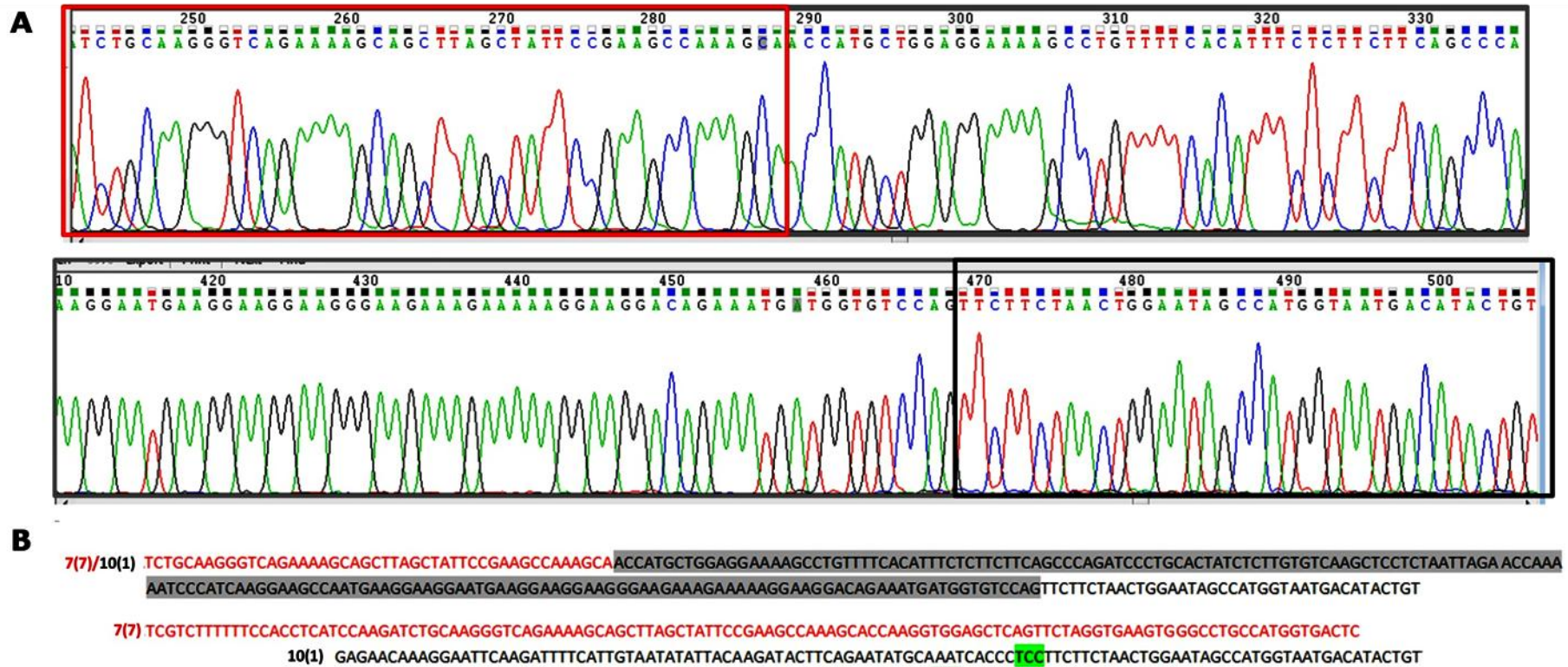


Figura IX.7: Inserção na junção das quebras entre os cromossomos 7 e 10 da $t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)$. A. A análise dos segmentos de junção de 7q33 [7(7)] (em vermelho) e 10p12.1 [10(1)] (em preto) mostra inserção de 180 pb (em cinza). A parte superior e inferior da figura A mostram a junção da inserção com os segmentos dos cromossomos 7 e 10, respectivamente. B. A sequência da junção 7(7)/10(1) foi comparada com as sequências referências dos cromossomos 7 e 10 representadas, respectivamente, em vermelho e preto. O segmento inserido está em cinza. A quebra no cromossomo 10 também gerou deleção de três pares de bases (TCC) (em verde). Quebras designadas de acordo com a Tabela IX.1.

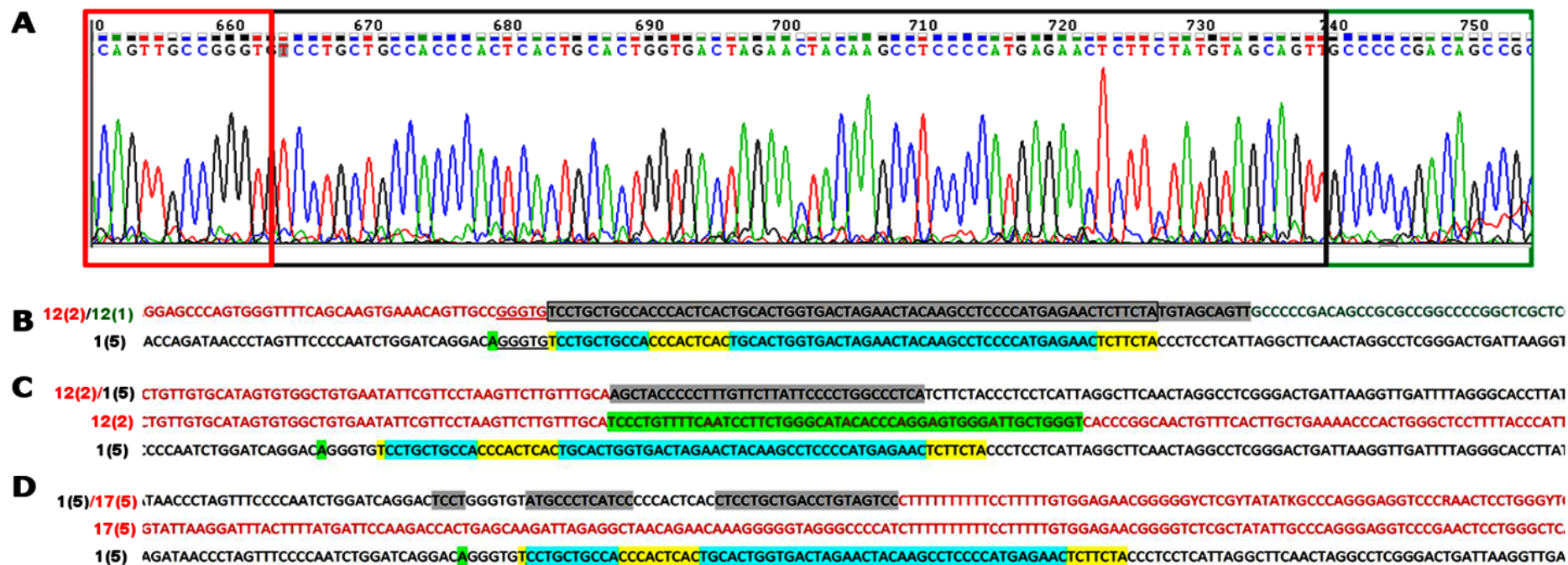


Figura IX.9: A complexidade das junções das quebras da t(1;17;3;1;12;16). **A.** A análise da junção entre segmentos de 12p13.33 [12(1)] (em vermelho) e [12(2)] (em verde) revela inserção de 76 pb (em cinza). **B.** A comparação da junção 12(2)/12(1) com a sequência referência correspondente à da quebra em 1q21.2 [1(5)] (preto) mostra que a maior parte da inserção (60 pb; retângulo) corresponde a sequência de 1q21.2. Observa-se também micro homologia GGGTG entre as sequências de 12p13.33 [12(2)] e 1q21.2[1(5)]. **C.** Essas duas quebras também formam uma junção, 12(2)/1(5), que contém uma inserção de 35 pb (em cinza). A quebra do cromossomo 12 gerou uma deleção de 52 pb (em verde). **D.** A quebra em 1q21.2 [1(5)] também forma junção com segmento de 17p13.3 [17(5)]. Inserções de 4 pb a pb (em cinza) foram detectadas nessa junção. O segmento em azul da sequência da quebra 1(5) corresponde à sequência inserida na junção 12(2)/12(1), mas não detectada nas junções 12(2)/1(5) e 1(5)/7(5). O segmento em amarelo corresponde a sequências duplicadas de 1q21.2, detectadas na inserção da junção 12(2)/1(5) (TCTTCTA) e na junção 1(5)/7(5) (T e CCCACTAC). A deleção de um única base na sequência de 1q21.2 também foi detectada (em verde). Quebras designadas de acordo com a Tabela IX.1.

De outras regiões do genoma sugere a ocorrência de mecanismos baseados em replicação. No entanto, não foi observado micro homologia nesse segmento de junção.

A análise dos rearranjos $t(1;17;3;1;12;16)$ e $t(7;10)ins(7;11)$ evidenciam a complexidade das junções em rearranjos cromossômicos formados a partir de *chromotripsis*. *Blunt fusions* ou junções contendo deleções, duplicações e inserções <10 pb podem ser explicadas por NHEJ; já aquelas junções contendo deleções ou inserções maiores, associadas a micro homologia, podem ter sido reparadas por MMEJ. Entretanto, as deleções e inserções de mais de 20 pb, que observamos nas junções nas quais não foi observada micro homologia, não são características de NHEJ, MMEJ ou de mecanismos de replicação. Essas extensas deleções podem ter-se originado da erosão das extremidades do DNA resultantes da quebra na dupla fita do DNA (Kloosterman et al., 2012) ou refletir a existência de mecanismo ainda não esclarecido, atuando no reparo das quebras.

Embora três dos quatro rearranjos mais complexos possam ter sido formados por *chromotripsis*, na inserção $ins(16)$, que incluiu 24 quebras, observamos características peculiares (Tabela IX.S1). Em todos os outros rearranjos, complexos ou simples, houve quebras na dupla fita do DNA; na $ins(16)$, foram observadas quebras de fita única. Outro fator único foi a presença de múltiplas duplicações, quando detectamos apenas deleções naqueles rearranjos que evidenciamos não serem equilibrados. A presença de duplicações e quebras de fita única sugere que a inserção $ins(16)$ tenha sido formada por mecanismo baseado em replicação com trocas de forquilha, por exemplo, MMBIR ou FoSTeS. O sequenciamento dos segmentos de junção dessa inserção é necessário para verificar se existe micro homologia nos pontos de quebras.

Um estudo anterior, que analisou dez rearranjos complexos, utilizando NGS e sequenciamento de Sanger dos segmentos de junção, revelou que oito rearranjos complexos teriam sido formados a partir de quebras múltiplas seguidas de junção das extremidades quebradas típica de *chromotripsis*; outros dois rearranjos teriam sido formados por mecanismos de replicação (Kloosterman et al., 2012). Os autores ressaltaram que outros rearranjos complexos deveriam ser investigados por NGS para avaliar a participação desses mecanismos em sua formação. Nossa análise por MPS revelou, em seis de sete rearranjos complexos, quebras da dupla fita do DNA, alterações equilibradas ou associadas unicamente a microdeleções e também a participação de mais de um cromossomo, indicando a ocorrência de quebras seguidas de junção das extremidades quebradas na formação de rearranjos complexos citogeneticamente

equilibrados. Detectamos indicações da participação de mecanismo baseado em replicação apenas na formação de inserção complexa.

IX.4 Conclusões

Em uma amostra de 20 rearranjos citogeneticamente equilibrados, aplicamos o sequenciamento de nova geração *mate-pair*. Três dos quatro rearranjos mais complexos (17 - 20 quebras) apresentaram características do mecanismo de *chromothripsis*. No rearranjo mais complexo, uma inserção do cromossomo 16, foram identificadas quebras de fita única no DNA e várias duplicações, evidenciando mecanismos de replicação com trocas de forquilha, como provável mecanismo de formação.

O sequenciamento de Sanger de 51 junções de 17 rearranjos permitiu analisar os segmentos de junção das quebras no nível de pares de bases. Nossos dados e o de trabalhos anteriores indicam que alterações estruturais citogeneticamente equilibradas são formadas predominantemente por NHEJ. Cicatrizes desse mecanismo foram observadas na maioria dos 51 segmentos de junções investigados - *blunt fusions* ou junções contendo inserções e deleções <10 pb, e ausência de homologia ou presença de micro homologia de 2 pb a 4 pb de extensão.

Em sete translocações e em uma inversão, as junções apresentaram características de NHEJ. Sinais de junção mediada por micro-homologia (*microhomology-mediated end joining*; MMEJ) foram detectados em duas translocações associadas a extensas deleções nos segmentos de junção das quebras (21 a 2649 pb). Em duas inversões, a presença de inserções de 20-23 pb nas junções afasta a possibilidade da atuação de mecanismos *end joining*. Apesar de essas inserções serem encontradas em rearranjos resultantes de mecanismos de replicação de DNA baseados em micro homologia, não havia similaridade entre as sequências participantes das inversões.

Os cinco rearranjos complexos, investigados no nível de pares de bases, apresentaram junções típicas de NHEJ e de MMEJ, mostrando que as várias quebras de um mesmo rearranjo complexo podem ser reparadas por mecanismos diferentes. No entanto, algumas junções desses rearranjos complexos continham deleções/inserções de mais de 30 pb, que não podem ter resultado de reparo por NHEJ, mas nas quais também não se observou micro homologia, tornando improvável o MMEJ ou mecanismos baseados em replicação. Outros mecanismos, ainda não esclarecidos podem contribuir para a formação desses rearranjos complexos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela IX.S1: Segmentos dos pontos de quebra da t(10;21) e ins(16) delimitados por MPS.

Chr (Quebra)	Banda	Ponto de quebra	Gene
t(10;21)(p13;q22)			
10(1)	10p14	chr10:9913030-9913628	
10(2)	10p14	chr10:10075816-10084697	
10(3)	10p14	chr10:10154098-10154543	
10(4)	10p14	chr10:10188630-10190896	
10(5)	10p14	chr10:1268115-11280995	<i>CELF2</i>
10(6)	10p13	chr10:12966412-12979292	<i>CCDC3</i>
10(7)	10p13	chr10:14262181-14268620	<i>FRMD4A</i>
10(8)	10p13	chr10:14442452-14442555	<i>FRMD4A</i>
10(9)	10q25.2	chr10:112226989-112227402	
10(10)	10q25.2	chr10:115215579-115215746	
10(11)	10q26.13	chr10:125040148-125043367	
10(12)	10q26.13	chr10:125787191-125790410	<i>CHST15</i>
10(13)	10q26.13	chr10:126375360-126375571	<i>FAM53B</i>
10(14)	10q26.2	chr10:129730774-129737213	<i>PTPRE</i>
10(15)	10q26.3	chr10:131406114-131407264	<i>MGMT</i>
21(1)	21q22.12	chr21:36863869-36864832	<i>RUNX1</i>
21(2)	21q22.12	chr21:36945695-36945975	<i>RUNX1</i>
21(3)	21q22.3	chr21:45914485-45914684	
ins(16)(p13.1q23q12.1)*			
16(1)	16p13.3	chr16:1143837-1145552	<i>CIQTNF8</i>
16(2)	16p13.3	chr16:1326655-1328496	
16(3)	16p13.3	chr16:4724271-4724544	<i>MGRN1</i>
16(4)	16p13.3	chr16:4934216-4935436	<i>PPL</i>
16(5)	16p13.11	chr16:15598918-15607504	<i>C16orf45</i>
16(6)	16p12.3	chr16:17328199-17330226	<i>XYLT1</i>
16(7)	16p12.3	chr16:17566154-17570446	
16(8)	16p12.2	chr16:21589189-21589420	<i>LOC23117</i>
16(9)	16p12.2	chr16:22710417-22713130	
16(10)	16p12.1	chr16:27988190-27990812	<i>GSG1-like</i>
16(11)	16p11.2	chr16:34195979-34199637	
16(12)	16p11.1	chr16:34391787-34392957	
16(13)	16p11.1	chr16:34757409-34757596	
16(14)	16q11.2	chr16:46499366-46503031	
16(15)	16q12.1	chr16:51374515-51376526	
16(16)	16q22.1	chr16:70307586-70311018	<i>AARS</i>
16(17)	16q23.1	chr16:77910155-77917094	<i>VATIL</i>
16(18)	16q24.1	chr16:85232808-85234679	
16(19)	16q24.1	chr16:85322854-85325763	
16(20)	16q24.1	chr16:86020876-86023301	

A inserção foi formada por 24 quebras, quatro delas foram identificadas por aCGH, mas não por MPS.

