Mariana Angelozzi de Oliveira

**Caracterização de rearranjos
cromossômicos em pacientes com
malformações congênitas múltiplas
e/ou retardamento mental (MCA/MR).**

São Paulo

2008

Mariana Angelozzi de Oliveira

**Caracterização de rearranjos
cromossômicos em pacientes com
malformações congênitas múltiplas
e/ou retardamento mental (MCA/MR).**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Biologia/Genética.

Orientadora:

Dra. Célia P. Koiffmann

São Paulo

2008

Oliveira, Mariana Angelozzi

Caracterização de rearranjos cromossômicos em pacientes com malformações congênitas múltiplas e/ou retardamento mental (MCA/MR).

102pp.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Rearranjos Cromossômicos Estruturais. 2. Pontos de Quebra Cromossômicos. 3. Genes Candidatos.

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

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Célia P. Koiffmann

Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da FAPESP concedidos à orientadora e à aluna.

**Dedico essa monografia a meu pai
José, minha mãe Conceição, minha
irmã Denise e meu noivo Adalto,
por toda paciência, força, carinho e
confiança que sempre me deram
para escolher meus caminhos...**

“...Acertarei meus passos, mesmo que tenha que mudar a trajetória dos caminhos...”

“...A vitória não é algo para qualquer um alcançar; ela é um privilégio dos determinados, sensatos e persistentes...”

“...O verdadeiro sábio, é aquele que a cada instante aprende com tudo e com todos...”

“...Nós nos transformamos naquilo que praticamos com frequência. A perfeição, portanto, não é um ato isolado. É um hábito...”

Enlevos da Inspiração

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus agradecimentos àquelas pessoas, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu anjo da guarda, que sempre me iluminou e me fortaleceu nos momentos difíceis.

À Prof^a. Dr^a. Célia P. Koiffmann, minha amiga e orientadora, pela oportunidade, por todos os ensinamentos, confiança, incentivo e paciência.

À FAPESP, que forneceu todo o auxílio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Otto, Chefe do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, pelo espaço e condições oferecidas para a realização deste projeto, além de sempre proporcionar um ambiente de trabalho descontraído.

Aos pacientes e familiares, pela paciência, compreensão e esperança na espera de um resultado. Por todas as informações passadas e pelas lições de vida. Em especial a Cristiane de Campos Fessel, mãe e amiga, que sempre acompanhou de perto este projeto.

As Dras. Chong Ae Kim e Débora Bertola, por encaminharem os pacientes para a realização deste trabalho, pela parte clínica deles e por toda atenção dada durante a realização deste projeto.

A Carla Rosenberg e Ana Cristina Victorino Krepischi dos Santos, que gentilmente cederam todos os clones utilizados neste trabalho, além de todas as dicas e sugestões.

A Prof^a. Dra. Regina C. Mingroni Netto, que participou da minha banca de qualificação, pelas sugestões e pelas excelentes aulas.

A Juliana Forte Mazzeu, que também participou da minha banca de qualificação, pelas valiosas dicas e sugestões, pelas risadas e pela amizade.

A Prof^a. Dra. Angela Morgante, por tudo o que foi ensinado e pelas boas risadas.

A minha amiga Cláudia Castro, por todos os seus ensinamentos e conselhos, tanto da vida profissional quanto da vida pessoal, e pela sua amizade.

Às colegas e amigas do Laboratório: Carla, Cris, Ilana, Ísida, Lucilene (Lú), Mônica, Rose, Estela e Toninha, por tornarem as dificuldades e os obstáculos menores e o dia-a-dia bem mais agradável. Em especial a minha amiga Claudia Fagali, pela sua amizade sincera, por sua determinação e por tudo que conquistamos juntas.

Aos colegas e amigos: Larissa, Fernando, Mara, Lígia, Fátima, Rafaella, Jacaré e Maraísa, por todos os momentos divertidos, pelas risadas e por todos os conselhos. Em especial aos meus queridos amigos Lílian e Luiz ("Pedro"), pela amizade verdadeira, por todas as dicas e ensinamentos que muito contribuíram para o término deste trabalho e por serem pessoas maravilhosas.

Ao meu pai José, por ter me acompanhado sempre com muito carinho, incentivo e paciência e por ser este pai tão especial e presente.

À minha mãe Conceição, por ter me acompanhado sempre, com todos os ensinamentos, paciência, incentivos e por todo carinho que só uma mãe sabe dar. Ao Xavier, pelos conselhos, amizade, pelas boas risadas e por fazer minha mãe feliz.

À minha querida irmã Denise, pela amizade mais sincera que eu já tive, além de toda paciência, incentivo e alegria.

À minha família querida, em especial a minha avó Conceição, por todo carinho, alegria e incentivo.

Ao meu querido Adalto, companheiro pra todos os momentos, por todo carinho, incentivo, por todos os momentos maravilhosos que tivemos juntos e por me fazer feliz sempre.

Aos queridos amigos: Ariana, Joá, Fernandinha, Guilherme (que está quase chegando...), Heidy, Bia, Paula (tão distante e tão presente), Fabrício, Tati, Marco, Felipe, Michele, Caio, Wagner, Priscila, Marcelo e Carol, pela amizade mais bonita que eu já tive, pelas inúmeras risadas, por todo o incentivo e por tornarem minha vida mais alegre.

A todos os outros amigos, que, apesar de não terem sido citados, também contribuíram e foram importantes na trajetória deste trabalho.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Aspectos gerais	1
I.2. Translocações aparentemente equilibrada e o fenótipo alterado	2
I.2.1. Origem das translocações aparentemente equilibradas associadas a um fenótipo alterado	3
I.2.2. O efeito de posição	5
I.3. Tipos de rearranjos cromossômicos	6
I.3.1. Rearranjos intercromossômicos	6
I.3.2. Rearranjos Intracromossômicos	7
I.3.2.1. Deleções intersticiais	10
I.3.2.2. Deleções Terminais	11
I.4. Evolução das técnicas de estudos citogenéticos	14
I.5. Como se formam os rearranjos cromossômicos	17
I. 6. Tipos de mecanismos de origem dos rearranjos cromossômicos	22
I.6.1. Origem e estabilização das deleções terminais	22
I.7. Mecanismos de recombinação	25
I.7.1. Mecanismos de recombinação homóloga	25
I.7.2. Mecanismos de recombinação não-homóloga ou junção de extremidades não homólogas (NHEJ)	29
I.8. Arquitetura genômica e sua relação com os mecanismos de origem das doenças genômicas	31
I.9. Razões para as regiões pericentroméricas e subteloméricas estarem associadas com o mecanismo de transposição de LCRs:	39
I.10. Polimorfismos estruturais no genoma humano poderiam ser mediados por LCRs	39
 II. OBJETIVOS	 44
 III. PACIENTES E MÉTODOS	 45
III.1. PACIENTES	45
III.1.1. Paciente 1	45
III.1.2. Paciente 2	46
III.1.3. Paciente 3	47
III.2. MÉTODOS	49
III.2.1. Análise Citogenética Tradicional	49
III.2.1.1. Cultura de linfócitos	49
III.2.1.2. Análise cromossômica por coloração convencional	50
III.2.1.3 Análise cromossômica por bandamento GTG	50
III.2.2. Análise citogenética molecular	51
III.2.2.1. Análise por Hibridação in situ fluorescente (FISH) – protocolo Vysis®	51
III.2.2.2. Análise por Hibridação in situ fluorescente (FISH) – protocolo Cytocell	52
III.2.2.3. Análise por Hibridação in situ fluorescente (FISH) – protocolo CAMBIO	53
III.2.2.4. Análise por Hibridação in situ fluorescente (FISH) utilizando cosmídeos	54

III.2.3. Extração de DNA	56
III.2.4. Análise por MLPA	56
III.2.4.1. Interpretação dos resultados por MLPA	58
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
IV.1. Paciente 1: 46,XX,dup(20)(p11.22p13)	60
IV.1.1. MAPEAMENTO DOS PONTOS DE QUEBRA	63
IV.2. Paciente 2: 46,XY,t(5;14)(q14.1;q31.3)de novo	75
IV.2.2. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 14	77
IV.2.3. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 5	79
IV.2.4. Os genes localizados nos pontos de quebra	82
IV.3. Paciente 3: 46,XY,t(1;15)(p13.2;q25.2)	86
IV.3.1. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 15	87
IV.3.2. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 1	90
IV.3.3. Os genes presentes nos pontos de quebra e o quadro clínico	93
V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	94
Paciente 1: trissomia 20p	94
Paciente 2: t(5;14)	95
Paciente 3: t(1;15)	96
VI. ABSTRACT	97
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos gerais

Alterações cromossômicas são causa importante de morbidade e mortalidade no homem. Estudos de recém-nascidos consecutivos revelaram que cerca de seis em cada mil recém-nascidos têm uma alteração cromossômica. As alterações mais frequentes são numéricas, mas cerca de cinco recém-nascidos dentre dois mil têm alterações estruturais, sendo um terço delas não equilibradas (Hook e Hamerton, 1977).

Aproximadamente um em cada quinhentos indivíduos é portador de uma translocação aparentemente equilibrada. Embora tais translocações estejam geralmente associadas a fenótipos normais, os portadores têm um risco aumentado de falha reprodutiva e também de ter filhos com rearranjos não equilibrados, devido a uma segregação anormal dos cromossomos envolvidos nos rearranjos (Gajecka, 2006). Estudos de casais com história de abortamento de repetição mostraram que em aproximadamente 4% dos casais um dos membros possuía alteração cromossômica. Entre os casais em tratamento de infertilidade e candidatos a ICSI (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*), rearranjos cromossômicos equilibrados estariam presentes em aproximadamente 4% dos indivíduos (Gekas, 2001).

Muitos rearranjos são considerados “únicos”, pois são encontrados apenas em membros de uma mesma família (Shaffer e Lupski; 2000; Patsalis, 2004; Ciccone, 2005).

I.2. Translocações aparentemente equilibrada e o fenótipo alterado

Embora muitos portadores de translocações equilibradas sejam fenotipicamente normais, têm sido descritas translocações aparentemente equilibradas com anormalidades fenotípicas (Patsalis, 2004; Ciccone, 2005).

Cerca de 7% dos portadores de rearranjos equilibrados apresentam alterações fenotípicas. Estudos de indivíduos com retardo mental e malformações congênitas evidenciaram que as translocações aparentemente equilibradas são mais freqüentes nesse grupo do que na população geral (Tharapel, 1977).

Uma correlação direta entre genótipo e fenótipo é tipicamente assumida e, no caso de translocações não equilibradas, o fenótipo anormal pode ser atribuído a (1) um desequilíbrio de genes sensíveis a dosagem causado por ganho ou perda de um ou ambos os segmentos cromossômicos envolvidos. O efeito da dosagem gênica ocorre quando os rearranjos envolvem grandes fragmentos genômicos abrangendo múltiplos genes estruturalmente intactos com mudanças no seu número de cópias. Conseqüências fenotípicas poderiam resultar do excesso de genes nos rearranjos com duplicação ou da deficiência gênica (haploinsuficiência) nos rearranjos com deleção. Uma pequena fração dos genes é sensível ao efeito de dosagem (Inoue e Lupski, 2002; Patsalis, 2004; Ciccone, 2005). (2) A formação de um novo produto de fusão gênica (Gajecka, 2006).