Tabela IX.S2: Primers desenhados para amplificar os segmentos de junção das quebras dos rearranjos cromossômicos

Rearranjo	Junção	Primer	Sequência 5' - 3'	Primer	Sequência 5' - 3'
t(2;18)(q33;q21.3)	der(2)	Chr2_F	CCACAATCATAAATCCCCAAAG	Chr18_R	GCAAGAAGAGTGCATTGCTG
	der(18)	Chr18_F	TGGGGGTTAAGGAGAAGTGTT	Chr2_R	TGTGCTTCAGTCTGGATTGG
t(2;16)(q36.1;q24.1)	der(2)	Chr2_F	GCAGCTACAGA ACTCCCTTCA	Chr16_R	CACCAGTCTCCATGTTCTGTGT
	der(16)	Chr16_F	ACCTACGTGATGCACCAACA	Chr2_R	TCCTAAGGATAGGCCAGTTT
t(14;15)(q13;q22.1)	der(14)	Chr14_F	GAGGAGTTCAGGTGGGACAG	Chr15_R	TCTGTTACACGCTCTCCAT
	der(15)	Chr15_F	GATTGGGGAGCACAGAGAAG	Chr14_R	TGTGAGCGCTCCAGTACAGC
t(11;18)(q13.1;q21.31)	der(11)	Chr11_F	ACAGTGGTCAGCAGGCTCTC	Chr18_R	CACGAAACACAGGATTTTCA
	der(18)	Chr18_F	GTGGGATTCTGTTGGACAGG	Chr11_R	CAGCACCAGAAATGCTGAGG
t(1;7)(q23.1;p13)	der(1)	Chr1_F	GGGCCAAAATCACCTTTA	Chr7_F	TCATGGGATGGAGATTGTTG
	der(7)	Chr7_R	TTGGGAAGTTGGGAAGACAC	Chr1_R	CTTTGTGAATGCGAACCTCA
t(6;7)(q12;q31)	der(6)	Chr6_F	TGGCTTTCTAATTTCCACA	Chr7_R	CCAGATCTGTCAGCAGCAAT
	der(7)	Chr6_R	TCATTCTTCTGTGACTGGCTTA	Chr7_F	TCTTTATTGGTCATCTTCACCAG
t(2;9)(q14.2;p22)pat	der(2)	chr2F	AGAATATAGAGGTTGGGTGTGGT	chr9F	CACATGGGGCACTTACATGA
	der(9)	chr9R	CCATACCATTGCCAGAGTGA	chr2R	TGCTGTATTACCATCCAACA
t(4;18)(p15.2;q11.2)	der(4)	Chr4_F	GTGACATTTTGAGCTTTCCTTC	Chr18_F	CCTCTCCAACGATGCCATAA
	der(18)	Chr18_R	TGGCAAGTAGTTAAGCGAAGC	Chr4_R	TGTGGGGCTCTGTAGAAGGT
t(4;14)(q27;q13)	der(4)	ch4_F	AAAACACCATGGCATAAA	ch14_R	TCATGTCTTTTTGGCACCAC
	der(14)	ch14_F	TGTGGAGAGCCTATCTCTTTCA	ch4_R	TCCTTTCAGACAGTCCCACA
inv(2)(q14.3q31.1)	der(2q14.3)	2q14_F	ATGGCCTTTGGCAACTTAGA	2q24.3_F	GGGACCAGGTGCCTTCTTAT
	der(2q31.1)	2q_24.3R	AAAGAGGGAAATGTGGCAAT	2q14_R	AAACGAAGCTGAATGGAAGA

(Continua)

Tabela IX.S2: Primers desenhados para amplificar os segmentos de junção das quebra dos rearranjos cromossômicos. (continuação)

Rearranjo	Junção	Primer	Sequência 5'-3'	Primer	Sequência 5'-3'
inv(12)(p11.2q24.1)m	der(12p11.2)	chr12p_R	TTGCTCCCAGATTCAAATTC	chr12q_R	TCCATGTGGGAAGGGAAGT
	der(12q24.1)	chr12q_F	AACACAAAGCCAACACTCTTTC	chr12p_F	TCTTGTGGAAATGGCTTGAA
inv(12)(q15q24.2)mat	der(12q15)	Chr12q15_F	CTAACCCAGTGGTGGCTGTT	Chr12q24.2_F	GCCCAGCTTATGCAAAAATC
	der(12q24.2)	Chr12q24.2_R	CTTCACCACTCCCTTCCTGC	Chr12q15_R	TATGAGTGCCTGCATTGCTC
ins(2)(p13;q11.2q21)ins(12;18)(p11;q21.3q11.2)					
	12/18(2)	Chr12_F1	GAAATTAGCAATCCCCCATT	Chr18(2)_F	CCCGGATACTCAAACCAAAG
	12/18(2)	Chr12_F2	GCAGGAAATAAGATGAAAGCTG	Chr18(2)_F	CCCGGATACTCAAACCAAAG
	12/18(2)	Chr12_F3	CTGGTGAAAACCTTCGGTTCA	Chr18(2)_F	CCCGGATACTCAAACCAAAG
	12/18(1)	Chr12_R3	GTGGTTGAGAACAAAATGCTGA	Chr18(1)_R	TCCCCAACCTATTCAGATGG
	12/18(1)	Chr12_R4	CCTATGAAGTGTGACATGATGCT	Chr18(1)_R	TCCCCAACCTATTCAGATGG
	18(2)/18(3)	Chr18_(2)R	TGACTTGTCCACAGATTCAAGG	Chr2_(3)R	GCTCCCTCATTTGCTCAATC
	18(1)/18(3)	Chr18_(1)F	TCCCACCTCCTGTACAGTT	Chr18_(3)F	CACACCCAAGCATCTCTCT
	2(1)/2(5)	Chr2(1)_F	GCTTCACAAAGTTCTCGTGCT	Chr2(5)_R1	GGCTTTCTCACCTTGCACAT
	2(1)/2(5)	Chr2(1)_F	GCTTCACAAAGTTCTCGTGCT	Chr2(5)_R2	CCTGTGATCTAGCAATGCATCTT
	2(3)/2(6)	Chr2_(3)F	TGTATGGGGAAATGACAACA	Chr2_(6)R	GCAGTGGTCAGGGTTTGATT
	2(3)/2(6)	Chr2_(3)R	GCTCCCTCATTTGCTCAATC	Chr2_(6)F	CTGCCAATCCTCCTAGTCCA
	2(2)/2(4)	Chr2_(2)F	GGAAGGCACCCATTACTTAGC	Chr2_(4)F	ACCACTTGTACCCCAAAAAGC
	2(1)/2(2)	Chr2_(1)R	AGCAGCCTCAAAGATCGAAA	Chr2_(2)R	AGGCAGCATACTCAGCATT
t(5;18)(q33.3;q21.1)	18(5)/18(3)	Chr18(5V)_F	GGCCAATGTTCTCACATCT	Chr18(3S)_R1	CATACCTTTCCAGGTCTTTTCC
	18(5)/18(3)	Chr18(5V)_F	GGCCAATGTTCTCACATCT	Chr18(3S)_R2	TTTTACCCTCCTCCCTTTGG

Tabela IX.S2: Primers desenhados para amplificar os segmentos de junção das quebra dos rearranjos cromossômicos. (continuação)

	Junção	Primer	Sequência 5´- 3´	Primer	Sequência 5´- 3´
t(7;10)(q35;p12.1)ins(7;11)(q35; p14p13)					
	11(3)/11(2)	Chr11(2)_F	GGCAAGGCATCTGTTCAAA	Chr11(3)_F	GCAAACCATTATGGCACACA
	7(11)/7(12)	Chr7(11)_R	AAACCCACTGAAGCAACAGAA	Chr7(12)_R	CAGAGTTTCCTTACAGGGACAGA
	7(13)/11(5)	Chr7(13)F	AAGGAAGGTACGTGGGAAAAA	Chr11(5)_F	TGCTGTCCGATTTATCAGAGTT
	7(14)/7(8)	Chr7(14)F	TTTCCTGCTAGCATAGCCTCA	Chr7(8)_R1	CATTGAGCCTAATTGGGAAAG
	7(9)/7(10)	Chr7(9)_F1	CCCCTCGTAACTGTGCAGAA	Chr7(10)_R1	GCTGCCAGCTATATCTCTGTGG
	7(9)/7(10)	Chr7(9)_F1	CCCCTCGTAACTGTGCAGAA	Chr7(10)_R2	TGCTCCTCAAAGACTGAACTC
	7(11)/10	Chr7(11)_F	GGAAGTTCATCATGCAGAA	Chr10_F	CGCCCAGAAATTGGTAACTC
	7(2)/7(6)	Chr7(2)_R1	TGGCCTCCGTTGTTTATTTG	Chr7(6)_R1	CAGCCCAACACAAATTTTCA
	7(2)/7(6)	Chr7(2)_R1	TGGCCTCCGTTGTTTATTTG	Chr7(6)_R2	AAATGCCATACCAATCAGCA
	7(7)/10	Chr7(7)_F	ACACCAAGGAATTGGACTGC	Chr10_R	TGAGGCAGGCCTGAATAAAA
	11(1)/11(5)	Chr11(1)_F	CCAAGCTGTGCAAATAGCTG	Chr11(5)_R	GCATTGACAAAGAATGCACA
t(1;17;3;1;12;16)(p36.2;p13.1;q21;q21;p13.3;p13.1)					
	1(5)/17(5)	Chr1(5)_F	CCCTTTCAGCTATGCCCTAA	Chr17(5)_F	GATTTGTTGCTCTCAGACTGTGT
	17(2)/3(1)	Chr17(2)_R	CCGAGGGAAGTGAAGAGAAGA	Chr3(1)_R	CACCTCCCCAACACAGACTC
	12(1)/12(2)	Ch12(1)_F	GGTCGAGTTCAGGAGAAGG	Ch12(2)_F	TCTCGGTTGGTCCCTGTTAC
	12(1)/17(2)	Ch12(1)_R	GGAAGTTTCGGCCCAAGT	Chr17(2)_F	GGAAGGCAAATCCCGATCTA
	1(5)/12(2)	Chr1(5)_R	GGGTGTCCCTAGGAAGACAGA	Ch12(1)_R	CAACCACTGGCAACCACTTA
t(X;17)(q21~22;p11.1	Der(X)	ChrX_F	GCTGAGTTCTGCCAGTGTT	ChrX_R1	GTCACCTCAGGCTGGTGCAAT
	Der(X)	ChrX_F	GCTGAGTTCTGCCAGTGTT	ChrX_R2	GGGTGCAAACATCTTCATGG

Tabela IX.S3: Segmento de junção da deleção em Xq25 associada à translocação t(X;17)(q21~22;p11.1) delimitada por MPS e sequenciada pelo método de Sanger; não há genes mapeados no intervalo

Banda	Localização da deleção por MPS (hg 19)	Tam. (pb)	Localização da deleção por Sanger	Tam. (pb)	Modificação na junção
Xq25	chrX:12178004-121871066	90062	chrX:121772607-121875774	103167	Ins (36pb) * TGCCAGCAATATGCCAGCAATATGCCAGCAATATGC

*24 pb dessa inserção correspondem a sequência de 2p13.3 (chr2:69,649,206-69,649,229)

X. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

X. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivos (a) identificar mecanismos pelos quais rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados possam estar associados de maneira causal a determinados quadros clínicos e (b) contribuir para a compreensão dos mecanismos de formação desses rearranjos. Para isso, foram estudados 45 rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados (29 translocações, 10 inversões e seis rearranjos complexos), detectados em pacientes que apresentavam malformações congênitas, comprometimento do desenvolvimento neuropsicomotor ou déficit intelectual. Foram 31 rearranjos cromossômicos esporádicos, três familiares que segregavam com o quadro clínico e mais 11 rearranjos cromossômicos herdados de genitores fenotipicamente normais. Inicialmente os pontos de quebra desses rearranjos foram mapeados por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). A busca por microdeleções e duplicações genômicas foi realizada por a-CGH. A investigação dos pontos de quebra prosseguiu com a aplicação da técnica de *Mate-Pair Sequencing* (MPS), que permite localizar as quebras em segmentos de 100 pb – 1 kb, na maioria dos casos. Para obter os segmentos de junção das quebras no nível de pares de bases, os segmentos delimitados por MPS foram sequenciados pelo método de Sanger

A análise por aCGH revelou microdeleções ou microduplicações localizadas nos cromossomos rearranjados, em 12 dos 45 pacientes investigados (27%). O número de desequilíbrios por rearranjo variou entre um e oito. Com exceção de dois rearranjos, nos quais foram detectados ganhos e perdas, os outros continham apenas deleções. Os rearranjos complexos estavam mais frequentemente associados a desequilíbrios (83%) do que as translocações (25%). Não foram identificados ganhos ou perdas de segmentos nas inversões.

Trinta e cinco dos rearranjos citogeneticamente equilibrados foram submetidos a sequenciamento por MPS. A análise de 27 rearranjos permitiu a caracterização dos pontos de junção das quebras. Em oito, não foi possível mapear os pontos de quebra, provavelmente devido à presença de sequências altamente repetitivas ou de elementos repetidos no genoma. Considerando os 27 rearranjos que tiveram a análise concluída, MPS expandiu o número de pontos de quebra, detectados por análise do cariótipo ou aCGH, de 114 para 156 (em resolução < 2kb, na maioria dos casos). Os 42 pontos de quebra adicionais foram detectados em oito rearranjos. O número de pontos de quebra/rearranjo variou de 2 a 20. Os 156 pontos de quebra resultaram em 86 variantes estruturais equilibradas e outras 32 variantes não equilibradas. Entre as 118 variantes

estruturais identificadas por MPS, 28 não equilibradas e 33 equilibradas haviam sido detectadas, respectivamente, por aCGH e análise após bandamento G. As variantes estruturais identificadas exclusivamente por MPS (49/57) foram, em sua maioria, inserções inter e intracromossômicas.

Esses resultados ilustram a importância de aliar-se a análise de variações de número de cópias por *microarray* ao mapeamento dos pontos de quebra por MPS, na investigação de rearranjos equilibrados citogeneticamente. Enquanto a análise por *microarray* consegue, de forma eficiente e rápida, identificar desequilíbrios submicroscópicos associados aos rearranjos, MPS permite determinar a estrutura dos cromossomos derivativos, ao identificar variantes estruturais equilibradas e não equilibradas, incluindo aquelas que não são detectadas pelas técnicas de citogenética clássica (cariótipo) e molecular (FISH). Os dados de MPS revelaram que os rearranjos complexos aparentemente equilibrados tendem a ter maior número de pontos de quebras do que aqueles previstos na análise cromossômica. A análise revelou também que rearranjos aparentemente simples podem ser mais complexos, principalmente aqueles cuja análise por aCGH revelou a presença de microdeleções ou microduplicações. Esses resultados mostram que a interpretação de rearranjos citogeneticamente equilibrados, simples e complexos, exige a aplicação de MPS ou de outras técnicas baseadas em *next generation sequencing*.

Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos nos cromossomos rearranjados constituíram a principal causa ou contribuíram, provavelmente, para o quadro clínico de 12 dos 45 pacientes investigados por aCGH (27%). O número de genes deletados ou duplicados por rearranjo variou entre um e 72. Em um rearranjo complexo, a perda do gene sensível a dosagem *PAX6* explica a aniridia apresentada pelo portador. Nos segmentos deletados de duas translocações foram identificados dois genes (*SYNCRIP* e *GRIK3*) cujas deleções foram anteriormente consideradas como candidatas a causar comprometimento intelectual, fornecendo assim evidência adicional de que essas deleções estejam relacionados a deficiência intelectual. Nos outros nove rearranjos, desconhece-se o efeito clínico da perda ou do ganho em heterozigose dos genes mapeados nas regiões das deleções. Apesar da ausência de genes candidatos, a complexidade desses rearranjos sugere relação causal dos desequilíbrios com o quadro clínico dos portadores.

As análises por MPS revelaram a interrupção de genes em 23 dos 27 rearranjos estudados. O número de genes truncados por rearranjo variou entre um e nove,

totalizando 71 genes. Em oito rearranjos (quatro translocações e quatro rearranjos complexos), os genes alterados já foram anteriormente relacionados a doenças, explicando-se, assim, características clínicas dos portadores (*DYRKYA*, *TCF4*, *NKX2-1*, *SOX5*, *CNTNAP2*, *SETBP1*, *PAFAH1B1*). Entretanto, em quatro desses rearranjos foram detectadas microdeleções que provavelmente contribuíram para o quadro clínico. Duas translocações interromperam os genes *ESCO1* e *ANKRD19P* que podem ser, respectivamente, novos genes candidatos para deficiência auditiva e deficiência intelectual.

Os rearranjos citogeneticamente equilibrados podem também afetar elementos reguladores, levando à alteração na expressão gênica. Uma das translocações estudadas, t(4;14), pode ter afetado a expressão do gene *FOXG1*, localizado a 391 kb 3' da quebra no cromossomo 4. O portador da translocação apresenta quadro clínico compatível com a variante congênita da síndrome de Rett (MIM 613454), que é causada por mutações de perda de função do gene *FOXG1*. Elemento regulador teria sido truncado ou afastado do gene, em decorrência dessa translocação, levando à alteração da expressão gênica e ao quadro clínico. A separação ou a interrupção de elementos reguladores do gene *SALL1*, cuja haploinsuficiência é a causa da síndrome de Townes-Brocks (MIM 107480), aparece como o possível mecanismo para explicar o quadro clínico de portadora de inserção intracromossômica no cromossomo 16. O gene está mapeado a 180 kb 5' de um dos pontos de quebra. Na portadora de translocação t(X;17), uma deleção de 100 kb em Xq25, distante do ponto de quebra da translocação, pode ter removido elemento regulador do gene *GRIA3*, localizado a aproximadamente 500 kb da deleção. A perda de função do gene *GRIA3* causa deficiência intelectual síndrômica e a alteração de sua expressão explicaria o quadro clínico da portadora da t(X;17). Em uma translocação t(2;16), associada a malformações de membros, os genes *IHH*, *PAX3* e *WTN6* são candidatos, pela alteração da regulação.

Um rearranjo cromossômico familiar identificado na análise após bandamento G como translocação equilibrada, t(2;22)(p14;q12), segregava com quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizado associados a dismorfismos. A combinação das análises por FISH, aCGH e MPS revelou que se tratava, na verdade, de rearranjo complexo entre os cromossomos 2, 5 e 22, incluindo 10 quebras: um segmento de 1,42 Mb de 2p14 inseriu-se no braço curto do cromossomo 5; no cromossomo derivativo der(22) um segmento adicional de 6,64 Mb de 5q23.2-23.3 inseriu-se no ponto de quebra; além da inserção do segmento 2p14, no der(5),

também foi detectada uma deleção de 1,47 Mb em 5p15.1; o cromossomo der(5) continha ainda mais três segmentos rearranjados em seu braço curto. A segregação de diferentes desequilíbrios submicroscópicos em indivíduos afetados e clinicamente normais permitiu a compreensão da variabilidade clínica observada na família. A microdeleção de 1,42 Mb em 2p14, presente nos dois afetados com maior comprometimento intelectual, sugere que os genes *CEP68*, *RAB1A* e *ACTR2*, mapeados nessa região, sejam candidatos a causarem a deficiência intelectual na síndrome de microdeleção 2p14p15, anteriormente descrita. Dentre os genes mapeados em 5q23.2-q23.3, conhecem-se apenas duplicações patogênicas do gene *LMNB1*, na leucodistrofia autossômica dominante do adulto (ADLD; MIM 169500); a ausência de sinais da doença em adultos da família foi explicada, quando a análise da expressão do gene *LMNB1*, em dois membros da família, não mostrou expressão exacerbada, indicando o silenciamento da cópia ectópica do gene *LMNB1* no cromossomo der(22).

Foram também estudados por aCGH outros dois rearranjos herdados de genitores afetados, não tendo sido detectados desequilíbrios submicroscópicos.

Rearranjos equilibrados detectados em indivíduos afetados, mas herdados de genitores clinicamente normais, são, em geral, considerados como não tendo relação com o quadro clínico, apesar da possibilidade de desequilíbrios cromossômicos gerados por permuta desigual na meiose do genitor portador do rearranjo. Neste trabalho, a investigação de 11 desses rearranjos por aCGH não revelou perdas ou ganhos de segmentos nos cromossomos rearranjados. A investigação por MPS das junções das quebras de cinco rearranjos também não identificou alterações em genes, que possam ter contribuído para o fenótipo. A análise por aCGH da portadora de um desses rearranjos - inv(12)mat - revelou deleção de 8,7 Mb no cromossomo 8, como provável causa de seu fenótipo clínico. Além da inv(12), sua genitora era portadora de translocação citogeneticamente equilibrada t(X;19), cuja análise por FISH e MPS revelou tratar-se de rearranjo complexo t(X;8;19), independente da inv(12); o segmento do cromossomo 8 deletado em sua filha correspondia ao segmento inserido no cromossomo der(19), que ela não herdou. Esses resultados mostram a importância da caracterização de rearranjos citogeneticamente equilibrados presentes em pessoas clinicamente normais.

Para compreender os mecanismos de formação de rearranjos citogeneticamente equilibrados, investigamos os segmentos de junção no nível de pares de base. A análise por MPS que levou, na maioria dos casos, ao mapeamento dos pontos de quebras em

segmentos <1kb na maioria dos casos, permitiu o sequenciamento pelo método de Sanger de 51 segmentos de junções de 17 rearranjos. A ocorrência de *blunt fusions* ou inserções e deleções <10 pb, e ausência de homologia ou presença de micro homologia de 2 pb a 4 pb de extensão indicaram o mecanismo de junção de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining*; NHEJ), na maioria das 51 junções caracterizadas.

Em sete translocações e em uma inversão, as junções apresentaram características de NHEJ. Sinais de junção mediada por micro-homologia (*microhomology-mediated end joining*; MMEJ) foram detectados em duas translocações associadas a extensas deleções nos segmentos de junção das quebras (21 a 2649 pb). Em duas inversões, a presença de inserções de 20-23 pb nas junções afasta a possibilidade da atuação de mecanismos *end joining*. Apesar de essas inserções serem encontradas em rearranjos resultantes de mecanismos de replicação de DNA baseados em micro homologia, não havia similaridade entre as sequências participantes das inversões. Os cinco rearranjos complexos, investigados no nível de pares de bases, apresentaram junções típicas de NHEJ e de MMEJ, mostrando que as várias quebras de um mesmo rearranjo complexo podem ser reparadas por mecanismos diferentes. No entanto, algumas junções desses rearranjos complexos continham deleções/inserções de mais de 30 pb, que não podem ter resultado de reparo por NHEJ, mas nas quais também não se observou micro homologia, tornando improvável o MMEJ ou mecanismos baseados em replicação. O mecanismo de reparo nesses casos ficou interrogado.

As características de três dos quatro rearranjos mais complexos, com 17-20 quebras, indicaram sua formação pelo mecanismo de *chromothripsis*. Foram evidenciados *clustering* de quebras e extensa reorganização dos cromossomos derivativos, resultante de reparo por NHEJ. Outro rearranjo complexo com 24 quebras – inserção intracromossômica no cromossomo 16, apresentou sinais de formação a partir de mecanismo baseado em erros de replicação de DNA.

Este estudo mostra a importância da análise genômica de variações de número de cópias por *microarray*, juntamente com o mapeamento dos pontos de quebra por MPS, para determinar a estrutura de rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados e seu impacto clínico. O mapeamento dos segmentos de junção por MPS, permitindo o sequenciamento pelo método de Sanger, foi essencial para a compreensão de mecanismos de formação desses rearranjos.

XI. ABSTRACT

XI. ABSTRACT

This study aimed at (a) identifying causative mechanisms of clinical features in carriers of karyotypically balanced chromosomal rearrangements (BCRs), and (b) disclosing the mechanisms of formation of these chromosomal rearrangements. Forty-five BCRs - 29 translocations, 10 inversions and six complex rearrangements, detected in patients with intellectual disability, developmental delay and/or congenital malformations were investigated. Thirty-one rearrangements were *de novo*, three were familial and segregated with the clinical phenotype, and 11 BCRs were inherited from phenotypically normal parents. Initially, the breakpoints of the rearrangements were mapped by using fluorescence in situ hybridization (FISH), and the presence of cryptic genomic imbalances was investigated by array comparative genomic hybridization (aCGH). Breakpoint-containing segments were narrowed down to approximately 100 pb – 1 kb, by using NGS-based mate-pair-sequencing (MPS). In order to investigate breakpoint junctions at the nucleotide level, breakpoint segments delimited by MPS were Sanger sequenced.

De novo microimbalances on the rearranged chromosomes were detected by aCGH in 12 out of the 45 patients investigated (27%). The number of imbalances per rearrangement ranged from 1 to 8. The BCRs were associated with microdeletions, except for two rearrangements showing both microdeletions and microduplications. Complex rearrangements were more likely to carry a cryptic imbalance (83%) than translocations (25%). Imbalances were not found in the ten inversions analyzed.

Thirty-five BCRs were submitted to MPS, and data obtained for 27 of them could be successfully analyzed. Presumptively, the presence of highly repetitive sequences or segmental duplications at one of the breakpoints precluded their identification by MPS in eight BCRs. MPS of the 27 BCRs expanded the number of breakpoints, previously detected by karyotyping and aCGH, from 114 to 156 (breakpoint resolution < 2 kb, in most cases). The 42 additional breakpoints were found in 8 BCRs. The number of breakpoints/BCR ranged from 2 to 20. The 156 breakpoints resulted in 86 balanced and 32 unbalanced sample-specific structural variations (SVs). Among these 118 SVs identified by MPS, 28 unbalanced and 33 balanced SVs had been detected, respectively, by aCGH or karyotyping. Most of the SVs identified exclusively by MPS were inter/intra chromosomal insertions and inverted insertions (49/57).

These results illustrate the power of combining copy number variation analysis by microarray with breakpoint mapping by MPS in the study of karyotypically balanced

chromosomal rearrangements. While microarray analysis can rapidly detect cryptic imbalances on the rearranged chromosomes, MPS unravel the precise structure of these chromosomes, by identifying balanced and unbalanced structural variations, including those that remain cryptic to classic (karyotyping) and molecular (FISH) cytogenetic techniques. In this study, MPS analysis revealed that complex BCRs tend to have more breakpoints than anticipated by karyotyping. In addition, apparently simple BCRs can have a higher degree of complexity, in particular those for which aCGH analysis revealed the presence of cryptic microimbalances. These findings demonstrate that the interpretation of BCRs, both simple and complex at the karyotyping resolution, requires the analysis through MPS or other next-generation-based techniques.

In 12 out of the 45 patients (27%) investigated by aCGH, microimbalances on the rearranged chromosomes were responsible or likely contributed to the clinical features of carriers. The number of deleted or duplicated genes on the rearranged chromosomes ranged from one to 72. In a complex rearrangement, the loss of the dosage sensitive gene *PAX6* explained the presence of aniridia in the carrier. Two genes, previously suggested to be associated with intellectual disability (*SYNCRIP* e *GRIK3*), were mapped within the deleted intervals of two translocations, further supporting their deletions as causative of intellectual disability. On the remaining nine BCRs, the clinical impact of the deleted or duplicated genes remained unknown. Despite the absence of candidate genes, the complexity of these rearrangements suggested the imbalances were likely pathogenic.

Gene disruption was observed in 23/27 BCRs analyzed by MPS. The 23 BCRs truncated 71 genes; the number of truncated genes ranged from one to nine per case. Eight BCRs (four translocations and four complex rearrangements) truncated known disease genes (*DYRK1A*, *TCF4*, *NKX2-1*, *SOX5*, *CNTNAP2*, *SETBP1*, *PAFAH1B1*), thus explaining clinical features observed in the carriers. However, in four of these rearrangements, microdeletions likely contributed to the clinical phenotype. *ESCO1* and *ANKRD19P* genes were disrupted by two translocations, and might be novel candidate genes for hearing impairment and intellectual disability, respectively.