Famílias nas quais uma translocação aparentemente equilibrada está presente em crianças normais e crianças fenotipicamente anormais, tornam-se um “quebra-cabeças” para os geneticistas. Acredita-se que, se a mesma translocação equilibrada presente nos genitores for encontrada em uma criança

normal e a seguir detectada em um exame pré-natal, não existiria risco aumentado de fenótipo anormal para o feto. No entanto, Fryns *et al*, 1979 descreveram vários defeitos físicos e retardo mental em portadores destas translocações aparentemente equilibradas. Em muitos casos, os mesmos rearranjos poderiam ser apenas coincidência. Entretanto, existem razões para acreditar que na maioria dos casos exista alguma ligação entre o rearranjo e o fenótipo anormal.

I.2.1. Origem das translocações aparentemente equilibradas associadas a um fenótipo alterado

- (1) Rearranjos não-equilibrados associados com duplicações ou deleções crípticas, sendo estas detectáveis apenas por técnicas moleculares (Baptista, 2005).
- (2) Rearranjos sendo equilibrados, mas um ou mais pontos de quebra tendo sido interrompidos ou modulados pela expressão de um gene (Baptista, 2005).
- (3) A associação com um fenótipo anormal sendo ao acaso (Baptista, 2005; Gribble, 2005).
- (4) O “efeito de posição”, alterando a expressão de um gene ou dos genes próximos aos pontos de quebra das translocações (Patsalis, 2004).
- (5) Dissomia uniparental, uma translocação aparentemente equilibrada transmitida por um dos genitores poderia ser equilibrada estruturalmente, mas não equilibrada funcionalmente, isto devido à presença de dois cromossomos homólogos de um mesmo genitor normal; a alteração fenotípica ocorreria se os cromossomos envolvidos

estivessem sujeitos ao “imprinting”. A dissomia uniparental pode ocorrer por não-disjunção meiótica (3:1) no portador de translocação equilibrada e levar à formação de gameta dissômico, com os cromossomos translocados e um dos normais. Esse gameta dissômico após fertilização por gameta normal formará um zigoto com trissomia que poderá ser corrigida pela perda do homólogo normal do outro genitor e, conseqüentemente, o feto terá dissomia uniparental, portando a translocação equilibrada. A outra possibilidade é a fertilização do gameta com dissomia por um gameta nulissômico; a complementação gamética permitiria, assim, a sobrevivência do feto com a dissomia uniparental (Patsalis, 2004).

- (6) Se o mesmo rearranjo fosse encontrado em um dos genitores normais, mais rearranjos poderiam ter ocorrido na meiose, por exemplo, pelo “crossing-over” desigual (Patsalis, 2004).
- (7) Os rearranjos seriam mais complexos do que parecem ser (Patsalis, 2004).

Esses rearranjos complexos (CCRs) constituem alterações cromossômicas raras nas quais há o envolvimento de mais do que dois pontos de quebra localizados em pelo menos dois cromossomos. Muitos deles são relatados como sendo *de novo*. Nestes casos, CCRs envolvem mais pontos de quebra e mais cromossomos do que os observados em casos familiares. CCRs podem ser encontrados em pacientes com anormalidades fenotípicas por causa de cromossomos anormais ou por causa da disrupção de genes nos pontos de quebra (Karmos-Benailly,

2006). Acredita-se que este último evento seja mais comum do que poderia parecer (Patsalis, 2004; Ciccone, 2005).

Mais de 0.6% da população geral tem uma aberração cromossômica não equilibrada. Dependendo do método de diagnóstico usado e da população estudada, aberrações cromossômicas visíveis microscopicamente ocorrem em 4 a 28% de pacientes com retardo mental, fazendo com que as anormalidades cromossômicas sejam a maior causa de retardo mental (Freenstra, I. *et al*; 2005).

1.2.2. O efeito de posição

O efeito de posição é definido como a interferência na expressão gênica devido a uma mudança na posição do gene no cromossomo, não associada à mutação no gene, mas a alteração em sua regulação. A mudança de posição pode interferir na expressão gênica pelo mecanismo de heterocromatização, pela separação de um gene de sua região reguladora ou de um elemento de fronteira, ou ainda, pela justaposição com o promotor de outro gene (Kleinjan e Heyningen, 1998).

A heterocromatização pode ocorrer quando um rearranjo cromossômico posiciona um gene de eucromatina próximo à heterocromatina ou remove um elemento isolante. A organização do DNA na heterocromatina pode avançar para a região eucromática, silenciando o gene vizinho de forma aleatória e variável, porém clonalmente estável. Um dos mecanismos que explicam o efeito de silenciamento de posição está baseado na configuração compartimentalizada que o genoma assume no núcleo. Regiões heterocromáticas são regiões não transcritas, enquanto que as regiões

euromáticas são transcritas. Quando um gene é translocado para uma região heterocromática, ele não é transcrito da mesma maneira (Schade-Bartusiak *et al.*, 2005) (Figura 1).

Figura 1 – Mecanismo de heterocromatização: ocorre quando um rearranjo cromossômico causa a justaposição de um gene de euromatina com heterocromatina. A organização do DNA na heterocromatina se expande e parece avançar na região euromática justaposta, silenciando o gene vizinho de forma aleatória e variável (Kleinjan e Heyningen, 1998).

I.3. Tipos de rearranjos cromossômicos

I.3.1. Rearranjos intercromossômicos

Os rearranjos intercromossômicos envolvem dois cromossomos diferentes e podem ocorrer entre cromossomos não homólogos. Incluem translocações Robertsonianas e translocações recíprocas (Shaffer e Lupski; 2000).

Translocações Robertsonianas (rob) são trocas de braços completos entre os cromossomos acrocêntricos e são encontrados em 1 a cada 1000 indivíduos, sendo os rearranjos cromossômicos recorrentes mais comuns. Embora todas as combinações de cromossomos acrocêntricos participem das translocações Robertsonianas, a ocorrência destas translocações não é ao acaso. Especificamente, rob(13q14q) e rob(14q21q) são as mais comuns,

constituindo mais ou menos 85% de todas as translocações Robertsonianas (Shaffer e Lupski; 2000).

A ocorrência freqüente de rearranjos que afetam os mesmos segmentos cromossômicos há muito levou os citogeneticistas a sugerirem a atuação de mecanismos específicos para sua formação. As translocações Robertsonianas, por exemplo, entre os cromossomos 13 e 21, possuem pontos de quebra situados nos mesmos segmentos cromossômicos em quase todos os casos. Essas translocações resultariam da recombinação entre seqüências semelhantes que estariam invertidas no braço curto do cromossomo 14 em relação às dos braços curtos dos cromossomos 13 e 21. Do mesmo modo, a recorrência da translocação constitucional que afeta os segmentos 11q23 e 22q11.2 sugere a existência de seqüências homólogas nas bandas cromossômicas participantes, que estariam propensas a emparelhar e recombinar de maneira ilegítima (Shaffer e Lupski; 2000).

I.3.2. Rearranjos Intracromossômicos

Rearranjos intracromossômicos parecem envolver um único cromossomo. Estes incluem deleções intersticiais e terminais, duplicações, cromossomos marcadores, inversões e isocromossomos. Alguns rearranjos poderiam envolver um único cromossomo homólogo (troca de cromátides irmãs) enquanto que outros poderiam envolver ambos os cromossomos homólogos (recombinação entre os homólogos) (Shaffer e Lupski; 2000).

Deleções e duplicações intersticiais resultam de trocas dentro de um braço do cromossomo, conservando o telômero original. Deleções intersticiais são responsáveis por várias síndromes genéticas conhecidas (Tabela 1). Na

tabela 2 estão relacionados os tipos de rearranjos cromossômicos e suas frequências (Shaffer e Lupski, 2000).

As tabelas 1 e 2 mostram que, para a maioria dos rearranjos cromossômicos, as taxas de mutações não são conhecidas. No entanto, muitas microdeleções ocorrem *de novo* e, portanto, a incidência na população é aproximadamente a frequência das microdeleções. A melhor estimativa das frequências de mutações tem sido determinada para translocações Robertsonianas e para a duplicação 17p12 que causa a doença de Charcot-Marie tipo 1A (CMT1A). Taxas de mutações para translocações Robertsonianas (rob) foram estimadas pelos estudos de abortos espontâneos ou nascidos vivos, e recém-nascidos com translocações típicas como as identificadas para a Síndrome de Down ou Síndrome de Patau por translocação (Shaffer e Lupski; 2000).

TABELA 1 – Rearranjos cromossômicos mais freqüentes em humanos

Anomalias cromossômicas	Síndrome/doenças	Freqüências estimadas
Deleções intersticiais		
Del(7)(q11.23)	Williams (WS)	1 em 20,000-50,000
Del(8)(q24.1q24.1)	Langer-Giedion	^a
Del(11)(p13p13)	WAGR	1 em 60,000-100,000
Del(15)(q12q12)	Prader-Willi ou Angelman	1 em 20,000
Del(17)(p11.2p11.2)	Smith-Magenis (SMS)	1 em 25,000
Del(17)(p12p12)	HNPP ^c	-
Del(20)(p11.23p11.23)	Alagille	1 em 70,000
Del(22)(q11.2q11.2)	DiGeorge/velocardiofacial	1 em 4,000
Deleções terminais		
Del(1)(p36.3)	Monossomia 1p	1 em 10,000
Del(4)(p16)	Wolf-Hirschhorn	1 em 50,000
Del(5)(p15)	Cri-du-chat	1 em 50,000
Del(16)(p13.3)	Rubinstein-Taybi	1 em 125,000
Del(17)(p13.3)	Miller-Dieker	-
Duplicações intersticiais		
Dup(7)(p12p13)	Russel-Silver	-
Dup(15)(q12q12)	Características variáveis com autismo	-
Dup(17)(p11.2p11.2)	Atraso de desenvolvimento moderado	-
Dup(17)(p12p12)	Charcot-Marie tipo 1A	1 em 2,500
Dup(X)(q22q22)	Pelizaeus-Merzbacher	-

^aIncidências não conhecidas, devido a raridade da anomalia ou pouco conhecimento (Shaffer e Lupski; 2000).

TABELA 2 – Frequência dos rearranjos cromossômicos

Rearranjos	Frequência na população em geral
Translocações Robertsonianas	1 em 1000
Translocações Recíprocas	1 em 625
Cromossomos marcadores	1 em 2000
Deleções terminais	Pelo menos 1 em 5000 ^a
Deleções intersticiais	Pelo menos 1 em 4000 ^b
Duplicações intersticiais	Pelo menos 1 em 4000 ^c

^aA deleção terminal mais comum é a del(1)(p36). A frequência estimada é 1 em 10,000. Pelo menos 50% não foram detectadas por análises cromossômicas iniciais. Então, a frequência poderá ser duas vezes o estimado, ou 1 em 5000.