By disrupting gene regulatory regions, karyotypically BCRs can affect gene expression. Presumptive *FOXG1* misregulation was associated to a translocation t(4;14); the carrier presented with features of the congenital variant of Rett Syndrome (MIM 613454), which is caused by *FOXG1* loss of function mutations. The breakpoint on chromosome 14 occurred 391 kb downstream of the gene, and disruption or

separation of a regulatory element might have altered *FOXG1* expression. In an intrachromosomal insertion on chromosome 16, detected in a child presenting features of the Townes-Brocks Syndrome (TBS, MIM 107480), which is caused by *SALL1* haploinsufficiency, one of the breakpoints occurred 180 kb telomeric to the *SALL1* gene. A previously reported translocation also mapping at this site presumptively caused TBS by disturbing its regulation. In a carrier of a t(X;17), a 100 kb deletion mapped approximately 500 kb upstream of the *GRIA3* gene at Xq25. *GRIA3* haploinsufficiency causes a syndromic form of X-linked intellectual disability. The deletion might have included a distant enhancer, thus disturbing of *GRIA3* expression and leading to the clinical features of the translocation carrier. A translocation t(2;16) detected in a patient with hand and feet abnormalities might have impacted the phenotype through misregulation of *IHH*, *PAX3* or *WTN6* genes.

A karyotypically balanced translocation t(2;22)(p13;q12.2) associated with variable learning disabilities and dysmorphisms, was detected in six individuals in a three-generation family. Combined a-CGH, FISH and MPS revealed a ten-break complex rearrangement, also involving chromosome 5. In addition to the translocation of segments between chromosomes 2 and 22, a 1.42 Mb segment from 2p14 was found to be inserted into 5p15.1, where a 1.47 Mb deletion was detected; two other segments at 5p15.1, and one segment at 5p15.1-p14.3 was also rearranged on the der(5), one of them distal and two proximal to the 2p14 insertion; on chromosome 22 a duplicated segment of 6.64 Mb from 5q23.2-q23.3 was inserted into the breakpoint. As the consequence of the segregation of the derivative chromosomes der(2), der(5) and der(22), different microimbalances were present in affected and clinically normal family members, thus contributing to the clinical variability. Two individuals with more severe learning disabilities carried a 1.42 Mb microdeletion at 2p14, which spans three genes (*CEP68*, *RAB1A* and *ACTR2*) mapped to the to the minimal overlapping deleted segment in the previously described 2p14p15 microdeletion syndrome, thus appearing as candidates for the intellectual impairment in this syndrome. Among the 18 genes encompassed by the 5q23.2-23.3 duplication, *LMNB1* is the only gene known to cause disease due to increased expression. *LMNB1* duplications cause adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD; MIM 169500). None of the adult carriers manifested ADLD, and *LMNB1* overexpression was not detected in the two tested individuals, after qRT-PCR. The ectopic location of the extra copy of the *LMNB1* gene on chromosome 22 might have negatively impacted its expression.

Two other BCRs inherited from affected parents were investigated by aCGH, and imbalances on the rearranged chromosomes or elsewhere in the genome were not detected.

Although, historically, BCRs inherited from phenotypically normal parents have not been considered as causally associated with clinical features of carriers, cryptic microimbalances on the rearranged chromosome have been reported that explained the clinical features of the affected carriers. In 11 such inherited BCRs ascertained through affected individuals, which were investigated in this work by using aCGH, no microimbalances were detected on the chromosomes involved, neither did breakpoint mapping of five of these rearrangements by MPS reveal disruption of known disease genes or candidate genes. However, aCGH analysis in an affected girl, who carried an *inv(12)mat*, detected a likely pathogenic 8.7 Mb deletion at 8p22p21.2. In addition to the inversion, her unaffected mother, carried a cytogenetically balanced translocation *t(19;X)* that FISH and MPS revealed to be a complex rearrangement, also involving chromosome 8; the segment of chromosome 8, deleted in her daughter, was inserted into the derivative chromosome 19, not inherited by the girl. The MPS data confirmed that the *inv(12)* and the *t(X;8;19)* were independent events. These results demonstrated the importance of characterizing cytogenetically BCRs present in phenotypically normal individuals.

In order to investigate mechanisms of BCR formation, breakpoint junctions, mapped at intervals of approximately 1 kb by MPS, were narrowed down to the nucleotide level by Sanger sequencing. Fifty-one breakpoint junctions (BPJs) from 17 BCRs (nine translocations, three inversions and five complex rearrangements) were sequenced. The occurrence of blunt fusions or <10 bp deletions, insertions or duplications, and the absence of homology or the presence of just 2 bp to 4 bp microhomology indicated non-homologous end joining (NHEJ) in the majority of the 51 BPJs.

Features of NHEJ were observed in seven translocations, and one inversion. Hallmarks of microhomology-mediated end joining (MMEJ) were detected in two translocations associated with deletions of 21 to 2649 pb at both BPJs, and microhomology of 7 bp and 30 bp. In two inversions, the presence of insertions of 20 bp to 23 pb in the BPJs, and the absence of microhomology, indicated that neither NHEJ nor MMEJ were involved in their formation. These >10 pb insertions are commonly found in rearrangements originated by replication-based mechanisms, which are

dependent on the presence of microhomology at the BPJs. The BPJs of the five Sanger sequenced complex rearrangements implicated both NHEJ and MMEJ in their formation, demonstrating the breaks of the same rearrangement can be repaired by at least two different mechanisms. However, some of the BPJs of these rearrangements contained deletions or insertions >30 pb, not explained by NHEJ, and the absence of microhomology also allowed discarding microhomology-based mechanisms. The mechanism of repair of these complex BPJs remained elusive.

Chromosome shattering with clustered double-strand breaks, and extensive chromosome reorganization observed in three of the four most complex BCRs (17 to 20 breaks) indicated *chromothripsis* as the mechanism underlying their formation. On the other hand, a 24-break chromosome 16 insertion showed a complex reorganization associated with several duplications, a hallmark of rearrangements involving replication mechanisms.

This study illustrates the importance of combining copy number variation analysis by *microarray* and breakpoint mapping by MPS, to determine the structure of karyotypically balanced chromosomal rearrangements, and to unravel their clinical impact. Mapping the breakpoint-junctions by MPS, followed by Sanger sequencing, was fundamental to determine the mechanism of formation of these rearrangements.

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akizu N, Cantagrel V, Zaki MS, Al-Gazali L, Wang X, Rosti RO, Dikoglu E, Gelot AB, Rosti B, Vaux KK, Scott EM, Silhavy JL, Schroth J, Copeland B, Schaffer AE, Gordts PL, Esko JD, Buschman MD, Field SJ, Napolitano G, Abdel-Salam GM, Ozgul RK, Sagiroglu MS, Azam M, Ismail S, Aglan M, Selim L, Mahmoud IG, Abdel-Hadi S, Badawy AE, Sadek AA, Mojahedi F, Kayserili H, Masri A, Bastaki L, Temtamy S, Müller U, Desguerre I, Casanova JL, Dursun A, Gunel M, Gabriel SB, de Lonlay P, Gleeson JG. Biallelic mutations in *SNX14* cause a syndromic form of cerebellar atrophy and lysosome-autophagosome dysfunction. **Nat Genet** **47**:528-34, 2015.
- Allan AM, Liang X, Luo Y, Pak C, Li X, Szulwach KE, Chen D, Jin P, Zhao X. The loss of methyl-CpG binding protein 1 leads to autism-like behavioral deficits. **Hum Mol Genet** **17**:2047-57, 2008.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **Am J Hum Genet** **51**:1229-1239, 1992.
- Amano T, Sagai T, Tanabe H, Mizushina Y, Nakazawa H, Shiroishi T. Chromosomal dynamics at the *Shh* locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. **Dev Cell** **16**:47-57, 2009.
- Antonini, 2005. Mapeamento de ponto de quebra em rearranjos cromossômicos. Pós-doutorado. Processo FAPESP: 01/03964-3.
- Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Stolte M, Entius MM, Loff S, Back W, Kaufmann A, Keller KM, Blaas SH, Siebert R, Vogt S, Spranger S, Holinski-Feder E, Sunde L, Propping P, Friedl W. High proportion of large genomic deletions and a genotype phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome. **J Med Genet** **44**: 702–709, 2007.
- Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchon A, Benito-Sanz S, Rodriguez JI, Argente J, Campos-Barros A, Scambler PJ, Heath KE. **Hum Mol Genet** **20**:1547-59, 2011
- Babbs C, Furniss D, Morriss-Kay GM, Wilkie AO. Polydactyly in the mouse mutant Doublefoot involves altered *Gli3* processing and is caused by a large deletion in cis to Indian hedgehog. **Mech Dev** **125**:517-526, 2008.
- Bache I, Hjorth M, Bugge M, Holstebro S, Hilden J, Schmidt L, Brondum-Nielsen K, Bruun-Petersen G, Jensen PK, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen K, Tommerup N. Systematic re-examination of carriers of balanced reciprocal translocations: a strategy to search for candidate regions for common and complex diseases. **Eur J Hum Genet** **14**:410-7, 2006 .
- Backx L, Seuntjens E, Devriendt K, Vermeesch J, Van Esch H. A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. **Cytogenet Genome Res** **132**:135-43, 2011.
- Baker WK: Position-effect variegation. **Adv Genet** **14**:133-169, 1968.

- Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Tanriover G, Abrahams BS, Duvall JA, Robbins EM, Geschwind DH, Biederer T, Gunel M, Lifton RP, State MW. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. **Am J Hum Genet** **82**:165-73, 2008.
- Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. **Am J Hum Genet** **82**:927-36, 2008.
- Barbero JL. Genetic basis of cohesinopathies. **Appl Clin Genet** **6**:15-23, 2013.
- Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirmbter K, Tejedor FJ, Joost HG. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. **J Biol Chem** **273**: 25893-902, 1998.
- Becker K, Di Donato N, Holder-Espinasse M, Andrieux J, Cuisset JM, Vallée L, Plessis G, Jean N, Delobel B, Thuresson AC, Annerén G, Ravn K, Tümer Z, Tinschert S, Schrock E, Jønch AE, Hackmann K. De novo microdeletions of chromosome 6q14.1-q14.3 and 6q12.1-q14.1 in two patients with intellectual disability - further delineation of the 6q14 microdeletion syndrome and review of the literature. **Eur J Med Genet** **55**:490-7, 2012.
- Belloso JM, Bache I, Guitart M, Caballin MR, Halgren C, Kirchhoff M, Ropers HH, Tommerup N, Tümer Z. Disruption of the CNTNAP2 gene in a t(7;15) translocation family without symptoms of Gilles de la Tourette syndrome. **Eur J Hum Genet** **15**:711-3, 2007.
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, Vazquez MP, Vekemans M, Roest Crollius H, Hastie ND, Munnich A, Etchevers HC, Pelet A, Farlie PG, Fitzpatrick DR, Lyonnet S. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. **Nat Genet** **41**:359-64, 2009.
- Berglund EC, Kiiialainen A, Syvänen AC. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. **Investig Genet** **2**:23, 2011.
- Bernheim A, Toujani S, Guillaud-Bataille M, Richon C, Waxin H, Dessen P, Berger R. Intragenic breakpoints localized by array CGH in a t(2;6) familial translocation. **Cytogenet Genome Res** **119**:185-90, 2007.
- Bhatia S, Kleinjan DA. Disruption of long-range gene regulation in human genetic disease: a kaleidoscope of general principles, diverse mechanisms and unique phenotypic consequences. **Hum Genet** **133**:815-45, 2014.
- Bijlsma EK, Knecht AC, Bilardo CM, Goodman FR. Increased nuchal translucency and split-hand/foot malformation in a fetus with an interstitial deletion of chromosome 2q that removes the SHFM5 locus. **Prenat Diagn** **25**: 39-44, 2005.
- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O. Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. **Am J Hum Genet** **69**:261-8, 2001.

- Bonnet C, Leheup B, Béri M, Philippe C, Grégoire MJ, Jonveaux P. Aberrant GRIA3 transcripts with multi-exon duplications in a family with X-linked mental retardation. **Am J Med Genet A** **149A**:1280-9, 2009.
- Bonnet C, Masurel-Paulet A, Khan AA, Béri-Dexheimer M, Callier P, Mugneret F, Philippe C, Thauvin-Robinet C, Faivre L, Jonveaux P. Exploring the potential role of disease-causing mutation in a gene desert: duplication of noncoding elements 5' of GRIA3 is associated with GRIA3 silencing and X-linked intellectual disability. **Hum Mutat** **33**:355-8, 2012.
- Bonnet C, Ali Khan A, Bresso E, Vigouroux C, Béri M, Lejczak S, Deemer B, Andrieux J, Philippe C, Moncla A, Giurgea I, Devignes MD, Leheup B, Jonveaux P. Extended spectrum of MBD5 mutations in neurodevelopmental disorders. **Eur J Hum Genet** **21**:1457-61, 2013.
- Borg I, Squire M, Menzel C, Stout K, Morgan D, Willatt L, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Ropers HH, Tommerup N, Kalscheuer VM, Sargan DR. A cryptic deletion of 2q35 including part of the PAX3 gene detected by breakpoint mapping in a child with autism and a de novo 2;8 translocation. **J Med Genet** **39**:391-9, 2002.
- Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL. Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. **Nature** **402**:297-301, 1999.
- Boulay JL, Ionescu MC, Sivasankaran B, Labuhn M, Dolder-Schlienger B, Taylor E, Morin P Jr, Hemmings BA, Lino MM, Jones G, Maier D, Merlo A. The 10q25.3-26.1 G protein-coupled receptor gene GPR26 is epigenetically silenced in human gliomas. **Int J Oncol** **35**:1123-1131, 2009.
- Breedveld GJ1, van Dongen JW, Danesino C, Guala A, Percy AK, Dure LS, Harper P, Lazarou LP, van der Linde H, Joosse M, Grüters A, MacDonald ME, de Vries BB, Arts WF, Oostra BA, Krude H, Heutink P. Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea. **Hum Mol Genet** **11**:971-9, 2002.
- Brown KK, Reiss JA, Crow K, Ferguson HL, Kelly C, Fritsch B, Morton CC. Deletion of an enhancer near DLX5 and DLX6 in a family with hearing loss, craniofacial defects, and an inv(7)(q21.3q35). **Hum Genet.** **127**:19-31, 2010.
- Brussino A, Vaula G, Cagnoli C, Mauro A, Pradotto L, Daniele D, Di Gregorio E, Barberis M, Arduino C, Squadrone S, Abete MC, Migone N, Calabrese O, Brusco A. A novel family with Lamin B1 duplication associated with adult-onset leucoencephalopathy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **80**:237-240, 2009.
- Cantagrel V, Lossi AM, Lisgo S, Missirian C, Borges A, Philip N, Fernandez C, Cardoso C, Figarella-Branger D, Moncla A, Lindsay S, Dobyns WB, Villard L. Truncation of NHEJ1 in a patient with polymicrogyria. **Hum Mutat** **28**:356-364, 2007.
- Carter AN, Cole CL, Playle AG, Ramsay EJ, Shervington AA. GPR26: a marker for primary glioblastoma? **Mol Cell Probes** **22**:133-137, 2008.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp Cell Res** **60**:315-319, 1970.

- Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, Erdogan F, Li N, Kijas Z, Arkesteijn G, Pajares IL, Goetz-Sothmann M, Heinrich U, Rost I, Dufke A, Grasshoff U, Glaeser B, Vingron M, Ropers HH. Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. **Genome Res** **18**:1143-9, 2008.
- Chen W, Ullmann R, Langnick C, Menzel C, Wotschovsky Z, Hu H, Döring A, Hu Y, Kang H, Tzschach A, Hoeltzenbein M, Neitzel H, Markus S, Wiedersberg E, Kistner G, van Ravenswaaij-Arts CM, Kleefstra T, Kalscheuer VM, Ropers HH. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next-generation paired-end sequencing. **Eur J Hum Genet** **18**:539-43, 2010.
- Chiang C, Jacobsen JC, Ernst C, Hanscom C, Heilbut A, Blumenthal I, Mills RE, Kirby A, Lindgren AM, Rudiger SR, McLaughlan CJ, Bawden CS, Reid SJ, Faull RL, Snell RG, Hall IM, Shen Y, Ohsumi TK, Borowsky ML, Daly MJ, Lee C, Morton CC, MacDonald ME, Gusella JF, Talkowski ME. Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. **Nat Genet** **44**:390-7, S1, 2012.
- Ciccione R, Giorda R, Gregato G, Guerrini R, Giglio S, Carrozzo R, Bonaglia MC, Priolo E, Laganà C, Tenconi R, Rocchi M, Pramparo T, Zuffardi O, Rossi E. Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists? **Hum Genet** **117**:571-82, 2005.
- Cox JJ, Holden ST, Dee S, Burbridge JJ, Raymond FL. Identification of a 650 kb duplication at the X chromosome breakpoint in a patient with 46,X,t(X;8)(q28;q12) and non-syndromic mental retardation. **J Med Genet.** **40**:169-74, 2003.
- Crasta KI, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, Nezi L, Protopopov A, Chowdhury D, Pellman D. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. **Nature** **482**:53-8, 2012
- Crolla JA, van Heyningen V. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. **Am J Hum Genet** **71**: 1138-1149, 2002.
- Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozłowski K, Perala M, Carter L, Spector TD, Kolodziej L, Seppanen U, Glazar R, Krolewski J, Latos-Bielenska A, Ala-Kokko L. A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity. **Am J Hum Genet** **69**: 969-980, 2001.
- Damseh N, Simonin A, Jalas C, Picoraro JA, Shaag A, Cho MT, Yaacov B, Neidich J, Al-Ashhab M, Juusola J, Bale S, Telegrafi A, Retterer K, Pappas JG, Moran E, Cappell J, Anyane Yeboa K, Abu-Libdeh B, Hediger MA, Chung WK, Elpeleg O, Edvardson S. Mutations in SLC1A4, encoding the brain serine transporter, are associated with developmental delay, microcephaly and hypomyelination. **J Med Genet** **52**:541-7, 2015.
- David D, Cardoso J, Marques B, Marques R, Silva ED, Santos H, Boavida MG. Molecular characterization of a familial translocation implicates disruption of HDAC9 and possible position effect on TGF beta2 in the pathogenesis of Peters' anomaly. **Genomics** **81**:489-503, 2003.

- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. **Nature** **454**: 56-61, 2008.
- de Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. **J Med Genet** **44**: 750-62, 2007.
- de Laat W, Duboule D. Topology of mammalian developmental enhancers and their regulatory landscapes. **Nature** **502**:499-506, 2013.
- de Pontual L, Mathieu Y, Golzio C, Rio M, Malan V, Boddart N, Soufflet C, Picard C, Durandy A, Dobbie A, Heron D, Isidor B, and 12 others. Mutational, functional, and expression studies of the TCF4 gene in Pitt-Hopkins syndrome. **Hum Mutat** **30**: 669-676, 2009.
- Del Campo M, Jones MC, Veraksa AN, Curry CJ, Jones KL, Mascarello JT, Ali-Kahn-Catts Z, Drumheller T, McGinnis W. Monodactylous limbs and abnormal genitalia are associated with hemizygoty for the human 2q31 region that includes the HOXD cluster. **Am J Hum Genet** **65**: 104–110, 1999.
- Delahaye A, Pipiras E, Kanafani S, Touboul C, Vergnaud A, Encha-Razavi F, Sinico M, Benkhalifa M, Kasakyan S, Serero S, Wolf JP, Gérard-Blanluet M, Benzacken B. De novo subtelomeric deletion additional to an inherited apparently balanced reciprocal translocation. **Fetal Diagn Ther** **22**:306-12, 2007.
- DeLisi LE, Mesen A, Rodriguez C, Bertheau A, LaPrade B, Llach M, Riondet S, Razi K, Relja M, Byerley W, Sherrington R. Genome-wide scan for linkage to schizophrenia in a Spanish-origin cohort from Costa Rica. **Am J Med Genet** **114**:497–508, 2002.
- Dimitrov B, Balikova I, de Ravel T, Van Esch H, De Smedt M, Baten E, Vermeesch JR, Bradinova I, Simeonov E, DevriendtK, Fryns JP, Debeer P. 2q31.1 microdeletion syndrome: redefining the associated clinical phenotype. **J Med Genet** **48**:98-104, 2011.
- Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. **Nature** **485**:376-380, 2012.
- Dong Z, Jiang L, Yang C, Hu H, Wang X, Chen H, Choy KW, Hu H, Dong Y, Hu B, Xu J, Long Y, Cao S, Chen H, Wang WJ, Jiang H, Xu F, Yao H, Xu X, Liang Z. A robust approach for blind detection of balanced chromosomal rearrangements with whole-genome low-coverage sequencing. **Hum Mutat** **35**:625-36, 2014.
- Dowjat WK, Adayev T, Kuchna I, Nowicki K, Palmminiello S, Hwang YW, Wegiel J. Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. **Neurosci Lett** **413**:77–8, 2007.

- Dreesen O, Chojnowski A, Ong PF, Zhao TY, Common JE, Lunny D, Lane EB, Lee SJ, Vardy LA, Stewart CL, Colman A. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. **J Cell Biol** **200**:605-617, 2013.
- Drets ME, & Shaw MW. Specific banding patterns of human chromosomes. **Proc Natl Acad Sci** **68**:2073-2077, 1971.
- Duba HC, Doll A, Neyer M, Erdel M, Mann C, Hammerer I et al. The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams-Beurensyndrome. **Eur J Hum Genet** **10**:351-361, 2002.
- Dupont JM, Cuisset L, Cartigny M, Le Tessier D, Vasseur C, Rabineau D, Jeanpierre M. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. **Am J Med Genet** **111**:405-8, 2002.
- Dutrillaux B, Lejeune J. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. **C R Acad Sci Paris** **272**:2638-2640, 1971.
- Edvardson S, Ashikov A, J alas C, Sturiale L, Shaag A, Fedick A, Treff NR, Garozzo D, Gerardy-Schahn R, Elpeleg O. Mutations in SLC35A3 cause autism spectrum disorder, epilepsy and arthrogryposis. **J Med Genet** **50**:733-9, 2013.
- Elliott B, Richardson C, Jasin M. Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. **Mol Cell** **17**:885-94, 2005.
- Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M, Danes S, van Heyningen V, Hanson I. Aniridia associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. **Hum Mol Genet** **4**:415-422, 1995.
- Fantes JA, Boland E, Ramsay J, Donnai D, Splitt M, Goodship JA, Stewart H, Whiteford M, Gautier P, Harewood L, Holloway S, Sharkey F, Maher E, van Heyningen V, Clayton-Smith J, Fitzpatrick DR, Black GC. FISH mapping of de novo apparently balanced chromosome rearrangements identifies characteristics associated with phenotypic abnormality. **Am J Hum Genet** **82**:916-26, 2008.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. **Nature** **386**:796-804, 1997.
- Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B et al. Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B, Yntema H, Dijkhuizen T, Lugtenberg D, Verheij J, Green A, Hordijk R, Reardon W, Vries B, Brunner H, Bongers E, Leeuw N, van Ravenswaaij-Arts C. **Eur J Hum Genet** **19**: 1152-1160, 2011.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. **Nat Rev Genet** **7**:85-97, 2006.
- Filges I, Shimojima K, Okamoto N, Röthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. **J Med Genet** **48**:117-22, 2011.
- Finelli P, Sirchia SM, Masciadri M, Crippa M, Recalcati MP, Rusconi D, Giardino D, Monti L, Cogliati F, Faravelli F, Natacci F, Zoccante L, Bernardina BD, Russo

- S, Larizza L. Juxtaposition of heterochromatic and euchromatic regions by chromosomal translocation mediates a heterochromatic long-range position effect associated with a severe neurological phenotype. **Mol Cytogenet** **5**:16, 2012.
- Finger JH, Bronson RT, Harris B, Johnson K, Przyborski SA, Ackerman SL. Netrin 1 receptors Unc5h3 and Dcc are necessary at multiple choice points for the guidance of corticospinal tract axons. **J Neurosci** **22**:10346-56, 2002.
- Foller M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, Hofmann F, Schuler B, Vogel J, Pichler B, Kasinathan RS, Nicolay JP, Huber SM, Lang F, Feil R. Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. **Proc Nat Acad Sci** **18**: 6771-6776, 2008.
- Fonseca SAS. Alterações cromossômicas estruturais no mapeamento de regiões candidatas para quadros sindrômicos. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
- Fonseca, ACS. Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos: mapeamento dos pontos de quebra e triagem de deleções e duplicações submicroscópicas. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.
- Fonseca ACS, Bonaldi A, Costa SS, Freitas MR, Kok F, Vianna-Morgante AM. PLP1 duplication at the breakpoint regions of an apparently balanced t(X;22) translocation causes Pelizaeus-Merzbacher disease in a girl. **Clin Genet** **83**:169-174, 2013.
- Fonseca ACS, Bonaldi A, Bertola DR, Kim CA, Otto PA, Vianna-Morgante AM. The clinical impact of chromosomal rearrangements with breakpoints upstream of the SOX9 gene: two novel de novo balanced translocations associated with acampomelic campomelic dysplasia. **BMC Med Genet** **14**:50, 2013.
- Fontes, Larissa. Mapeamento dos pontos de quebra de translocações equilibradas na busca de genes candidatos aos quadros clínicos associados. **Dissertação de mestrado**. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.
- Fotaki V, Dierssen M, Alcántara S, Martínez S, Martí E, Casas C, Visa J, Soriano E, Estivill X, Arbonés ML. Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. **Mol Cell Biol** **22**: 6636–6647, 2002.
- Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PM, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. **BMJ** **332**:759-63, 2006.
- Fryns JP, van den Berghe H. Possible excess of mental handicap and congenital malformations in autosomal reciprocal translocations. **Ann Genet** **22**:125-127, 1979.
- Gallione C, Aylsworth A, Beis, J, Berk, T, Bernhardt B, Clark RD, Clericuzio C, Danesino C, Drautz J, Fahl J, Fan Z, Faughnan ME, and 19 others. Overlapping spectra of SMAD4 mutations in juvenile polyposis (JP) and JP-HHT syndrome. **Am J Med Genet** **152A**: 333-339, 2010.
- Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O.

- Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. **Am J Hum Genet** **68**:874-883, 2001.
- Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Gueneri S, Selicorni A, Stumm M, Tonnie H, Ventura M, Zollino M, Neri G, Barber J, Wieczorek D, Rocchi M, Zuffardi O. Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. **Am J Hum Genet** **71**:276-285, 2002.
- Gijsbers AC, Bosch CA, Dauwerse JG, Giromus O, Hansson K, Hilhorst-Hofstee Y, Kriek M, van Haeringen A, Bijlsma EK, Bakker E, Breuning MH, Ruivenkamp CA. Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. **Eur J Med Genet** **53**:227-33, 2010.
- Giorgio E, Rolyan H, Kropp L, Chakka AB, Yatsenko S, Di Gregorio E et al. Analysis of LMNB1 duplications in autosomal dominant leukodystrophy provides insights into duplication mechanisms and allele-specific expression. **Hum Mutat** **34**:1160-1171, 2013.
- Giorgio E, Robyr D, Spielmann M, Ferrero E, Di Gregorio E, Imperiale D, Vaula G, Stamoulis G, Santoni F, Atzori C, Gasparini L, Ferrera D, Canale C, Guipponi M, Pennacchio LA, Antonarakis SE, Brussino A, Brusco A. A large genomic deletion leads to enhancer adoption by the lamin B1 gene: a second path to autosomal dominant adult-onset demyelinating leukodystrophy (ADLD). **Hum Mol Genet** **24**:3143-3154, 2015.
- Göhring I, Tagariello A, Ende S, Stolt CC, Ghassibé M, Fisher M, Thiel CT, Trautmann U, Vikkula M, Winterpacht A, FitzPatrick DR, Rauch A. Disruption of ST5 is associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. **J Med Genet** **47**:91-8, 2010.
- Goode DK, Snell P, Smith SF, Cooke JE, Elgar G. Highly conserved regulatory elements around the SHH gene may contribute to the maintenance of conserved synteny across human chromosome 7q36.3. **Genomics** **86**:172-81, 2005.
- Gordon CT, Tan TY, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S, Farlie PG. Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease. **J Med Genet** **46**:649-56, 2009.
- Goubau C, Devriendt K, Van der Aa N, Crepel A, Wieczorek D, Kleefstra T, Willemsen MH, Rauch A, Tzschach A, de Ravel T, Leemans P, Van Geet C, Buyse G, Freson K. Platelet defects in congenital variant of Rett syndrome patients with FOXP1 mutations or reduced expression due to a position effect at 14q12. **Eur J Hum Genet** **21**:1349-55, 2013.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youngs SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. **J Med Genet**. **42**:8-16, 2005.
- Grossmann V, Höckner M, Karmous-Benailly H, Liang D, Puttinger R, Quadrelli R, Röthlisberger B, Huber A, Wu L, Spreiz A, Fauth C, Erdel M, Zschocke J, Utermann G, Kotzot D. Parental origin of apparently balanced de novo complex chromosomal rearrangements investigated by microdissection, whole genome

- amplification, and microsatellite-mediated haplotype analysis. **Clin Genet** **78**:548-53, 2010.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. **Pathogenetics** **1**:4, 2008.
- Guilherme RS, Cernach MC, Sfakianakis TE, Takeno SS, Nardoza LM, Rossi C, Bhatt SS, Liehr T, Melaragno MI. A complex chromosome rearrangement involving four chromosomes, nine breakpoints and a cryptic 0.6-Mb deletion in a boy with cerebellar hypoplasia and defects in skull ossification. **Cytogenet Genome Res** **141**:317-23, 2013.
- Gurnett CA, Bowcock AM, Dietz FR, Morcuende JA, Murray JC, Dobbs MB. Two novel point mutations in the long-range SHH enhancer in three families with triphalangeal thumb and preaxial polydactyly. **Am J Med Genet A** **143A**:27-32, 2007.
- Gurnett CA, Bowcock AM, Dietz FR, Morcuende JA, Murray JC, Dobbs MB. Two novel point mutations in the long-range SHH enhancer in three families with triphalangeal thumb and preaxial polydactyly. **Am J Med Genet A** **143A**:27-32, 2007.
- Haldeman-Englert CR, Chapman KA, Kruger H, Geiger EA, McDonaldMcGinn DM, Rappaport E, Zackai EH, Spinner NB, Shaikh TH. 2010. A de novo 8.8-Mb deletion of 21q21.1-q21.3 in an autistic male with a complex rearrangement involving chromosomes 6, 10 and 21. **Am J Med Genet A** **152A**:196-202, 2010.
- Halgren C, Kjaergaard S, Bak M, Hansen C, El-Schich Z, Anderson C, Henriksen K, Hjalgrim H, Kirchhoff M, Bijlsma E, Nielsen M, den Hollander N, Ruivenkamp C, Isidor B, Le Caignec C, Zannolli R, Mucciolo M, Renieri A, Mari F, Anderlid BM, Andrieux J, Dieux A, Tommerup N, Bache I. Corpus callosum abnormalities, intellectual disability, speech impairment, and autism in patients with haploinsufficiency of ARID1B. **Clin Genet** **82**:248-55, 2012.
- Hämmerle B, Carnicero A, Elizalde C, Ceron J, Martínez S, Tejedor FJ Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. **Eur J Neurosci** **17**:2277-86, 2003.
- Hancarova M, Vejvalkova S, Trkova M, Drabova J, Dleskova A, Vlckova M, Sedlacek Z. Identification of a patient with intellectual disability and de novo 3.7 Mb deletion supports the existence of a novel microdeletion syndrome in 2p14-p15. **Gene** **516**:158-61, 2013.
- Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. **PLoS Genet** **5**:e1000327, 2009.
- Heimer G, Marek-Yagel D, Eyal E, Barel O, Oz Levi D, Hoffmann C, Ruzzo EK, Ganelin-Cohen E, Lancet D, Pras E, Rechavi G, Nissenkorn A, Anikster Y, Goldstein DB, Ben Zeev B. SLC1A4 mutations cause a novel disorder of intellectual disability, progressive microcephaly, spasticity and thin corpus callosum. **Clin Genet** **88**:327-35, 2015
- Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, De Paepe A, Kramer P, Beemer F, Mortier GR. Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal

- recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. **Am J Hum Genet** **72**:1040-6, 2003.
- Helmbacher F, Schneider-Maunoury S, Topilko P, Turet L, Charnay P. Targeting of the EphA4 tyrosine kinase receptor affects dorsal/ventral pathfinding of limb motor axons. **Development** **127**:3313-24, 2000.
- Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, Donovan DJ, Eisenman R, Fan Y, Farra CG, Ferguson HL, Gusella JF, Harris DJ, Herrick SR, Kelly C, Kim HG, Kishikawa S, Korf BR, Kulkarni S, Lally E, Leach NT, Lemyre E, Lewis J, Ligon AH, Lu W, Maas RL, MacDonald ME, Moore SD, Peters RE, Quade BJ, Quintero-Rivera F, Saadi I, Shen Y, Shendure J, Williamson RE, Morton CC. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. **Am J Hum Genet** **82**:712-22, 2008.
- Himpel S, Panzer P, Eirmbter K, Czajkowska H, Sayed M, Packman LC, Blundell T, Kentrup H, Grötzinger J, Joost HG, Becker W. Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. **Biochem J** **359**:497-505, 2001.
- Hoischen A, van Bon BW, Gilissen C, Arts P, van Lier B, Steehouwer M, de Vries P, de Reuver R, Wieskamp N, Mortier G, Devriendt K, Amorim MZ, Revencu N, Kidd A, Barbosa M, Turner A, Smith J, Oley C, Henderson A, Hayes IM, Thompson EM, Brunner HG, de Vries BB, Veltman JA. De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. **Nat Genet** **42**:483-5, 2010.
- Howarth KD, Pole JC, Beavis JC, Batty EM, Newman S, Bignell GR, Edwards PA. Large duplications at reciprocal translocation breakpoints that might be the counterpart of large deletions and could arise from stalled replication bubbles. **Genome Res** **21**:525-34, 2011.
- Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson, IP. M, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen LA. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. **Science** **280**: 1086-1088, 1998.
- Hussain MS, Baig SM, Neumann S, Nürnberg G, Farooq M, Ahmad I, Alef T, Hennies HC, Technau M, Altmüller J, Frommolt P, Thiele H, Noegel AA, Nürnberg P. A truncating mutation of CEP135 causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. **Am J Hum Genet** **90**:871-878, 2012.
- Ibn-Salem J, Köhler S, Love MI, Chung HR, Huang N, Hurles ME, Haendel M, Washington NL, Smedley D, Mungall CJ, Lewis SE, Ott CE, Bauer S, Schofield PN, Mundlos S, Spielmann M, Robinson PN. Deletions of chromosomal regulatory boundaries are associated with congenital disease. **Genome Biol** **15**:423, 2014.
- Ikeda T, Zhang J, Chano T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawaguchi H, Nakamura K, Ikegawa S. Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. **Gene** **298**:59-68, 2012.
- Jacobs, PA, Hassold, TJ. Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. **Human Genetics: Proceedings of the 7th International Congress**: 234-244, 1986.

- Jamieson RV, Perveen R, Kerr B, Carette M, Yardley J, Heon E, Wirth MG, van Heyningen V, Donnai D, Munier F, Black GC.. Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. **Hum Mol Genet** **11**:33-42, 2002.
- Jorgez CJ, Rosenfeld JA, Wilken NR, Vangapandu HV, Sahin A, Pham D, Carvalho CM, Bandholz A, Miller A, Weaver DD, Burton B, Babu D, Bamforth JS, Wilks T, Flynn DP, Roeder E, Patel A, Cheung SW, Lupski JR, Lamb DJ. Genitourinary defects associated with genomic deletions in 2p15 encompassing OTX1. **PLoS One** **9**:e107028, 2014.
- Kalscheuer VM, Feenstra I, Van Ravenswaaij-Arts CMA, Smeets DFCM, Menzel C, Ullmann R, Musante L Ropers,H-H. Disruption of the TCF4 gene in a girl with mental retardation but without the classical Pitt-Hopkins syndrome. **Am J Med Genet** **146A**: 2053-2059, 2008.
- Kamps MP, Look AT, Baltimore D. The human t(1;19) translocation in pre-B ALL produces multiple nuclear E2A-Pbx1 fusion proteins with differing transforming potentials. **Genes Dev** **5**:358-68, 1991.
- Kim J, Won HH, Kim Y1, Choi JR, Yu N, Lee KA. Breakpoint mapping by whole genome sequencing identifies PTH2R gene disruption in a patient with midline craniosynostosis and a de novo balanced chromosomal rearrangement. **J Med Genet** **52**:706-9, 2015.
- Kleinjan DA, Lettice LA. Long-range gene control and genetic disease. **Adv Genet** **61**:339-388, 2008.
- Kleinjan DJ, Coutinho P. Cis-ruption mechanisms: disruption of cis-regulatory control as a cause of human genetic disease. **Brief Funct Genomic Proteomic** **8**:317-332, 2009.
- Kleinjan DJ, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. **Hum Mol Genet.** **7**:1611-8, 1998.
- Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, Letteboer T, van Nesselrooij B, Hochstenbach R, Poot M, Cuppen E. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. **Hum Mol Genet** **20**:1916-24, 2011.
- Kloosterman WP, Tavakoli-Yaraki M, van Roosmalen MJ, van Binsbergen E, Renkens I, Duran K, Ballarati L, Vergult S, Giardino D, Hansson K, Ruivenkamp CA, Jager M, van Haeringen A, Ippel EF, Haaf T, Passarge E, Hochstenbach R, Menten B, Larizza L, Guryev V, Poot M, Cuppen E. Constitutional chromothripsis rearrangements involve clustered double-stranded DNA breaks and nonhomologous repair mechanisms. **Cell Rep** **1**:648-55, 2012.
- Klopocki E, Lohan S, Brancati F, Koll R, Brehm A, Seemann P, Dathe K, Stricker S, Hecht J, Bosse K, Betz RC, Garaci FG, Dallapiccola B, Jain M, Muenke M, Ng VC, Chan W, Chan D, Mundlos S. Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. **Am J Hum Genet** **88**:70-5, 2011.
- Ko SY, Dass CR, Nurgali K. Netrin-1 in the developing enteric nervous system and colorectal cancer. **Trends Mol Med** **18**:544-54, 2012.

- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell** **50**:509-517, 1987.
- Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W. Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. **Nat Genet** **18**:81-3, 1998.
- Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, Kim PM, Palejev D, Carriero NJ, Du L, Taillon BE, Chen Z, Tanzer A, Saunders AC, Chi J, Yang F, Carter NP, Hurles ME, Weissman SM, Harkins TT, Gerstein MB, Egholm M, Snyder M. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. **Science** **318**:420-6, 2007.
- Kortüm F, Das S, Flindt M, Morris-Rosendahl DJ, Stefanova I, Goldstein A, Horn D, Klopocki E, Kluger G, Martin P, Rauch A, Roumer A, Saitta S, Walsh LE, Wiczorek D, Uyanik G, Kutsche K, Dobyns WB. The core FOXG1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. **J Med Genet** **48**:396-406, 2011.
- Krepischi-Santos AC, Rajan D, Temple IK, Shrubbs V, Crolla JA, Huang S, Beal S, Otto PA, Carter NP, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C. Constitutional haploinsufficiency of tumor suppressor genes in mentally retarded patients with microdeletions in 17p13.1. **Cytogenet Genome Res** **125**:1-7, 2009.
- Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML. Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). **Hum Mol Genet** **9**: 1665-1670, 2000.
- Kurahashi H, Emanuel BS. Long AT-rich palindromes and the constitutional t(11;22) breakpoint. **Hum Mol Genet** **10**:2605-2617, 2001.
- Kurahashi H, Inagaki H, Hosoba E, Kato T, Ohye T, Kogo H, Emanuel BS. Molecular cloning of a translocation breakpoint hotspot in 22q11. **Genome Res** **17**: 461-469, 2007.
- Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS. The constitutional t(11;22): implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangements. **Clin Genet** **78**:299-309, 2010.
- Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita HA, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura Ki K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. **Nat Genet** **30**:365-6, 2002.
- Kwan KY1, Lam MM, Krsnik Z, Kawasawa YI, Lefebvre V, Sestan N. SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. **Proc Natl Acad Sci USA** **105**:16021-6, 2008.
- Laguna A, Aranda S, Barallobre MJ, Barhoum R, Fernandez E, Fotaki V, Delabar JM, de la Luna S, de la Villa P, Arbones ML. The protein kinase DYRK1A regulates

- caspase-9-mediated apoptosis during retina development. **Dev Cell** **15**:841–853, 2008.
- Lamb AN, Rosenfeld JA, Neill NJ, Talkowski ME, Blumenthal I, Girirajan S, Keelean-Fuller D, Fan Z, Pouncey J, Stevens C, Mackay-Loder L, Terespolsky D, Bader PI, Rosenbaum K, Vallee SE, Moeschler JB, Ladda R, Sell S, Martin J, Ryan S, Jones MC, Moran R, Shealy A, Madan-Khetarpal S, McConnell J, Surti U, Delahaye A, Heron-Longe B, Pipiras E, Benzacken B, Passemard S, Verloes A, Isidor B, Le Caignec C, Glew GM, Opheim KE, Descartes M, Eichler EE, Morton CC, Gusella JF, Schultz RA, Ballif BC, Shaffer LG. Haploinsufficiency of SOX5 at 12p12.1 is associated with developmental delays with prominent language delay, behavior problems, and mild dysmorphic features. **Hum Mutat** **33**: 728-740, 2012.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J, Banaschewski T, Ebstein R, Gill M, Miranda A, Mulas F, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Sonuga-Barke E, Steinhausen HC, Taylor E, Daly M, Laird N, Lange C, Faraone SV. Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** **147B**:1345-54, 2008.
- Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Méry C, Soichot P, Cusin V, Faivre L, Locatelli MC, Mayençon M, Sarcey A, Broussolle E, Camu W, David A, Rousson R. A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. **Am J Hum Genet** **86**:77-82, 2010.
- Lauderdale JD, Wilensky JS, Oliver ER, Walton DS, Glaser T. 30 deletions cause aniridia by preventing PAX6 gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA** **97**:13755-13759, 2000.
- Le Scouarnec S, Gribble SM. Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. **Heredity** **108**:75-85, 2012.
- Le Tanno P, Poreau B, Devillard F, Vieville G, Amblard F, Jouk PS, Satre V, Coutton C. Maternal complex chromosomal rearrangement leads to TCF12 microdeletion in a patient presenting with coronal craniosynostosis and intellectual disability. **Am J Med Genet A** **164A**:1530-6, 2014.
- Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M, Carey JC. Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation. **Am J Hum Genet** **44**:20-4, 1989.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. **Cell** **131**:1235-1247, 2007.
- Leipoldt M, Erdel M, Bien-Willner GA, Smyk M, Theurl M, Yatsenko SA, Lupski JR, Lane AH, Shanske AL, Stankiewicz P, Scherer G. Two novel translocation breakpoints upstream of SOX9 define borders of the proximal and distal breakpoint cluster region in campomelic dysplasia. **Clin Genet** **71**:67-75, 2007.
- Leroy O, Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Belarbi K, Delacourte A, Andreadis A, Sablonnière B, Buée L, Sergeant N, Caillet-Boudin ML. ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. **J Neurosci Res** **84**:852-859, 2006.

- Lesnik Oberstein SA, Kriek M, White SJ, Kalf ME, Szuhai K, den Dunnen JT, Breuning MH, Hennekam RC. Peters Plus syndrome is caused by mutations in B3GALTL, a putative glycosyltransferase. **Am J Hum Genet** **79**:562-6, 2006.
- Lettice LA, Daniels S, Sweeney E, Venkataraman S, Devenney PS, Gautier P, Morrison H, Fantes J, Hill RE, FitzPatrick DR. Enhancer-adoption as a mechanism of human developmental disease. **Hum Mutat** **32**:1492-9, 2011.
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. **Proc Natl Acad Sci USA** **99**:7548-7553, 2002.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics** **25**:1754-1760, 2009.
- Li H, Yamagata T, Mori M, Yasuhara A, Momoi MY. Mutation analysis of methyl-CpG binding protein family genes in autistic patients. **Brain Dev** **27**:321-325, 2005.
- Li SY, Gibson LH, Gomez K, Pober BR, Yang-Feng TL. Familial dup(5)(q15q21) associated with normal and abnormal phenotypes. **Am J Med Genet** **75**:75-77, 1998.
- Lieber MR. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. **Nat Struct Mol Biol** **17**:393-5, 2010
- Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). **Mol Cytogenet** **3**:8, 2010.
- Lo Nigro C, Chong CS, Smith AC, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH. Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. **Hum Mol Genet** **6**:157-64, 1997.
- Lowry RB1, Chernos JE, Connelly MS, Wyse JP. Interstitial deletions at 6q14.1q15 associated with developmental delay and a marfanoid phenotype. **Mol Syndromol** **4**:280-4, 2013.
- Luo R, Sanders SJ, Tian Y, Voineagu I, Huang N, Chu SH, Klei L, Cai C, Ou J, Lowe JK, Hurler ME, Devlin B, State MW, Geschwind DH. Genome-wide transcriptome profiling reveals the functional impact of rare de novo and recurrent CNVs in autism spectrum disorders. **Am J Hum Genet** **91**:38-55, 2012.
- Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. **Cell** **161**:1012-25, 2015
- Lybaek H, Øyen N, Fauske L, Houge G. A 2.1 Mb deletion adjacent but distal to a 14q21q23 paracentric inversion in a family with spherocytosis and severe learning difficulties. **Clin Genet** **74**:553-559, 2008.