^bAs deleções intersticiais conhecidas chegam a uma frequência por volta de 1 em 4000. Então, a frequência é de pelo menos 1 em 4000 e poderia atualmente ser mais frequente do que o conhecido.

^cBaseada na frequência estimada de deleções intersticiais e o fato de que muitas duplicações intersticiais poderiam ser recombinações recíprocas dos produtos de deleções (Shaffer e Lupski; 2000).

Sabe-se que perto de 90% dos rearranjos homólogos dos cromossomos 13 e 21, são isocromossomos. De fato, a probabilidade de encontrar uma ROB *de novo* em criança com translocação para a Síndrome de Down ou Patau é mais ou menos 50%. Para a maioria das ROB, a formação das translocações *de novo* ocorrem durante a oogênese (Shaffer e Lupski; 2000). A taxa de mutação para ROB é bem maior do que as frequências das mutações espontâneas geralmente associadas à doenças de um único gene (Shaffer e Lupski; 2000).

I.3.2.1. Deleções intersticiais

Deleções intersticiais têm sido reconhecidas como causadoras de síndromes genéticas (Tabela 1). Para muitas dessas síndromes, a maioria dos pacientes compartilham uma deleção de mesmo tamanho. Estes estudos são consistentes com as hipóteses de que estas deleções originam-se por um

mecanismo comum e que as seqüências de DNA nos pontos de quebra podem estar envolvidas nos rearranjos estruturais (Shaffer e Lupski; 2000).

Deleções de diferentes tamanhos, ou até mesmo deleções únicas raras, podem ser encontradas em pacientes com síndromes de deleção, tais como, Prader-Willi, Angelman e Smith-Magenis (ver tabela 1).

O “crossing-over” desigual entre cromossomos homólogos na meiose, resultando em deleções intersticiais, ocorre tanto na oogênese como na espermatogênese. No entanto, para as deleções que são o resultado de uma troca desigual entre cromátides-irmãs, a maioria (aproximadamente 64%) ocorre no cromossomo derivado paternalmente. O “crossing-over” desigual entre cromossomos homólogos na meiose ocorre nas síndromes de Prader-Willi (PWS), Angelman (AS) e na síndrome de DiGeorge/VCFS, causada por deleções na região proximal do cromossomo 22 (q11.2). Nesta deleção não há diferença no efeito fenotípico se foi derivada maternal ou paternalmente. O oposto acontece em PWS e AS, já que a primeira é causada por uma deleção (15q12) paterna e a segunda por uma deleção materna (Shaffer e Lupski, 2000).

I.3.2.2. Deleções Terminais

Deleções dos segmentos distais de todos os cromossomos têm sido descritas. Porém, algumas deleções terminais ocorrem (ou são descobertas) mais freqüentemente do que outras. Esta preponderância de algumas deleções terminais poderia refletir a viabilidade relativa das monossomias para a região ou poderia refletir uma estrutura genômica básica que é instável ou mais propensa à rearranjos (Shaffer e Lupski; 2000).

Deleções terminais são uma das aberrações estruturais mais comuns identificadas por estudos cromossômicos de rotina e as bandas distais correspondem às regiões genômicas com maior concentração gênica. Além disso, são uma causa importante de retardo mental associado ou não a dismorfismos e/ou malformações congênitas (Rooms, 2007). Deleções terminais são definidas pelos pontos de quebra nas bandas cromossômicas distais que levam à perda de todos os segmentos terminais incluindo as seqüências teloméricas, embora, se assuma a presença de telômero nas extremidades de cromossomos com deleções terminais para a sua estabilidade (Shaffer e Lupski, 2000).

Certas seqüências repetidas associadas ao telômero (TARs) são semelhantes em muitos cromossomos, sugerindo que regiões não homólogas do genoma passem por trocas (Shaffer e Lupski; 2000). As seqüências associadas ao telômero poderiam ser o local de recombinação. As seqüências repetidas associadas ao telômero, semelhantes entre cromossomos não homólogos, poderiam promover o pareamento destas regiões e recombinações proximais poderiam resultar em translocações e deleções. Um resultado não recíproco levaria a cromossomos derivados não equilibrados, os quais, em nível de microscopia óptica, poderiam se parecer a deleções terminais (Shaffer e Lupski; 2000). Portanto, estes cromossomos derivados poderiam representar o produto de recombinação entre seqüências homólogas nos cromossomos não homólogos (Shaffer e Lupski; 2000).

A figura 2 mostra uma visão geral do número de deleções e duplicações por cromossomo. As aberrações estão distribuídas pelo genoma inteiro e incluem os seguintes tipos: deleções, duplicações, cromossomos em anel,

dissomias uniparentais, trissomias, triploidias e tetraploidias. A maioria são deleções ($N = 2296$), seguidas por duplicações ($N = 1773$). Como esperado, alguns cromossomos contêm mais anormalidades (ex. 4, 11, 13, 15, 18, 22) do que outros (ex. 12, 14, 16, 19) (Frenstra, 2005).

Baseados nas revisões bibliográficas de deleções e duplicações de cromossomos humanos que resultaram em pacientes com malformações, Shaffer e Lupski (2000), afirmaram que qualquer região do genoma poderia estar sujeita a rearranjos, mas certas partes do genoma seriam mais susceptíveis do que outras. Porém, algumas duplicações ou deleções nunca foram observadas em algumas regiões do genoma. Estas regiões poderiam conter genes críticos sensíveis à dosagem e sua deleção ou duplicação poderia ser letal. Esta seria uma explicação para um maior número de anormalidades encontradas mais em alguns cromossomos do que em outros.

Figura 2 – Visão geral do número de deleções e duplicações por cromossomo (Freenstra, 2005).

I.4. Evolução das técnicas de estudos citogenéticos

A identificação citogenética de uma anormalidade cromossômica constitucional *de novo* não equilibrada em pacientes é geralmente aceita como causa básica dos fenótipos anormais. Tais doenças são identificadas por estudos de bandamento cromossômico e envolvem deleções ou duplicações visíveis citogeneticamente, permitindo a descrição de uma síndrome causada por muitos genes, que estariam contribuindo para o fenótipo (Gribble, 2005).

A introdução do bandamento cromossômico representou um marco para a citogenética humana, pois tornou possível a identificação de cada cromossomo humano. A partir da observação de alterações no padrão de bandas e a aplicação dessas técnicas ao estudo cromossômico de indivíduos com anomalias congênitas, foi possível identificar duplicações e deleções antes não suspeitadas.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) tem sido de grande importância no estudo de segmentos cromossômicos não identificáveis pelas técnicas de bandamento. A hibridação de bibliotecas de DNA, constituídas de numerosas seqüências clonadas a partir de um cromossomo ou parte dele, permite a pintura cromossômica, procedimento útil no estudo de translocações recíprocas ou na identificação de material cromossômico adicional, cujo padrão de bandas não é suficientemente típico. A detecção de seqüências de cópia única pode ser feita com sondas de DNA clonadas em plasmídeos, cosmídeos, fagos ou YACs. Os avanços na obtenção de mapas físicos do genoma colocaram à

disposição dos pesquisadores um grande número dessas sondas com localização conhecida (Van Ommen *et al.*, 1995; Carter e Vetrie, 2004).

Na hibridação *in situ* fluorescente em preparações de cromatina descondensada, segmentos cromossômicos distantes apenas 1 Kb podem ser visualizados distintamente. Além da ampla aplicação no mapeamento físico de seqüências de DNA, essa técnica tem sido utilizada na detecção de rearranjos diminutos, bem como na caracterização mais precisa de rearranjos cromossômicos de uma forma geral (Van Ommen, 1995).

“Screening” subtelomérico por FISH e por marcadores genéticos resultam na identificação de rearranjos subteloméricos em aproximadamente 5% de pacientes com retardo mental. Técnicas mais avançadas como CGH-array (array-based comparative genomic hybridization), MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), MAPH (multiplex amplifiable probe hybridisation) permitem a detecção de deleções e duplicações intersticiais submicroscópicas, conseqüentemente aumentando o número de aberrações cromossômicas conhecidas (Freenstra, 2005).

Recentemente, o CGH-array usando clones de BAC e PAC tem sido empregado para identificar deleções e duplicações genômicas. Esta tecnologia é mais eficiente do que a de FISH, e poderá ser especialmente útil na identificação de novas doenças genômicas, ou para detectar rearranjos submicroscópicos não visíveis pela análise de rotina dos cromossomos. A tecnologia CGH-array poderá também detectar as possíveis duplicações recíprocas à deleções mais comuns, as quais não foram ainda descobertas pois não há fenótipos descritos (Shaw e Lupski, 2004).

A análise convencional dos cromossomos está limitada na detecção de rearranjos maiores que 2-4 Mb de DNA. Conseqüentemente, anormalidades cromossômicas não equilibradas visíveis citogeneticamente (UBCAs) geralmente envolvem muitos megabases de DNA, e a grande maioria é descoberta por causa do efeito fenotípico e reprodutivo. Muitas estruturas de UBCAs são únicas e o fenótipo associado com um rearranjo não equilibrado poderia estar relacionado a um único indivíduo e a uma idade específica. Como resultado, isto poderia levar anos até que o fenótipo fosse associado a um rearranjo particular e que pudesse ser definido. No entanto, UBCAs, nas quais os pais e a prole possuem as mesmas anormalidades cromossômicas, permitem um acesso ao fenótipo em um ou mais indivíduos, em diferentes idades, bem como, uma oportunidade de analisar se o rearranjo cromossômico é um achado patogênico ou apenas uma coincidência. (Barber, 2005).

Nos anos anteriores ao sequenciamento do genoma, a clonagem de um gene constituía uma tarefa de alta complexidade, levando um longo tempo e exigindo técnicas laboratoriais elaboradas. Hoje, a informação que se tem do genoma disponível em bancos de dados e o avanço tecnológico na automação de diversos procedimentos, tornaram a busca da relação gene único/doença bem menos complexa. Nesse processo, as alterações cromossômicas podem contribuir para a identificação de regiões candidatas.

1.5. Como se formam os rearranjos cromossômicos

Rearranjos cromossômicos constitucionais referem-se àqueles que são herdados de um genitor portador, ou, que ocorram *de novo* nos gametas que resultam no zigoto, enquanto que anormalidades cromossômicas adquiridas

(somáticas) referem-se àquelas que surgem durante o desenvolvimento ou durante a vida de um organismo (Shaffer e Lupski, 2000).

Uma das grandes questões da citogenética atual diz respeito aos mecanismos de formação dos rearranjos cromossômicos. Os avanços técnicos aliados ao conhecimento das seqüências do DNA no genoma, vêm permitindo que os processos moleculares subjacentes à formação de uma alteração estrutural comecem a ser desvendados.