- Ma JL, Kim EM, Haber JE, Lee SE. Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. **Mol Cell Biol** **23**:8820-8, 2003.
- Maass PG, Rump A, Schulz H, Stricker S, Schulze L, Platzer K, Aydin A, Tinschert S, Goldring MB, Luft FC, Bähring S. A misplaced lncRNA causes brachydactyly in humans. **J Clin Invest** **122**:3990-4002, 2012.
- Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet** **24**:133-41, 2008.
- Marlin S, Blanchard S, Slim R, Lacombe D, Denoyelle F, Alessandri JL, Calzolari E, Drouin-Garraud V, Ferraz FG, Fourmaintraux A, Philip N, Toubanc JE, Petit Townes-Brocks syndrome: detection of a SALL1 mutation hot spot and evidence for a position effect in one patient. **Hum Mutat** **14**:377-86, 1999.
- Marseglia G, Scordo MR, Pescucci C, Nannetti G, Biagini E, Scandurra V, Gerundino F, Magi A, Benelli M, Torricelli F. 372 kb microdeletion in 18q12.3 causing SETBP1 haploinsufficiency associated with mild mental retardation and expressive speech impairment. **Eur J Med Genet** **55**:216-21, 2012.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. **Nature** **465**:223-226, 2010.
- McLaughlin HM, Sakaguchi R, Giblin W, NISC Comparative Sequencing Program, Wilson TE, Biesecker L, Lupski JR, Talbot K, Vance JM, Züchner S, Lee YC, Kennerson M, Hou YM, Nicholson G, Antonellis A. A recurrent loss-of-function alanyl-tRNA synthetase (AARS) mutation in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 2N (CMT2N). **Hum Mutat** **33**:244-53, 2012.
- McMichael G1, Haan E, Garer A, Yap TY, Thompson S, Ouvrier R, Dale RC, Gecz J, Maclennan AH. NKX2-1 mutation in a family diagnosed with ataxic dyskinetic cerebral palsy. **Eur J Med Genet** **56**:506-9, 2013.
- McVey M, Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. **Trends Genet** **24**:529-38, 2008.
- Meijer IA, Simoes-Lopes AA, Laurent S, Katz T, St-Onge J, Verlaan DJ, Dupré N, Thibault M, Mathurin J, Bouchard JP, Rouleau GA. A novel duplication confirms the involvement of 5q23.2 in autosomal dominant leukodystrophy. **Arch Neurol** **65**:1496-1501, 2008.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **Am J Hum Genet** **86**:749-64, 2010.
- Mitter D, Chiaie BD, Lüdecke HJ, Gillessen-Kaesbach G, Bohring A, Kohlhase J, Caliebe A, Siebert R, Roepke A, Ramos-Arroyo MA, Nieva B, Menten B, Loeyes

- B, Mortier G, Wieczorek D. Genotype-phenotype correlation in eight new patients with a deletion encompassing 2q31.1. **Am J Med Genet A** **152A**:1213-24, 2010.
- Møller RS, Kübart S, Hoeltzenbein M, Heye B, Vogel I, Hansen CP, Menzel C, Ullmann R, Tommerup N, Ropers HH, Tümer Z, Kalscheuer VM. Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. **Am J Hum Genet** **82**:1165-70, 2008.
- Morales C, Mademont-Soler I, Armengol L, Milà M, Badenas C, Andrés S, Soler A, Sánchez A. Characterization of a 5.8-Mb interstitial deletion of chromosome 3p in a girl with 46,XX,inv(7)dn karyotype and phenotypic abnormalities. **Cytogenet Genome Res** **125**:334-340, 2009.
- Morrow DM, Connelly C, Hieter P. "Break copy" duplication: a model for chromosome fragment formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** **147**:371-82, 1997.
- Motazacker MM, Rost BR, Hucho T, Garshasbi M, Kahrizi K, Ullmann R, Abedini SS, Nieh SE, Amini SH, Goswami C, Tzschach A, Jensen LR, Schmitz D, Ropers HH, Najmabadi H, Kuss AW. 2007. A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. **Am J Hum Genet** **81**:792-798.
- Nazaryan L, Stefanou EG, Hansen C, Kosyakova N, Bak M, Sharkey FH, Mantziou T, Papanastasiou AD, Velissariou V, Liehr T, Syrrou M, Tommerup N. The strength of combined cytogenetic and mate-pair sequencing techniques illustrated by a germline chromothripsis rearrangement involving FOXP2. **Eur J Hum Genet** **22**:338-43, 2014.
- Nora EP, Dekker J, Heard E. Segmental folding of chromosomes: a basis for structural and regulatory chromosomal neighborhoods? **Bioessays** **5**:818-28, 2013.
- Nothwang HG, Kim HG, Aoki J, Geisterfer M, Kübart S, Wegner RD, van Moers A, Ashworth LK, Haaf T, Bell J, Arai H, Tommerup N, Ropers HH, Wirth J. Functional hemizyosity of PFAFH1B3 due to a PFAFH1B3-CLK2 fusion gene in a female with mental retardation, ataxia and atrophy of the brain. **Hum Mol Genet** **10**:797-806, 2001.
- Oades RD, Lasky-Su J, Christiansen H, Faraone SV, Sonuga-Barke EJ, Banaschewski T, Chen W, Anney RJ, Buitelaar JK, Ebstein RP, Franke B, Gill M, Miranda A, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant JA, Steinhausen HC, Taylor EA, Thompson M, Asherson P. The influence of serotonin- and other genes on impulsive behavioral aggression and cognitive impulsivity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Findings from a family-based association test (FBAT) analysis. **Behav Brain Funct** **4**:48, 2008.
- Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MV, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H. Paternal origin of the de novo constitutional t(11;22)(q23;q11). **Eur J Hum Genet** **18**:783-787, 2010.
- Ottaviani D, LeCain M, Sheer D. The role of microhomology in genomic structural variation. **Trends Genet** **30**:85-94, 2014.
- Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res* **32** (versão online): W280-W286, 2004.

- Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptáček LJ, Fu YH. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. **Nat Genet** **38**:1114-1123, 2006.
- Page SL, Shaffer LG. Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. **Nat Genet** **15**:231-232, 1997.
- Papadopoulou E, Sismani C, Christodoulou C, Ioannides M, Kalmanti M, Patsalis P. Phenotype-genotype correlation of a patient with a "balanced" translocation 9;15 and cryptic 9q34 duplication and 15q21q25 deletion. **Am J Med Genet A** **152A**:1515-1522, 2010.
- Park J, Song WJ, Chung KC. Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. **Cell Mol Life Sci** **66**:3235-40, 2009
- Parris T, Nik AM, Kotecha S, Langston C, Helou K, Platt C, Carlsson P.. Inversion upstream of FOXF1 in a case of lethal alveolar capillary dysplasia with misalignment of pulmonary veins. **Am J Med Genet A** **161A**:764-70, 2013.
- Peretz A, Gil-Henn H, Sobko A, Shinder V, Attali B, Elson A. Hypomyelination and increased activity of voltage-gated K(+) channels in mice lacking protein tyrosine phosphatase epsilon. **EMBO J** **19**:4036-4045, 2000.
- Pescucci C, Caselli R, Grosso S, Mencarelli MA, Mari F, Farnetani MA, Piccini B, Artuso R, Bruttini M, Priolo M, Zuffardi O, Gimelli S, Balestri P, Renieri A. 2q24-q31 deletion: Report of a case and review of the literature. **Eur J Med Genet** **50**:21-32, 2007.
- Pickard BS, Malloy MP, Christoforou A, Thomson PA, Evans KL, Morris SW, Hampson M, Porteous DJ, Blackwood DH, Muir WJ. 2006. Cytogenetic and genetic evidence supports a role for the kainate-type glutamate receptor gene, GRIK4, in schizophrenia and bipolar disorder. **Mol Psychiatry** **11**:847-57, 2006.
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. **Am J Hum Genet** **94**:677-94, 2014.
- Quintela I, Fernandez-Prieto M, Gomez-Guerrero L, Resches M, Eiris J, Barros F, Carracedo A. A 6q14 1-q15 microdeletion in a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features with concomitant presence of a maternally inherited Xp22. **Clin Case Rep** **3**:415-23, 2015.
- Ramocki MB, Dowling J, Grinberg I, Kimonis VE, Cardoso C, Gross A, Chung J, Martin CL, Ledbetter DH, Dobyns WB, Millen KJ. Reciprocal fusion transcripts of two novel Zn-finger genes in a female with absence of the corpus callosum, ocular colobomas and a balanced translocation between chromosomes 2p24 and 9q32. **Eur J Hum Genet** **11**:527-34, 2003.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, Albrecht B, Bartholdi D, Beygo J, Di Donato N, Dufke A, Cremer K, Hempel M, Horn D, Hoyer J, Joset P, Röpke A, Moog U, Riess A, Thiel CT, Tzschach A, Wiesener A, Wohlleber E, Zweier C, Ekici AB, Zink AM, Rump A, Meisinger C, Grallert H, Sticht H, Schenck A, Engels H, Rappold G, Schröck E, Wieacker P, Riess O, Meitinger T, Reis A, Strom TM. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. **Lancet** **380**:1674-82, 2012.

- Rausch T, Zichner T, Schlattl A, Stütz AM, Benes V, Korbel JO. DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. **Bioinformatics** **28**:i333-i339, 2012
- Robinson DO, Howarth RJ, Williamson KA, van Heyningen V, Beal SJ, Crolla JA. Genetic analysis of chromosome 11p13 and the PAX6 gene in a series of 125 cases referred with aniridia. **Am J Med Genet A** **146A**:558-69, 2008
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. **Nat Biotechnol** **29**:24-26, 2011.
- Robinson WP. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. **Bioessays** **22**:452-459, 2000.
- Rodenas-Cuadrado P1, Ho J2, Vernes SC3. Shining a light on CNTNAP2: complex functions to complex disorders. **Eur J Hum Genet** **22**:171-8, 2014.
- Roessler E et al. Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. **Hum Genet** **100**:172-81, 1997.
- Ronan A, Fagan K, Christie L, Conroy J, Nowak NJ, Turner G. Familial 4.3 Mb duplication of 21q22 sheds new light on the Down syndrome critical region. **J Med Genet** **44**:448-51, 2007.
- Rosenbaum P1, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, Dan B, Jacobsson B. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. **Dev Med Child Neurol Suppl** **109**:8-14, 2007.
- Rowley. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature** **243**: 290-3, 1973.
- Rutsch, F, Gailus, S, Miousse, I R, Suormala, T, Sagne, C, Toliat, M R, Nurnberg, G, Wittkamp, T, Buers, I, Sharifi, A, Stucki, M, Becker, C, Baumgartner, M, Robenek, H, Marquardt, T, Hohne, W, Gasnier, B, Rosenblatt, D S, Fowler, B, Nurnberg, P. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. **Nature Genet** **41**: 234-239, 2009.
- Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, Scioletti AP, Esposito G, Cordeddu V, Lepri F, Petrangeli V, Dentici ML, Mancini GM, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Marino B, Ferrero GB, Silengo MC, Memo L, Stanzial F, Faravelli F, Stuppia L, Puxeddu E, Gelb BD, Dallapiccola B, Tartaglia M. Germline BRAF mutations in Noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous syndromes: molecular diversity and associated phenotypic spectrum. **Hum Mutat** **30**: 695-702, 2009.
- Schanze I, Schanze D, Bacino CA, Douzgou S, Kerr B, Zenker M. Haploinsufficiency of SOX5, a member of the SOX (SRY-related HMG-box) family of transcription factors is a cause of intellectual disability. **Eur J Med Genet** **56**:108-13, 2013.
- Schluth C, Gesny R, Borck G, Redon R, Abadie V, Kleinfinger P, Munnich A, Lyonnet S, Colleaux L. New case of interstitial deletion 12(q15-q21.2) in a girl with facial dysmorphism and mental retardation. **Am J Med Genet A** **146A**:93-6, 2008.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S, Dubourg C, Henry C, Lucas J, Odent S, Pasquier L, Copin H, Latour P, Cordier MP, Nadeau G, Till M, Edery P,

- Andrieux J. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. **Eur J Med Genet** **52**:291-6, 2009.
- Schluth-Bolard C, Labalme A, Cordier MP, Till M, Nadeau G, Tevissen H, Lesca G, Boutry-Kryza N, Rossignol S, Rocas D, Dubruc E, Edery P, Sanlaville D. Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. **J Med Genet** **50**:144-50, 2013.
- Schmidt MA, Michels VV, Dewald GW. Cases of neurofibromatosis with rearrangements of Chromosome 17 involving band 17q11.2. **Am J Med Genet** **28**:771-7, 1987.
- Schmidt T, Bartels I, Liehr T, Burfeind P, Zoll B, Shoukier MA. Family with an Inverted Tandem Duplication 5q22.1q23.2. **Cytogenet Genome Res** **139**:65-70, 2013.
- Schmitz D, Mellor J, Nicoll RA. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. **Science** **291**:1972-1976, 2001.
- Schuster J, Sundblom J, Thureson AC, Hassin-Baer S, Klopstock T, Dichgans M, Cohen OS, Raininko R, Melberg A, Dahl N. Genomic duplications mediate overexpression of lamin B1 in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) with autonomic symptoms. **Neurogenetics** **12**:65-72, 2011.
- Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H, Sidransky D, Casero RA Jr, Meltzer PS, Hahn SA, Kern SE. DPC4 gene in various tumor types. **Cancer Res** **56**:2527-30, 1996.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet** **2**:971-971971.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. **Cell** **87**:1001-14, 1996.
- Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, Bantignies F, Leblanc B, Hoichman M, Parrinello H, Tanay A, Cavalli G. Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. **Cell** **148**:458-72, 2012.
- Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* **34**:297-329, 2000.
- Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. **Hum Mol Genet** **13**:R57-R64, 2004.
- Shioda T, Lechleider RJ, Dunwoodie SL, Li H, Yahata T, de Caestecker MP, Fenner MH, Roberts AB, Isselbacher K J. Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. **Proc Nat Acad Sci** **95**: 9785-9790, 1998.
- Shoichet SA, Kunde SA, Viertel P, Schell-Apacik C, von Voss H, Tommerup N, Ropers HH, Kalscheuer VM. Haploinsufficiency of novel FOXG1B variants in a patient