Quebras na dupla fita do DNA são consideradas as lesões primárias na formação de alterações cromossômicas. Essas quebras podem ser induzidas por agentes externos, tais como a radiação ionizante, mas podem também ocorrer como consequência dos processos normais da célula. O que inicia ou estimula a quebra da dupla fita ainda não está claro. Para reparar essa lesão, potencialmente letal, as células eucariontes possuem diversas vias de reparo, que incluem tanto a junção de extremidades quebradas não homólogas (NHEJ) como reparo por recombinação homóloga. Em mamíferos, a cicatrização do DNA ocorre preferencialmente por junção de extremidades não homólogas, sendo comum ocorrerem inserções ou deleções no ponto de quebra quando o reparo é efetuado por essa via. Postulou-se que, ocorrendo mais de uma quebra em uma mesma célula, esse mecanismo de reparo poderia unir extremidades não contíguas, levando a rearranjos estruturais. Durante muito tempo, esse foi o único mecanismo associado à formação desses rearranjos (Fryns *et al*, 1984; Voullarie *et al*, 1987; Cheng *et al*, 1994).

Os estudos dos mecanismos de reparo por recombinação homóloga foram realizados principalmente em leveduras, que se utilizam preferencialmente dessa via de reparo. Entretanto, recentemente verificou-se

que as células de mamíferos também são capazes de reparar seu DNA por recombinação homóloga. Nesse mecanismo um substrato homólogo é utilizado como molde para o reparo, num processo semelhante ao que ocorre na recombinação meiótica. Esta última também se inicia a partir de uma quebra na dupla fita do DNA, mas existem algumas diferenças fundamentais. Enquanto na meiose a recombinação ocorre preferencialmente entre cromossomos homólogos, em células somáticas a cromátide irmã é utilizada como substrato para o reparo. Além disso, na meiose, o processo de reparo da quebra na dupla fita pode resultar tanto em troca entre as cromátides homólogas como em conversão gênica sem *crossing-over*. Em células mitóticas parece haver um direcionamento para esse último mecanismo, evitando-se a ocorrência de *crossing-over*. Tanto na mitose, como na meiose, a recombinação geralmente ocorre entre seqüências alélicas, mas seqüências homólogas ectópicas podem ser eventualmente utilizadas como substratos para o reparo. A utilização dessas seqüências ectópicas associadas à ocorrência de *crossing-over* pode levar à formação de alterações cromossômicas (Haber, 2000; Moens, 2003).

A base molecular deste sistema de reparo da quebra da dupla fita parece altamente conservada, isto pode ser evidenciado porque em bacteriófagos T₄ e em humanos, os mecanismos de recombinação e as moléculas de proteínas envolvidas são as mesmas. Este é um sistema fundamental para manter a estabilidade das fitas de DNA, mas, também, parece ter um papel essencial na patogênese das doenças genômicas (Inoue e Lupski, 2002).

A visão clássica de formação de uma alteração estrutural propõe a aleatoriedade dos pontos de quebra da dupla fita, com junção das

extremidades quebradas não homólogas. Entretanto, diversos estudos indicam, há bastante tempo, a existência de segmentos cromossômicos mais susceptíveis à formação de rearranjos (Lupski, 1998).

Esse desvio da distribuição dos pontos de quebra ao longo do genoma humano pode ser o reflexo de uma estrutura particular do DNA ou da cromatina em certos segmentos cromossômicos, predispondo à ocorrência de quebras e à formação de rearranjos.

Dessa maneira, as alterações cromossômicas estruturais constituem um instrumento para mapear genes relacionados a doenças genéticas, pela associação de um rearranjo a determinado fenótipo.

Os avanços das técnicas moleculares permitiram análises mais detalhadas das alterações cromossômicas estruturais, fornecendo alguns indícios sobre os processos atuantes em sua origem. Os estudos dos segmentos participantes da translocação recorrente t(11;22) constituem um exemplo notável. O ponto de quebra em 22q foi mapeado em um segmento de repetições com baixo número de cópias (*low copy repeats – LCR*) (item 1.7.2), específicas do cromossomo 22 (Dunham *et al*, 1999; Shaikh *et al*, 2000). Essa *LCR* não está totalmente seqüenciada e a natureza repetitiva desse segmento dificulta a determinação precisa do ponto de quebra. Hill *et al* (2000) identificaram repetições *Alu* nos pontos de quebra dos cromossomos 11 e 22 de translocações t(11;22), indicando que o evento de formação desses rearranjos seria mediado por recombinação entre essas seqüências. Os pontos de quebra nos cromossomos derivados da translocação der(11) e der(22) estão distribuídos em segmentos muito pequenos de 32 e 21 pares de base, respectivamente. No cromossomo 22, a seqüência *Alu* está localizada em um

segmento com características de *LCR*, consistente com as observações dos trabalhos anteriores. Por outro lado, Kurahashi *et al* (2000) determinaram, pela análise dos fragmentos de junção dos cromossomos der(11) e der(22) de uma $t(11;22)$, que os pontos de quebra, em ambos os cromossomos, são circundados por seqüências palindrômicas ricas em AT, denominadas *ATRR* (*AT-rich region*). Os autores postulam que essas palíndromes poderiam produzir estruturas de DNA instáveis em 11q23 e 22q11, promovendo a formação da translocação recorrente $t(11;22)$.

Acumulam-se, portanto, evidências moleculares da participação de mecanismos específicos de recombinação, intra ou intercromossômica, promovendo a formação de rearranjos estruturais. A recombinação poderia ocorrer como parte do mecanismo de reparo das quebras. Alternativamente, o emparelhamento meiótico de seqüências parálogas, ou seja, de seqüências com homologia que não se situam nas mesmas regiões dos cromossomos homólogos, poderia levar à formação de alterações cromossômicas por *crossing-over* desigual (Kurahashi, 2000).

Rearranjos cromossômicos constitucionais ocorrem por uma recombinação das seqüências genômicas. É pouco provável que doenças baseadas em recombinação ocorram mais freqüentemente do que doenças baseadas na replicação; erros na replicação são geralmente encontrados e reparados por um complexo sistema de reparo por enzimas. Por outro lado, erros por recombinação, principalmente entre segmentos cromossômicos homólogos, não passam pelo complexo sistema de reparo por enzimas, não sendo detectados portanto como um erro (Shaffer e Lupski; 2000).

Estes rearranjos transmitidos são de dois tipos. Primeiro, existem as UBCAs clássicas, nas quais a cópia do número de genes é reduzida ou aumentada, como acontece nas deleções e duplicações. Segundo, existem as “variantes eucromáticas” (EVs), que geralmente estão relacionadas com duplicações e refletem uma variação do número de cópias de segmentos contendo genes e pseudogenes e são polimórficas na população normal e apenas atingem um nível detectável citogeneticamente quando múltiplas cópias estão presentes. Estas EVs segregam em muitas famílias sem consequências fenotípicas aparentes (Barber, 2005).

I. 6. Tipos de mecanismos de origem dos rearranjos cromossômicos

I.6.1. Origem e estabilização das deleções terminais

As bases moleculares de deleções citogeneticamente definidas como terminais estão associadas a duas questões principais: como são originadas e como são estabilizadas. Mesmo que a origem e a estabilização de deleções terminais não necessariamente representem mecanismos distintos - uma deleção terminal pode ser originada e estabilizada em um único processo como no SPPR (recombinação proximal com pareamento subtelomérico) - é comum supor dois eventos independentes para o possível mecanismo de formação de deleções terminais (Ballif et al., 2003).

Considerando a necessidade de telômero nas extremidades cromossômicas, dois mecanismos podem explicar a estabilização de cromossomos com deleções terminais: (1) síntese *de novo* de repetições teloméricas pela enzima telomerase ou cicatrização telomérica ("telomere healing") e (2) obtenção de seqüências teloméricas por um rearranjo cromossômico ou captura telomérica ("telomere capture") (Figura 3). A captura telomérica envolve a recombinação homóloga (HR) entre extremidades cromossômicas que compartilham identidade de seqüência, acarretando na formação de cromossomos derivados quando o evento ocorre entre cromossomos não homólogos. Outra possibilidade é que deleções citogeneticamente terminais representem deleções intersticiais que retiveram o telômero original intacto ou que se assemelhem a estas pela captura de telômero de uma cromátide irmã ou cromossomo homólogo. A captura pode ser confundida com a cicatrização telomérica quando o rearranjo ocorre muito próximo do telômero resultando em deleções terminais aparentemente puras.

Basicamente, repetições teloméricas puras adicionadas às seqüências únicas intactas indicam cicatrização e repetições teloméricas variantes indicam captura telomérica (Ballif et al., 2003).

Embora os mecanismos envolvidos na origem e/ou estabilização de deleções terminais não estejam bem definidos, pelo menos 4 modelos de captura telomérica são propostos na literatura e geram uma pergunta: os eventos de captura telomérica originam e estabilizam deleções terminais a partir de um cromossomo intacto ou um cromossomo com deleção terminal que é estabilizado pela captura telomérica? Além da recombinação homóloga não-alélica (NAHR) entre LCRs (“low copy repeats”) (item 1.7.2) em regiões terminais não homólogas e do SPPR (recombinação proximal com pareamento subtelo mérico), um terceiro mecanismo de troca intercromossômica pré-meiótica com recombinação meiótica (“meiotic recombination”, MR) gera deleções terminais e as estabiliza simultaneamente em cromossomos derivados. A MR foi sugerida como mecanismo de captura telomérica especificamente de cromossomos com deleções terminais reparados com telômero da extremidade cromossômica oposta de uma cromátide irmã (Ballif et al., 2004). Segundo o modelo, a associação dos telômeros no início da meiose poderia facilitar uma troca entre seqüências próximas do telômero resultando na transposição destas regiões e, subseqüentemente, o pareamento dos homólogos na meiose seguido de um evento de recombinação, na região proximal ao sítio da transposição, originaria cromossomos derivados (Daniel et al., 2003) (Figura 4).

O quarto modelo de captura telomérica por replicação induzida por quebra (“break-induced replication”, BIR) (Figura 4) funciona como uma via de

reparo de DSBs, teoricamente capaz de estabilizar cromossomos com deleções terminais a partir da cópia de seqüências teloméricas de qualquer extremidade cromossômica. A captura telomérica por BIR postula que uma quebra cromossômica pode expor seqüências repetitivas - por estarem presentes no local original do ponto de quebra ou terem sido expostas pela degradação exonucleolítica - capazes de “invadir” cromossomos intactos que apresentem um local de homologia para iniciar sua própria replicação, utilizando como molde as seqüências do cromossomo “invadido” para o reparo da quebra da dupla fita, criando uma translocação não recíproca. A ação deste mecanismo já foi demonstrada em regiões com apenas 0-5 pb de homologia, sendo capaz de copiar centenas de kilobases de DNA e se prolongar às seqüências teloméricas (Ballif et al., 2004).