- with severe mental retardation, brain malformations and microcephaly. **Hum Genet** **117**:536-44, 2005.
- Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E, Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis PC. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. **Mol Cytogenet.** **1**:15, 2008.
- Skurat AV, Dietrich AD. Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. **J Biol Chem** **279**:2490–2498, 2004.
- Slade I, Stephens P, Douglas J, Barker K, Stebbings L, Abbaszadeh F, Pritchard-Jones K; FACT collaboration, Cole R, Pizer B, Stiller C, Vujanic G, Scott RH, Stratton MR, Rahman N. Constitutional translocation breakpoint mapping by genome-wide paired-end sequencing identifies HACE1 as a putative Wilms tumour susceptibility gene. **J Med Genet** **47**:342-7, 2010.
- Slavin TP1, Kuruvilla K, Curtis CA, Christ LA, Mitchell AL. Isolated skeletal malformations in a child with a small mosaic ring microduplication of 18p11.21q11.2: genotype-phenotype correlations. **Am J Med Genet A** **155A**:618-2, 2011.
- Sobreira NL, Gnanakkan V, Walsh M, Marosy B, Wohler E, Thomas G, Hoover-Fong JE, Hamosh A, Wheelan SJ, Valle D. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. **Genome Res** **21**:1720-7, 2011.
- South ST, Rector L, Aston E, Rowe L, Yang SP. Large clinically consequential imbalances detected at the breakpoints of apparently balanced and inherited chromosome rearrangements. **J Mol Diagn** **12**:725-9, 2010.
- Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nat Rev Genet** **6**:782-792, 2005.
- Srour M, Riviere JB, Pham JMT, Dube MP, Girard S, Morin S, Dion PA, Asselin G, Rochefort D, Hince P, Diab S, Sharafaddinzadeh N, Chouinard S, Theoret H, Charron F, Rouleau G. Mutations in DCC cause congenital mirror movements. **Science** **328**: 592, 2010.
- Srour M, Hamdan FF, Gan-Or Z, Labuda D, Nassif C, Oskoui M, Gana-Weisz M, Orr-Urtreger A, Rouleau GA, Michaud JL. A homozygous mutation in SLC1A4 in siblings with severe intellectual disability and microcephaly. **Clin Genet** **88**:e1-4, 2015
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell** **144**:27-40, 2011.
- Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, Stephan DA, Morton DH. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. **N Engl J Med** **354**:1370-7, 2006.

- Suzuki Y, Aoki Y, Ishida Y, Chiba Y, Iwamatsu A, Kishino T, Niikawa N, Matsubara Y, Narisawa K. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. **Nature Genet** **8**: 122-128, 1994.
- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Takeda S, Matsumoto N. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole-genome sequencing. **J Hum Genet** **59**:649-54, 2014.
- Sweatt JD. Pitt-Hopkins Syndrome: intellectual disability due to loss of TCF4-regulated gene transcription. **Exp Mol Med** **45**:e21, 2013
- Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. **Annu Rev Genet** **45**:247-71, 2011.
- Takenouchi T, Hashida N, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. 1p34.3 deletion involving GRIK3: Further clinical implication of GRIK family glutamate receptors in the pathogenesis of developmental delay. **Am J Med Genet A** **164A**:456-60, 2014.
- Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, Kirby A, Liu S, Muddukrishna B, Ohsumi TK, Shen Y, Borowsky M, Daly MJ, Morton CC, Gusella JF. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. **Am J Hum Genet** **88**:469-81, 2011.
- Talkowski ME, Mullegama SV, Rosenfeld JA, van Bon BW, Shen Y, Repnikova EA, Gastier-Foster J, Thrush DL, Kathiresan S, Ruderfer DM, Chiang C, Hanscom C, Ernst C, Lindgren AM, Morton CC, An Y, Astbury C, Brueton LA, Lichtenbelt KD, Ades LC, Fichera M, Romano C, Innis JW, Williams CA, Bartholomew D, Van Allen MI, Parikh A, Zhang L, Wu BL, Pyatt RE, Schwartz S, Shaffer LG, de Vries BB, Gusella JF, Elsea SH. Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. **Am J Hum Genet** **89**:551-63, 2011.
- Tejedor F, Zhu XR, Kaltenbach E, Ackermann A, Baumann A, Canal I, Heisenberg M, Fischbach KF, Pongs O. Minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. **Neuron**.14:287-301, 1995.
- Terradas M, Martín M, Tusell L, Genescà A. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutat Res**.705:60-7, 2010.
- Tharapel AT, Summitt RL. A cytogenetic survey of 200 unclassifiable mentally retarded children with congenital anomalies and 200 normal controls. **Hum Genet** **37**:329-338, 1977.
- Theisen A, Rosenfeld JA, Shane K, McBride KL, Atkin JF, Gaba C, Hoo J, Kurczynski TW, Schnur RE, Coffey LB, Zackai EH, Schimmenti L, Friedman N, Zabukovec M, Ball S, Pagon R, Lucas A, Brasington CK, Spence JE, Sparks S, Banks V, Smith W, Friedberg T, Wyatt PR, Aust M, Tervo R, Crowley A, Skidmore D, Lamb AN, Ravnán B, Sahoo T, Schultz R, Torchia BS, Sgro M, Chitayat D, Shaffer LG. Refinement of the Region for Split Hand/Foot Malformation 5 on 2q31.1. **Mol Syndromol** **1**:262-271, 2010.
- Thomas NS, Morris JK, Baptista J, Ng BL, Crolla JA, Jacobs PA. De novo apparently balanced translocations in man are predominantly paternal in origin and

- associated with a significant increase in paternal age. **J Med Genet** 47:112-5, 2010.
- Thorwarth A, Schnittert-Hübener S, Schrupf P, Müller I, Jyrch S, Dame C, Biebermann H, Kleinau G, Katchanov J, Schuelke M, Ebert G, Steininger A, Bönnemann C, Brockmann K, Christen HJ9, Crock P, deZegher F, Griese M, Hewitt J, Ivarsson S, Hübner C, Kapelari K, Plecko B, Rating D, Stoeva I, Ropers HH, Grüters A, Ullmann R, Krude H. Comprehensive genotyping and clinical characterisation reveal 27 novel NKX2-1 mutations and expand the phenotypic spectrum. **J Med Genet** 51:375-87, 2014.
- Tommerup, N, Rasmussen MB, Mehrjouy MM, Bache I, Lind Thomsen A, Dos Santos Fonseca AC, Halgren C, Bak M, Jacky P. International Breakpoint Mapping Consortium (IBMC). Systematic Mapping of Chromosomal Breakpoints in the Context of Phenotypes and Nuclear Genome Organization. **Cancer Genetics** 208:359-360, 2015.
- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. **Nat Genet.** 36:636-41,2004.
- Tzenova J, Kaplan BJ, Petryshen TL, Field LL. Confirmation of a dyslexia susceptibility locus on chromosome 1p34-p36 in a set of 100 Canadian families. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 127B:117-124, 2004.
- Utami KH1, Hillmer AM, Aksoy I, Chew EG, Teo AS, Zhang Z, Lee CW, Chen PJ, Seng CC, Ariyaratne PN, Rouam SL, Soo LS, Yousoof S, Prokudin I, Peters G, Collins F, Wilson M, Kakakios A, Haddad G, Menuet A, Perche O, Tay SK, Sung KW, Ruan X, Ruan Y, Liu ET, Briault S, Jamieson RV, Davila S, Cacheux V. Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. **PLoS One** 9:e90852, 2014.
- van Bon BW, Hoischen A, Hehir-Kwa J, de Brouwer AP, Ruivenkamp C, Gijsbers AC, Marcelis CL, de Leeuw N, Veltman JA, Brunner HG, de Vries BB. Intragenic deletion in DYRK1A leads to mental retardation and primary microcephaly. **Clin Genet** 79:296-9, 2011.
- Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, van den Ende J, Fukuoka H, Wagatsuma M, Suzuki H, Smets RME, Vanhoenacker F, Declau F, Van De Heyning P, Usami S. A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene. **Am J Hum Genet** 79: 449-457, 2006.
- Van Esch H, Rosser EM, Janssens S, Van Ingelghem I, Loeys B, Menten B. Developmental delay and connective tissue disorder in four patients sharing a common microdeletion at 6q13-14. **J Med Genet** 47:717-20, 2010.
- Vandeweyer G, Kooy RF. Balanced translocations in mental retardation. **Hum Genet** 126:133-47, 2009.
- Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K, Jabs EW, Inui K, Joenje H. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. **Nat Genet** 37:468-70, 2005.

- Vergult S, Krgovic D, Loeys B, Lyonnet S, Liedén A, Anderlid BM, Sharkey F, Joss S, Mortier G, Menten B. Nasal speech and hypothyroidism are common hallmarks of 12q15 microdeletions. **Eur J Hum Genet** **19**:1032-7, 2011.
- Vergult S, Van Binsbergen E, Sante T, Nowak S, Vanakker O, Claes K, Poppe B, Van der AN, van Roosmalen MJ, Duran K, Tavakoli-Yaraki M, Swinkels M, van den Boogaard MJ, van Haelst M, Roelens F, Speleman F, Cuppen E, Mortier G, Kloosterman WP, Menten B. Mate pair sequencing for the detection of chromosomal aberrations in patients with intellectual disability and congenital malformations. **Eur J Hum Genet** **22**:652-9, 2014
- Verkerk AJ, Mathews CA, Joosse M, Eussen BH, Heutink P, Oostra BA; Tourette Syndrome Association International Consortium for Genetics. CNTNAP2 is disrupted in a family with Gilles de la Tourette syndrome and obsessive compulsive disorder. **Genomics** **82**:1-9, 2003.
- Visel A, Minovitsky S, Dubchak I, Pennacchio LA. VISTA Enhancer Browser--a database of tissue-specific human enhancers. **Nucleic Acids Res** **35 (Database issue)**:D88-92, 2007
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. **Science** **273**:613-622, 1996.
- Wang HT, Chang JW, Guo Z, Li BG. In silico-initiated cloning and molecular characterization of cortexin 3, a novel human gene specifically expressed in the kidney and brain, and well conserved in vertebrates. **Int J Mol Med** **20**:501-510, 2007.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. **Am J Hum Genet.** **49**: 995-1013, 1991.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. **Proc Natl Acad Sci USA** **72**:1858-1862, 1975.
- Wenger SL, Steele MW, Boone LY, Lenkey SG, Cummins JH, Chen XQ."Balanced" karyotypes in six abnormal offspring of balanced reciprocal translocation normal carrier parents. **Am J Med Genet.****55**:47-52, 1995.
- Wentzel C, Lynch SA, Stattin EL, Sharkey FH, Annerén G, Thuresson AC. Interstitial Deletions at 6q14.1-q15 Associated with Obesity, Developmental Delay and a Distinct Clinical Phenotype. **Mol Syndromol** **1**:75-81, 2010.
- Wentzel C, Annerén G, Thuresson AC. A maternal de novo non-reciprocal translocation results in a 6q13-q16 deletion in one offspring and a 6q13-q16 duplication in another. **Eur J Med Genet** **7**:259-63, 2014.
- Wibom R, Lasorsa FM, Töhönen V, Barbaro M, Sterky FH, Kucinski T, Naess K, Jonsson M, Pierri CL, Palmieri F, Wedell A. N Engl J Med. AGC1 deficiency associated with global cerebral hypomyelination. 361:489-95, 2009.
- Wilkins JF, Haig D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. **Nat Rev Genet** **4**:359-368, 2003.
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome

- supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. **J Med Genet** **40**:575-584, 2003.
- Wohlleber E, Kirchhoff M, Zink AM, Kreiss-Nachtsheim M, Kuchler A, Jepsen B, Kjaergaard S, Engels H. Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation. **Eur J Med Genet** **54**:67-72, 2011.
- Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, Smith SF, North P, Callaway H, Kelly K, Walter K, Abnizova I, Gilks W, Edwards YJ, Cooke JE, Elgar G. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. **PLoS Biol** **3**:e7, 2005.
- Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T, Suzuki E, Jiang Y, Zhang L, Rodriguez J, Boyle J, Tarpey P, Raymond FL, Nevelsteen J, Froyen G, Stratton M, Futreal A, Gecz J, Stevenson R, Schwartz CE, Valle D, Huganir RL, Wang T. Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. **Proc Natl Acad Sci USA** **104**:18163-8, 2007
- Wunderle VM, Critcher R, Hastie N, Goodfellow PN, Schedl A. Deletion of long range regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. **Proc Natl Acad Sci USA** **95**:10649-54, 1998.
- Wycisk KA, Zeitz C, Feil S, Wittmer M, Forster U, Neidhardt J, Wissinger B, Zrenne E, Wilke R, Kohl S, Berger W. Mutation in the auxiliary calcium-channel subunit CACNA2D4 causes autosomal recessive cone dystrophy. **Am J Hum Genet** **79**:973-7, 2006.
- Yu S, Graf WD. BRAF gene deletion broadens the clinical spectrum neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes. **J Child Neurol** **26**:1593-6, 2011.
- Yuksel-Apak M, Bögershausen N, Pawlik B, Li Y, Apak S, Uyguner O, Milz E, Nürnberg G, Karaman B, Gülgören A, Grzeschik KH, Nürnberg P, Kayserili H, Wollnik B. A large duplication involving the IHH locus mimics acrocallosalsyndrome. **Eur J Hum Genet.** **20**:639-44, 2012.
- Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diament AJ. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. **J Med Genet.** **18**:442-447, 1981.
- Zeitouni B, Boeva V, Janoueix-Lerosey I, Loeillet S, Legoux-né P, Nicolas A, et al. SVDetect: a tool to identify genomic structural variations from paired-end and mate-pair sequencing data. **Bioinformatics** **26**:1895-1896, 2010..
- Zhang CZ, Spektor A, Cornils H, Francis JM, Jackson EK, Liu S, Meyerson M, Pellman D. Chromothripsis from DNA damage in micronuclei. **Nature** **522**:179-84, 2015
- Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. **Trends Genet** **25**:298-307, 2009.
- Zhao X, Ueba T, Christie BR, Barkho B, McConnell MJ, Nakashima K, Lein ES, Eadie BD, Willhoite AR, Muotri AR, Summers RG, Chun J, Lee KF, Gage FH. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. **Proc Natl Acad Sci USA** **100**:6777-6782, 2003.
- Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, Reardon W, Saraiva J, Cabral A, Gohring I, Devriendt K, de Ravel T, Bijlsma EK,

Hennekam RC, Orrico A, Cohen M, Dreweke A, Reis A, Nurnberg P, Rauch A. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromal mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). **Am J Hum Genet** 80:994-1001, 2007.

Recursos da Internet

Children's Hospital Oakland Research Institute, CHORI- <http://www.chori.org>

Database of Genomic Variants, DGV - <http://projects.tcag.ca/variation>

Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl

Resources, DECIPHER - <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher>

Ensembl -<http://www.ensembl.org>

ECR browser - <http://ecrbrowser.dcode.org>

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

VISTA Enhancer Browser: enhancer.lbl.gov

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