Da mesma maneira que em outras alterações cromossômicas estruturais, a análise de seqüência dos pontos de quebra de deleções terminais tem sido útil na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na sua formação. Porém, no caso das deleções terminais, atribuir um papel às seqüências identificadas nos pontos de quebra observados pode ser problemático, uma vez que, podem não corresponder ao local original do verdadeiro ponto de quebra porque cromossomos que perderam o telômero estão sujeitos a degradação exonucleolítica antes de adquirirem um novo telômero. Por este motivo os pontos de quebra de deleções terminais são comumente referidos por sítios de junção (Ballif et al., 2003).

As quebras cromossômicas são uma séria ameaça para a sobrevivência da célula. A presença de uma quebra na dupla fita e que não foi reparada, causará um erro na divisão celular e, algumas vezes causará a apoptose

celular. Se mesmo sem ter corrigido a quebra da dupla fita a célula continuar sua divisão, fragmentos cromossômicos poderão não ser segregados e serem degradados, produzindo então as aneuploidias.

I.7. Mecanismos de recombinação

I.7.1. Mecanismos de recombinação homóloga

Os mecanismos de recombinação homóloga são a conversão gênica, a replicação induzida pela quebra e a correção da fita simples (Haber, 2000) (Figura 5).

- Correção da fita simples

Em um processo simples, as regiões complementares das seqüências homólogas que flanqueiam a quebra da dupla fita são expostas, criando uma deleção pelo “annealing” da fita simples (SSA). Isto poderá ocorrer com menos de 30 pb, embora seja muito mais eficiente com 200-400 pb (Haber, 2000) (Figura 5a).

- Conversão gênica

Um processo no qual os finais da fita de DNA, provenientes da quebra da dupla fita, invadem e copiam seqüências de um homólogo (molde) localizado na cromátide irmã, em um cromossomo homólogo ou, em uma localização ectópica, ocorrendo uma transferência de informação genética de um lugar para outro no DNA, sem mudanças na seqüência original. O mecanismo de como isso ocorre ainda não é bem conhecido (Figura 5b).

- Replicação induzida pela quebra (BIR)

Em certas circunstâncias apenas um final da dupla fita poderá ser capaz de se juntar na recombinação homóloga. Seqüências próximas ao centrômero

seriam capazes de encontrar seqüências homólogas em outro lugar do genoma e criar uma translocação não recíproca (Figura 4-III).

Observando o que foi dito acima, a conversão gênica, a replicação induzida pela quebra e a correção da fita simples são eventos que competem entre si. Numa célula diplóide, após a replicação do DNA, uma quebra da dupla fita pode ser reparada também pela cromátide irmã ou de uma seqüência homóloga com localização ectópica ou alélica. Existem evidências de que este mecanismo da troca de cromátides irmãs é fortemente regulado.

A seleção de um molde para a recombinação homóloga é crucial durante a meiose. A recombinação é iniciada pela quebra da dupla fita, mas se o reparo ocorrer entre as cromátides irmãs, não existiria crossing-over inter-homólogo, o qual é essencial para uma adequada segregação cromossômica. Então, células em meiose dispõem de mecanismos que garantem a ocorrência dos eventos de recombinação entre cromátides não-irmãs, aparentemente o oposto do que ocorre nas células em mitose, onde a maioria das quebras ocorre durante a replicação e a escolha mais conservada de um molde é a cromátide irmã. Este processo parece envolver mais componentes, como proteínas específicas da recombinação na meiose e a formação de elementos axiais entre as cromátides irmãs. Mutações em genes que codificam proteínas e que são responsáveis pelo pareamento na divisão celular, predispõe às quebras e trocas de cromátides irmãs (Haber, 2000).

Outra consideração importante com relação ao molde escolhido para o reparo por homologia é a proporção do nosso genoma que consiste de elementos repetitivos. Uma vez que mais de 50% do DNA humano é constituído por seqüências repetitivas, a utilização de seqüências ectópicas

para reparar quebras é um evento muito provável, diante da homologia dessas seqüências (Haber, 2000).

Figura 3: Modelo hipotético da origem pré-meiótica das deleções terminais associadas a duplicações invertidas (Ballif *et al.*, 2003). **(A)** DSB próxima ao telômero em um dos homólogos do cromossomo 1; **(B)** formação da deleção terminal; **(C)** replicação do DNA resultando em duas cromátides irmãs com a mesma deleção terminal; **(D)** a não aquisição da capa telomérica acarreta na degradação exonucleolítica (não representada) e na fusão das pontas expostas; **(E)** durante a anáfase mitótica o novo cromossomo dicêntrico forma uma ponte e é quebrado em um local qualquer. **(F)** ao final da mitose é originada uma célula contendo um cromossomo 1 com a duplicação invertida associada a deleção terminal e **(G)** uma célula com o cromossomo 1 com a deleção terminal pura; **(H e I)** antes da próxima divisão estes cromossomos são estabilizados por regeneração ou captura telomérica; **(J e L)** estes cromossomos são então replicados com a alteração. O ciclo é interrompido até que estas linhagens germinativas precursoras estejam suficientemente maduras para sofrer a meiose e originar gametas normais (1, 2, 1', 2'), gametas portando a duplicação invertida interrompida associada a deleção terminal (3, 4) e gametas com a deleção terminal pura (3', 4').

I.7.2. Mecanismos de recombinação não-homóloga ou junção de extremidades não homólogas (NHEJ)

Nos mecanismos de recombinação não homóloga, as extremidades de DNA são unidas com o emparelhamento de uma ou algumas poucas bases nas junções das fitas quebradas. Em mamíferos, esse tipo de união de extremidades de DNA ocorre de maneira eficiente, freqüentemente criando junções com um a cinco pares de bases de emparelhamento. Esse é um tipo de reparo não-conservador, uma vez que nucleotídeos adjacentes à quebra podem ser perdidos ou adicionados durante a junção das extremidades quebradas. A análise de rearranjos e deleções induzidas sugere que essa recombinação não-homóloga seja uma das vias para a junção de extremidades de DNA quebradas em células somáticas humanas (Moustachi, 2000). Este mecanismo requer a participação de proteínas específicas e de uma ligase especializada (Figura 5c).

Figura 4: Modelos propostos para explicar as bases moleculares dos eventos de captura telomérica na origem e/ou estabilização das deleções terminais (Ballif *et al.*, 2004). A figura ilustra os eventos de captura telomérica que podem ocorrer, utilizando como exemplo a captura entre as seqüências terminais 1p e 1q de cromossomos homólogos. O asterisco indica o rearranjo [der (1)t(1;1)(p36;q44)] que pode ser formado a partir de cada um dos eventos. (I) **NAHR**, mediada por LCRs (blocos laranjas) presentes próximas a 1pter e 1qter, resultando em uma translocação recíproca com pontos de quebra dentro das LCRs; (II) **SPPR**, propiciado pela homologia das regiões TAR (blocos azuis), facilitando a ocorrência de uma permuta desigual proximal entre elementos repetitivos presentes em 1pter e 1qter (bloco laranja e vermelho), resultando em uma translocação recíproca ausente de LCRs nos pontos de quebra; (III) **BIR**, uma DSB gera um cromossomo com deleção terminal, subseqüentemente reparado pela replicação das seqüências do cromossomo “invadido”, a partir de elementos de seqüências repetitivas comuns (bloco laranja e amarelo), resultando em uma translocação não recíproca ausente de LCRs em potencial; (IV) **MR**, uma troca intercromossômica pré-meiótica próxima ao telômero (linhas tracejadas) e subseqüentemente um evento de recombinação meiótica proximal ao sítio da troca (MR) resulta em um cromossomo derivado com deleção terminal e duplicação da extremidade cromossômica oposta.

Figura 5 – Alguns mecanismos de reparo. (A) Correção da fita simples. (B) Conversão gênica e (C) Junção de extremidades não-homólogas (NHEJ).

1.8. Arquitetura genômica e sua relação com os mecanismos de origem das doenças genômicas

O conceito de “doenças genômicas” como proposto e definido em 1998, por Lupski, refere-se às condições que resultam de rearranjos do DNA decorrentes da arquitetura genômica, que contrastam com os mecanismos clássicos de doenças genéticas originadas principalmente por mutações de ponto. Estes rearranjos levam a perda ou ganho de genes sensíveis à dosagem ou a uma ruptura gênica. Estes rearranjos genômicos podem ser responsáveis por algumas características como, por exemplo, cegueira, hipertensão, infertilidade masculina, retardo mental, síndrome do pânico e neuropatia periférica (tabela 3). Tais anormalidades genômicas resultam na maioria das recombinações homólogas não alélicas (NAHR) entre regiões específicas de low-copy repeats (LCRs) ou duplicons. Muitas doenças têm sido atribuídas a rearranjos genômicos, mantendo o conceito de doença genômica e

documentando claramente que NAHR é o mecanismo que ocorre com maior frequência nas doenças humanas (Kriek, 2004). Muitos estudos indicam que as LCRs podem ter uma estrutura complexa, tendo sofrido um aumento em seu número durante a especiação dos primatas, revelando a plasticidade do nosso genoma (Stankiewicz e Lupski, 2002; Stankiewicz, 2003; Shaw e Lupski, 2004).

Tabela 3 – Características fenotípicas que resultam de rearranjos genômicos

Característica	Gene(s)	Localização cromossômica	Rearranjos		Tamanho da LCR (kb)
			Tipo	Tamanho (kb)	
Cegueira	<i>RCP</i> and <i>GCP</i>	Xq28	Del	0	39
Hipertensão	<i>CYP11B1/2</i>	8q21	Dup	45	10
Infertilidade masculina					
<i>AZF_a</i>	<i>DBY, USP9Y</i>	Yq11.2	Del	800	10
<i>AZF_c</i>	<i>RBMY, DAZ?</i>	Yq11.2	Del	3500	229
Retardo mental					
WBS	<i>ELN, GTF21 ?</i>	7q11.23	Del	1600	320
PWS	?	15q12pat	Del	3500	500
AS	<i>UBE3A</i>	15q12mat	Del	3500	500
SMS	?	17p11.2	Del	3700	200
DGS/VCFS	<i>TBX1, ?</i>	22q11.2	Del	3000/1500	225-400
Síndrome do pânico	?	15q24-q26	Dup	?	13-60
Neuropatia periférica					
CMT1A	<i>PMP22</i>	17p12	Dup	1400	24
HNPP	<i>PMP22</i>	17p12	Del	1400	24

Del, deleção; Dup, duplicação (Stankiewicz e Lupski, 2002).

A evolução do genoma dos mamíferos durante a especiação dos primatas, evidencia uma arquitetura genômica única predisposta a alguns

rearranjos do DNA que resultam em doenças genômicas. Muitos dos rearranjos descritos têm sido as deleções; no entanto, o modelo de recombinação recíproca – CMT1A/HNPP; SMS/dup(17)(p11.2p11.2) – sugere duplicações potenciais de cada uma destas deleções (Stankiewicz e Lupski, 2002; Shaw e Lupski, 2004).

A recombinação entre repetições (LCRs) diretas pode causar deleções e/ou duplicações do material genético, enquanto que recombinações entre repetições invertidas resultam em inversões das seqüências genômicas (Lupski, 1998; Stankiewicz, 2003; Shaw e Lupski, 2004) (Figura 6).

Recombinações intercromossômicas ou intercromátides poderiam resultar em uma mudança maior na conformação cromossômica (cromossomos dicêntricos e acêntricos). Pareamento intracromossômico poderia resultar em uma mudança estrutural dos cromossomos. Uma inversão não altera o número de cópias, mas poderá alterar um gene que flanqueia o ponto de quebra das recombinações (Inoue e Lupski, 2002).

Pelo fato das LCRs se constituírem em grandes regiões de seqüências similares/idênticas e fornecerem substrato para a recombinação homóloga, a recombinação homóloga não alélica (NAHR) não seria reconhecida como um erro pela maquinaria celular. Esta seria então uma possível explicação para a alta freqüência de novas mutações nas doenças genômicas (Stankiewicz e Lupski, 2002). LCRs estão localizadas juntas, mas não adjacentes umas as outras; elas estão geralmente separadas por menos do que 10-Mb de seqüência única. Esta observação sugere que a maioria das LCRs não é o produto de “crossing-over” desigual mediado por recombinação homóloga. Um

mecanismo para a formação delas é a transposição (Inoue e Lupski, 2002; Shaw e Lupski, 2004).

LCRs de regiões específicas, também chamadas de duplicações segmentais ou duplicons, consistem geralmente de blocos de DNA de aproximadamente 10-400 Kb com 97% de identidade que se originam por duplicações de segmentos genômicos resultando em regiões parálogas. LCRs podem conter genes, fragmentos de genes, pseudogenes, seqüências retrovirais endogênicas ou outros fragmentos parálogos. Por outro lado, elas podem conter uma série de genes, que em alguns casos representam um “cluster” (agrupamento) de genes repetidos. LCRs diferem de seqüências altamente repetitivas no genoma humano, como por exemplo, seqüências Alu, elementos longos espaçadores (LINEs), retrotransposons e DNA satélites, por se localizarem preferencialmente próximas aos centrômeros e telômeros. O tamanho, orientação e rearranjos relativos das LCRs afetam a arquitetura genômica resultando nas regiões genômicas que são instáveis e propensas a subseqüentes NAHRs. A combinação desta arquitetura genômica particular e NAHR pode resultar em rearranjos cromossômicos incluindo deleções, duplicações, inversões, translocações e cromossomos marcadores, bem como outros rearranjos cromossômicos complexos (Stankiewicz e Lupski; 2002; Stankiewicz, 2003; Shaw e Lupski, 2004).

Estudos moleculares e citogenéticos têm identificado duplicons (LCRs) grandes e complexos nas regiões de pontos de quebra de muitas doenças genômicas. Os rearranjos normalmente possuem muitos megabases e são flanqueados por grandes duplicons que geralmente contém muitos genes e/ou pseudogenes. Múltiplas cópias estão presentes em regiões comuns aos pontos

de quebra, dentro da mesma região cromossômica, já que os duplicons são grandes, possuem alta homologia e múltiplas cópias (Stankiewicz, 2003; Shaw e Lupski, 2004).

Está claro que a presença de duplicons predispõe a um pareamento anormal e a um “crossing-over” desigual, levando a um rearranjo cromossômico em regiões específicas do genoma humano. Pelo menos de 0,7 – 1 por 1000 nascimentos teriam uma doença genômica devido a um rearranjo *de novo* entre os duplicons. Deleções, duplicações, inversões, translocações e cromossomos marcadores poderiam resultar de recombinações homólogas mediadas por duplicons, sugerindo ser este mecanismo um fenômeno geral. A identificação de novos fragmentos de junções em muitos pacientes com CMT1A/HNPP, Síndrome de Williams, Smith Magenis, duplicação 17p11.2, e alguns rearranjos 22q11.2, confirmam a idéia de que eventos de recombinação precisos estão associados com rearranjos envolvendo até mesmo duplicons complexos. Parece que a quebra da dupla fita seria um evento inicial para a recombinação homóloga (Lupski, 1998), embora fosse necessário isolar os pontos de quebra de múltiplos pacientes em cada classe de doença para um modelo mais preciso de um mecanismo de recombinação.

“Hot spots” de recombinação estão geralmente em regiões de seqüências idênticas de nucleotídeos, de pelo menos 200 a 450 pb, embora isso ainda não tenha sido pesquisado em rearranjos envolvendo duplicons complexos. No momento em que as doenças genômicas são estudadas levando-se em conta a distância entre os duplicons, parece haver um aumento do comprimento dos duplicons à medida que a distância entre eles aumenta (Lupski, 1998). Isto poderia ser devido a (1) grandes duplicons com alta

seqüência de identidade poderiam ser necessários para iniciar o pareamento e/ou estabilizar as complexas recombinações e a ocorrência de “crossing-over” e recombinações desiguais. (2) Recombinações são originadas devido a características que poderiam estar presentes dentro de duplicons. Muitos duplicons caracterizados contêm um ou mais genes ou pseudogenes. (3) Em casos nos quais há mais do que dois duplicons na mesma região cromossômica, existem preferências quanto às cópias que estão envolvidas em rearranjos específicos. Ainda são necessários mais estudos para entender a escolha de determinada cópia, mas isto poderia estar relacionado a uma seqüência de identidade, orientação dos duplicons, presença de seqüências promotoras da recombinação ou pode ainda estar relacionado com a estrutura da cromatina (Ji, 2000).

Embora já se saiba bastante a respeito dos mecanismos das doenças genômicas, ainda permanecem algumas questões a serem resolvidas. (1) Alguns rearranjos ocorrem quase que exclusivamente na meiose paterna (duplicação CMT1A e inversão F8), enquanto que outras acontecem igualmente na meiose feminina e masculina, apesar de recombinações normais na meiose serem duas vezes mais freqüente em mulheres do que em homens. Tem sido sugerido que existam fatores masculinos para uma recombinação homóloga anormal, sendo que um desses fatores poderia ser decorrente da proliferação continuada de espermatogônias após a puberdade, a qual poderia levar a uma predisposição maior a eventuais rearranjos estruturais nos espermatozóides. (2) Muitos casos de doenças genômicas são causadas por deleções, enquanto que duplicações e inversões parecem ser menos comuns. Isto poderia ser devido a mecanismos que produzem eventos inter e

intracromossômicos entre repetições diretas. Como as deleções causam um fenótipo mais severo, elas seriam mais descobertas e, portanto seriam mais comuns do que duplicações e inversões. (3) Não se sabe porque muitos destes rearranjos cromossômicos envolvem duplicações perto da região pericentromérica, mas isto poderia ser explicado pela presença dos duplicons, eles podem estar agrupados nestas regiões ou então poderiam estar dispersos nas regiões cromossômicas adjacentes. (4) A frequência e a complexidade dos rearranjos cromossômicos poderiam estar relacionados à “idade” deles (Ji, 2000).

Figura 6 – Recombinação homóloga não alélica (NAHR) entre LCRs de orientação direta (I) e LCRs de orientação invertida (II). Em I-A e I-B a recombinação pode causar uma deleção e uma duplicação do segmento BC. Em I-C a recombinação pode causar uma deleção do segmento BC e um cromossomo acêntrico em anel. Já em II-A e II-C a recombinação pode causar uma inversão do segmento BC, enquanto que em II-B a recombinação pode levar a formação de um cromossomo dicêntrico e outro acêntrico (Stankiewicz e Lupski, 2002).

I.9. Razões para as regiões pericentroméricas e subteloméricas estarem associadas com o mecanismo de transposição de LCRs:

- a) Regiões perto dos centrômeros e telômeros poderiam ter uma maior tolerância para a incorporação de novos materiais genéticos sem efeitos adversos para o organismo.
- b) Seria necessário um tempo maior para deletar segmentos duplicados perto dos centrômeros, por causa da supressão da recombinação nestas regiões do genoma.
- c) A seqüência única, característica das regiões pericentroméricas e subteloméricas, poderia contribuir para a transposição de LCR (Inoue e Lupski, 2002).

Centrômeros e intervalos pericentroméricos do genoma humano ainda permanecem entre os maiores desafios do sequenciamento do Projeto Genoma Humano. O limite entre a heterocromatina centromérica e a eucromatina é significativamente enriquecida (10-dobras) com vários elementos repetitivos. (Stankiewicz, 2003)

I.10. Polimorfismos estruturais no genoma humano poderiam ser mediados por LCRs

Polimorfismos são variações dos componentes genéticos no genoma. Além dos polimorfismos clássicos como as STRs (“simple tandem repeats”), VNTRs (“variable number tandem repeats”) e SNPs (“single nucleotide polymorphisms”), grandes polimorfismos estruturais genômicos têm sido identificados no genoma humano. Tais polimorfismos estruturais podem ser mediados por NAHR entre LCRs. Estas variações polimórficas poderiam não

ter conseqüências fenotípicas, mas poderiam resultar em susceptibilidade a fenótipos relacionados a doenças. Tais variações polimórficas poderiam também predispor o local à ocorrência das doenças genômicas.

Genes “olfactory receptor” (*OR*) incluem um grande número de “clusters” distribuídos através do genoma por eventos de duplicação durante a evolução. Alguns destes “clusters” nas regiões subteloméricas de 3q, 15q e 19p estão presentes como variações polimórficas extremas causadas por duplicações transcromossômicas, sugerindo uma divergência genômica (Inoue e Lupski, 2002).

Estas observações indicam que a instabilidade resultante da arquitetura do genoma pode também estar associada com polimorfismos e rearranjos em larga escala no genoma humano. Dada a abundância das LCRs no genoma humano, ainda existem muitos polimorfismos estruturais para serem identificados (Inoue e Lupski, 2002; Shaw e Lupski, 2004).

A preferência posicional para a troca da dupla fita de DNA vista na NAHR, poderia sugerir a presença de características adicionais da arquitetura nos pontos críticos, os quais fazem a região mais propensa à recombinação. Palíndromes ricas em AT estão localizadas perto de muitos dos pontos críticos sugerindo uma predisposição à quebra da dupla fita (Shaw e Lupski, 2004).

Palíndromes e outras seqüências típicas do genoma, tais como uma trinca de DNA, são capazes de formar estruturas em forma de “grampo de cabelo”, potencialmente expondo o DNA ao aumento da freqüência das quebras espontâneas da dupla fita e subseqüentes rearranjos, como visto nas células de mamíferos e pacientes com X-Frágil ou Síndrome de Jacobsen (Shaw e Lupski, 2004).

Elementos “*cis-acting*” tais como “transposons”, minissatélites e seqüências “chi-like” têm sido identificados próximos aos “hotspots” da CMT1A/HNPP e NF1. Estas seqüências não têm sido relacionadas a eventos de recombinação, embora seja possível que a presença delas também aumente a probabilidade de ocorrer a quebra da dupla fita de DNA (DSBs), as quais devam ser corrigidas pelo mecanismo de reparo. Estas mesmas características da arquitetura genômica poderiam estar associadas à rearranjos provenientes da NHEJ, as quais são iniciadas pela quebra da dupla fita. Embora seqüências nucleotídicas “*cis-acting*” predispõe à recombinações, outra possibilidade para a preferência posicional de “crossing-overs” associados à rearranjos seria devido a estrutura da região da cromatina, a cromatina aberta poderia expor o DNA e causar a quebra da dupla fita originando rearranjos (Shaw e Lupski, 2004).

Finalmente, é possível que fatores ambientais pudessem contribuir para os rearranjos cromossômicos que levam às doenças genômicas. Muitos estudos mostram um aumento na taxa de recombinação homóloga mitótica entre os segmentos de DNA duplicados. Raios-X e outros carcinogênicos aumentam as duplicações em tandem, que são mediadas por recombinações intracromossômicas (Ji, 2000).

O grupo de doenças genômicas tem evoluído para englobar não apenas deleções, duplicações, inversões e translocações, mas também rearranjos somáticos malignos. Os estudos têm mostrado que a maioria dos rearranjos genômicos não são eventos ao acaso, mas de fato representam um erro mecânico inerente à manutenção do genoma através de sua arquitetura complexa. Talvez a mesma flexibilidade do genoma que nos tem permitido

evoluir relativamente rápido, também nos faz a espécie mais susceptível a rearranjos associados às doenças (Shaw e Lupski, 2004).

Mapas físicos têm sido importantes na identificação das características estruturais do genoma e podem indicar regiões mais susceptíveis a rearranjos. O projeto Genoma Humano continuará a desvendar regiões de low-copy repeats, regiões específicas repetidas que poderão estar envolvidas em rearranjos recorrentes. No entanto, seqüências únicas não fornecem um entendimento da complexidade da estrutura genômica. A aplicação de ambos FISH e PFGE (“pulsed field gel electrophoresis”), métodos que permitem investigações das características da arquitetura do genoma tão pequenas para serem visualizadas por técnicas citogenéticas convencionais e tão grandes para serem solucionadas pelo gel de eletroforese convencional ou sequenciamento do DNA, têm sido instrumentos para os estudos dos mecanismos que delineiam os rearranjos cromossômicos (Shaffer e Lupski; 2000; Shaw e Lupski, 2004).

A análise das seqüências presentes nos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos e a determinação do grau de homologia entre elas podem fornecer indicações sobre a contribuição dos diferentes mecanismos de reparo para a formação desses rearranjos.

A associação entre translocações recíprocas equilibradas e doenças genéticas, além de facilitar a identificação de genes para doenças monogênicas e de manifestação precoce, também pode levar à identificação de genes candidatos a doenças complexas, geneticamente heterogêneas ou de manifestação tardia.

Correlações entre rearranjos cromossômicos e manifestações clínicas (correlações genótipo/fenótipo) têm permitido o desenvolvimento de ferramentas úteis para o diagnóstico e provendo informações relevantes para o prognóstico (Shaffer e Lupski; 2000).

II. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi:

- 1) Identificar e caracterizar rearranjos cromossômicos presentes em três pacientes com MCA/MR.
- 2) Relacionar as alterações cromossômicas com o quadro clínico.
- 3) Identificar genes alterados pelo rearranjo e que pudessem estar contribuindo para o quadro clínico associado de cada paciente.
- 4) Fornecer aconselhamento genético aos genitores e familiares.

III. PACIENTES E MÉTODOS

III.1. Pacientes

Três pacientes com malformações múltiplas e/ou retardo mental foram encaminhados ao nosso laboratório, um paciente pelo Instituto da Criança do Hospital das Clínicas (HC) – FMUSP (Dra. Chong A. Kim) e os outros dois foram encaminhados por médicos de outras entidades assistenciais.

Os pacientes encaminhados para análise cromossômica foram avaliados por anamnese genética, na qual constam dados gestacionais, familiares e características fenotípicas. Um termo de consentimento esclarecido foi assinado pelos progenitores ou responsáveis legais, além do trabalho ter sido aceito pela Comissão de Ética Para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os três pacientes foram investigados em relação aos possíveis pontos de quebra dos rearranjos. Dois pacientes foram selecionados por apresentarem translocação *de novo*, enquanto que uma paciente foi selecionada por apresentar uma trissomia parcial da região do braço curto do cromossomo 20, em decorrência de um mosaicismo materno.

III.1.1. Paciente 1

Trissomia do braço curto do cromossomo 20: 46,XX,dup(20)(p11.22p13)

T. F. M, 21 anos, sexo feminino (Figura 7), filha de pais saudáveis e não-consangüíneos, mãe com 23 anos e pai com 22. Mãe referiu dois abortos posteriores. A gestação foi sem intercorrências, parto cesáreo a termo, apresentação pélvica. Apgar 6 e 8. Peso ao nascimento 2960 Kg ($2,5 < p < 10$) e comprimento 49 cm ($2,5 < p < 10$). Sucção presente. Apresentou cianose nas extremidades e hipotonia. Atraso leve de desenvolvimento neuropsicomotor (andou com 1 ano e 6 meses). Antes dos 11 anos, tinha estatura normal para a idade, após menarca, cresceu rápido. Aos 22 anos tinha 1.70 m ($90 < p < 97.5$) e pesava 65 Kg ($90 < p < 97.5$), com PC de 54 cm ($p > 50\%$). Assimetria craniana com fronte alta e larga. Orelhas posteriorizadas. Sobrancelhas ralas, olhos fundos e hipertelorismo. Nariz grande com hipoplasia alar. Macrognatismo e prognatismo. Manchas café com leite no braço esquerdo. Lábio inferior e superior finos, dentes mal implantados. Filtro bem desenhado. Mãos grandes, 19 cm ($p > 97\%$), unhas convexas e retangulares. Pés grandes (calça 41). Dedos longos com hiperextensibilidade das articulações. Operada de hérnias inguinal bilateral e umbilical aos 2 meses. Eco-dopplercardiograma normal. Escoliose cervical, diminuição do espaço cervical entre as vértebras C5-C6 e C6-C7. Tomografia computadorizada da cabeça revelou assimetria craniana, descontinuidade óssea occipital esquerda e hipodensidade occipital direita; ventrículo lateral direito discretamente maior. Eletroencefalograma aos 21 anos normal. Apresenta extremidades e região frontal alongadas. A mãe tem 1.73m de altura e o pai 1.70m. A paciente estudou até o 3º colegial.

Figura 7 – Paciente 1 aos 24 anos.

III.1.2. Paciente 2

Translocação entre o braço longo do cromossomo 5 e o braço longo do cromossomo 14: 46,XY,t(5;14)(q14.1;q31.3)de novo

V. B. S, 5 anos e 8 meses, filho único de pais não-consangüíneos, pai 32 e mãe 31 anos (Figura 8). Pré-natal sem intercorrências, gestação a termo, parto cesárea, apgar 5-8, peso ao nascimento 2600 Kg ($2,5 < p < 10$) e 47 cm ($2,5 < p < 10$) de comprimento. Perímetro cefálico 34 cm ($< p < 2,5$). Ao nascimento mãe observou “olhos diferentes”. Aos 5 anos e 8 meses peso 15 Kg ($2,5 < p < 10$), estatura 102 cm ($< p < 2,5$), PC 50 ($2 < p < 50$). Fácies triangular com fronte ampla e elevada, dolicocefalia, hipoplasia malar. Telecanto, hipertelorismo aparente, estrabismo, coloboma e microftalmia no olho esquerdo e nistagmo; 10 graus de miopia no olho direito. Assimetria facial, filtro labial curto, columela, hipoplasia da asa nasal, ponte nasal deprimida e larga. Mordedura aberta com palato ogival. Orelha proeminente, com hélice pouco rodada. Pectus cariniforme inferiormente. Pescoço normal. Hipotrofia das

panturrilhas, pés planos com sobreposição de pododáctilos, sulco plantar entre halux e demais artelhos. Calcâneo proeminente. Prega transversal única e clinodactilia de quinto dedo em ambas as mãos. Frouxidão ligamentar distal. Apresentou ataxia e convulsão desde 5 meses até 2 anos. Ultrassonografia do abdômen normal. Ecocardiograma normal. Não fala e anda só com apoio.

Figura 8 – Paciente 2 aos 6 anos.

III.1.3. Paciente 3

Translocação entre o braço curto do cromossomo 1 e braço longo do cromossomo 15: 46,XY,t(1;15)(p13.2;q25.2)de novo

J. R. O, 6 anos, sexo masculino, primogênito de pais não-consanguíneos, pai 34 e mãe 27 anos (Figura 9). Segunda filha, dois anos, normal. Ultrassom no 3º mês de gestação detectou aumento nucal. Foi feito estudo cromossômico por amniocentese que revelou cariótipo 46,XY,t(1;15). Nasceu de gestação a termo, o parto foi cesáreo pois o bebê era muito grande, não encaixava, além de ocorrer uma diminuição do líquido amniótico e do bebê estar sentado. Não chorou e não apresentou sucção. Ficou duas horas na incubadora. Pesava 4900 Kg (90%<p<97%), comprimento de 53 cm (p>75%). Teve cianose e icterícia na segunda semana de vida. Tinha choro fraco. Não

apresentou atraso de DNPM, mas apresentou atraso na aquisição da fala (Falou sua primeira frase com 4 anos e meio). Aos 5 anos peso 27 Kg ($p > 90\%$) e 1,15m de altura ($75\% < p < 90\%$). PC = 59 cm ($p > 97\%$). Apresentava dolicocefalia, assimetria craniana, abaulamento frontal com fronte alta e estreita e implantação do cabelo na fronte alta. Tanto a orelha direita quanto a esquerda mediam 5,5 cm ($50\% < p < 75\%$) e eram em abano. Quanto à região ocular apresentava telecanto nos dois olhos com distância intercantal interna medindo 3,5 cm ($p > 97\%$) e externa 10,5 cm ($p > 97\%$). Sinofre, fissuras palpebrais de inclinação antimongolóide. Nariz pequeno com hipoplasia alar. Microstomia e macrognatismo, lábio inferior e superior finos. Filtro alargado pouco desenhado. Pescoço curto, levemente grosso e alado. Mãos direita = 12 cm e esquerda = 12,5 cm ($50\% < p < 75\%$), braquidactilia. Manchas café com leite na região lombar.

Figura 9 – Paciente 3 aos 6 anos.

III.2. MÉTODOS

Realizou-se a análise citogenética tradicional e a molecular utilizando a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Os pontos de quebra dos cromossomos envolvidos nos rearranjos destes pacientes foram analisados por clones de plasmídeos (BACs e PACs), técnica esta que foi introduzida no nosso laboratório. Em um paciente foi também empregada a técnica de MLPA.

III.2.1. Análise Citogenética Tradicional

III.2.1.1. Cultura de linfócitos, segundo método descrito por Moorhead *et al.* (1960) modificado e empregado rotineiramente no laboratório

Para estudo cromossômico foram coletados, de cada paciente e de seus progenitores, 5ml de sangue periférico em seringa esterilizada com paredes heparinizadas.

Para cada paciente foi feito uma cultura de 10 ml. Ao meio de cultura RPMI foram adicionados 20% de soro fetal bovino (CULTILAB), 2% de fitohemoglutamina (GIBCO) e 0,1% de L-glutamina (SIGMA).

Os meios de cultura já com sangue inoculado foram colocados na estufa a 37°C, lá permaneceram por 72 horas. Pouco antes de completar este período adicionou-se 200 µl de colchicina ao meio de cultura e os meios permaneceram na estufa por mais 45 minutos.

Ao término deste período, o conteúdo dos vidros (meio e linfócitos) foi transferido para tubos e centrifugados durante 5 minutos a 1500 rpm.

Depois de desprezar todo o sobrenadante foi adicionado 7 ml de solução hipotônica em cada tubo dando um intervalo de 30 minutos, ressuspensando de vez em quando.

Após o intervalo, adicionou-se 2 ml de fixador em cada tubo. O fixador é preparado com três partes de metanol para uma parte de ácido acético. O material foi ressuspensado e centrifugado, novamente, por 5 minutos na mesma rotação.

Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 5 ml de fixador, ressuspensou-se o material e centrifugou-se, novamente, por 5 minutos na mesma rotação. Este último processo foi realizado mais duas vezes, portanto, ocorreram três etapas de lavagem.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, pingou-se o material em lâminas molhadas e geladas, previamente colocadas sobre o banho-maria.

III.2.1.2. Análise cromossômica por coloração convencional

Para análise convencional as lâminas foram coradas com Giemsa. Para coloração colocou-se uma solução tampão fosfato Sorensen (Na_2HPO_4 0,03M e NaH_2PO_4 0,03M) sobre a lâmina e corante Giemsa a 4% por cinco minutos e foram observadas em microscópio óptico. Onze metáfases de cada um dos pacientes e de seus genitores foram analisadas.

III.2.1.3 Análise cromossômica por bandamento GTG

A técnica de bandamento GTG foi utilizada para a identificação dos cromossomos. As lâminas foram envelhecidas uma semana e então colocadas

na estufa a 37° C durante a noite. Foram então encubadas em 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,03M) por 5 minutos a 65°C. Em seguida, foram lavadas em 2xSSC à temperatura ambiente, em água destilada e tratadas com uma solução de tripsina 0.025% em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 0,03M e KH₂PO₄ 0,03M) pH 6,8 à temperatura ambiente por tempo variável de 6 a 12 segundos. Posteriormente foram lavadas em água destilada e coradas com solução Giensa a 4% em tampão fosfato por 10 minutos.

As metáfases com boa dispersão cromossômica foram selecionadas em estudo microscópico e análise computadorizada pelo programa Ikaros Metasystem por captação das imagens através de câmera de vídeo.

III.2.2. Análise citogenética molecular

III.2.2.1. Análise por Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) – protocolo Vysis®

As lâminas foram preparadas com um dia de antecedência e deixadas ao ar livre.

As lâminas ficaram em 2XSSC a 37 °C por 10 minutos. Nestes dez minutos foram aliquotados 7 µl do tampão de hibridação, 1 µl de sonda e 2 µl de água Mili-Q em um eppendorf (Obs: para as hibridações duplas foram adicionados 1 µl de cada sonda).

As lâminas ficaram em PBS por 5 minutos à temperatura ambiente e depois foram desidratadas em etanol 70%, 85% e 100%, por 1 minuto cada. Depois de secas, aplicou-se então a mistura da sonda na lâmina e cobriu-se

com lamínula. A lâmina foi colocada em placa aquecida a 75 °C por 5 minutos para a co-denaturação da sonda.

A lâmina foi incubada overnight (16 horas) a 37 °C em câmara úmida.

Numa segunda etapa, as lâminas foram lavadas em 0,4XSSC/0,3%NP-40 por 2 minutos e 2XSSC/0,1%NP-40 por 1 minuto à temperatura ambiente. 10 µl de DAPI foram aplicados e cobriu-se com lamínula. Cuidadosamente a lamínula foi pressionada contra a lâmina para retirar o excesso de corante.

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 motorizado (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As metáfases foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera de alta resolução e do programa ISIS Metasystem. Para cada paciente foram analisadas, no mínimo, 30 metáfases.

III.2.2.2. Análise por Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) – protocolo Cytocell

Após a preparação das lâminas com um dia de antecedência, o material foi tratado em 2XSSC à temperatura ambiente por 2 minutos e desidratação em banhos de etanol.

A sonda foi aplicada sobre a lâmina e recoberta com lamínula para posterior co-denaturação em placa aquecida a 75 °C por 2 minutos, incubando-se a lâmina overnight (16 horas) a 37 °C em câmara úmida.

As lâminas foram lavadas em 0,4XSSC por 2 minutos e em 2XSSC/0,05% Tween-20 por 30 segundos, deixando secar no escuro.

Foram adicionados 10 µl de DAPI na lâmina e cobriu-se com uma lamínula. A lamínula foi pressionada cuidadosamente contra a lâmina para retirar o excesso de corante.

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 motorizado (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As metáfases foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera de alta resolução e do programa ISIS Metasystem. Para cada paciente foram analisadas, no mínimo, 30 metáfases.

III.2.2.3. Análise por Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) – protocolo CAMBIO

As lâminas foram preparadas com um dia de antecedência e deixadas ao ar livre. Para a desnaturação da sonda, foram misturados 3µl da sonda comercial e 7µl do tampão de hibridação (fornecido pela CAMBIO). Esta mistura de sonda e tampão foi deixada no banho a 70°C por 5 minutos. Logo em seguida a mistura foi colocada no banho à 37°C por 15 minutos.

Para a desnaturação dos cromossomos, a lâmina foi imersa em formamida 70% e 2xSSC 30% por 2 minutos à 70°C. Logo em seguida a lâmina foi desidratada em etanol 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada, à temperatura ambiente. A sonda desnaturada foi aplicada sobre a lâmina, recoberta com lamínula e mantida em câmara úmida numa estufa à 37°C por 16 horas (*overnight*).

Para a lavagem da lâmina, seguiram-se três banhos de formamida 50% e 2xSSC 50% à 37°C, de 5 minutos cada. Em seguida a lâmina foi imersa em três soluções de 4xSSC/0.05% Tween-20 por 2 minutos cada à

temperatura ambiente. Para a marcação da sonda, 100µl da Avidina Fluoresceína foi aplicada sobre a lâmina, que foi coberta com parafilm. A incubação foi realizada em câmara úmida, no escuro, à temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente a lâmina foi imersa em três soluções de 4xSSC/0.05% Tween-20 por 2 minutos cada à temperatura ambiente. Em seguida foi imersa em 4xSSC à temperatura ambiente por 2 minutos. Ainda para a marcação da sonda, 50µl da Anti-Avidina Fluoresceína foi aplicada sobre a lâmina, que foi coberta com parafilm. A incubação foi realizada em câmara úmida, no escuro, à temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente a lâmina foi imersa em três soluções de 4xSSC/0.05% Tween-20 por 2 minutos cada à temperatura ambiente. Em seguida foi imersa em 4xSSC à temperatura ambiente por 2 minutos. Os cromossomos foram corados com 15µl de DAPI e a lâmina foi coberta com lamínula de vidro.

A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 motorizado (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As metáfases foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera de alta resolução e do programa ISIS Metasystem. Para cada paciente foram analisadas, no mínimo, 30 metáfases.

III.2.2.4. Análise por Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) utilizando cosmídeos

A hibridação *in situ* fluorescente foi utilizada para o mapeamento dos pontos de quebra das translocações. Foram utilizados, como sondas, segmentos cromossômicos clonados em cromossomos artificiais de bactérias (BAC), mapeados nas regiões cromossômicas de interesse. Os clones foram

selecionados nos mapas obtidos dos bancos de dados *Ensembl Genome Browser* e *University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics* (UCSC). Os BACs foram gentilmente cedidos pelas Dras. Carla Rosemberg e Ana Cristina Kreprich, do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo.

As linhagens bacterianas foram plaqueadas em meio de cultura LB-ágar com o antibiótico específico para a seleção das bactérias resistentes que continham os BAC. Após crescimento por um dia em estufa a 37°C, as colônias foram amplificadas em meio TYB, em agitador com temperatura constante de 37°C *overnight*. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo CHORI, com substituição do último passo por 30 minutos em banho a 37°C.

As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina ou digoxigenina pela incorporação dos nucleotídeos Bio-16-dUTP ou Dig-11-dUTP, utilizando-se os *Kits Biotin-Nick Translation Mix* (Roche, Indianápolis, EUA) ou *Dig-Nick Translation Mix* (Roche), respectivamente, conforme instruções do fabricante. As sondas foram submetidas à supressão de seqüências repetitivas pela adição de DNA humano *COT-1* (Invitrogen), em concentração 10 a 15 vezes maior que a da sonda. As sondas foram ressuspensas em cerca de 20 µl de meio de hibridação, que consiste de formamida 50% e dextran sulfato a 10%, em 2xSSC e desnaturadas a 100°C por 10 minutos. Para a desnaturação dos cromossomos, utilizou-se formamida 70% em 2xSSC por 2 minutos a 70°C – 75°C. A sonda foi aplicada sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida em estufa a 37°C por 2-3 dias. Seguiram-se dois banhos de 50% formamida em 2xSSC, de

um minuto, um banho de 2xSSC a 37°C, de cerca de 3 minutos, e um banho de 5 minutos de PBT (PBS acrescido de 0,1% Tween 20 e 0,15% BSA-Sigma) à temperatura ambiente. Para a imunocoloração, no caso de sonda marcada com biotina, utilizou-se avidina conjugada a FITC (1:50 em PBT). Para as sondas marcadas com digoxigenina, utilizou-se a anti-digoxigenina conjugada a rodamina (1:100 em PBT). A incubação foi realizada em câmara úmida, no escuro, em estufa a 37°C por 45 minutos. Após dois banhos de PBT de 5 minutos cada à temperatura ambiente, as lâminas foram montadas em Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, EUA), contendo o corante DAPI (Sigma; 0,8 ng/μl). Os cromossomos foram corados com DAPI. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 motorizado (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As metáfases foram capturadas com o auxílio de uma vídeo-câmera de alta resolução e do programa ISIS Metasystem. Para cada paciente foram analisadas, no mínimo, 30 metáfases.

III.2.3. Extração de DNA

O DNA genômico dos pacientes e dos genitores foi extraído pelo Kit Autopure LS (Gentra Systems) a partir de leucócitos do sangue periférico.

III.2.4. Análise por MLPA

A MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) é uma técnica descrita por Schouten, *et al*, (2002) que permite a identificação de deleções e duplicações a partir de sondas de seqüências alvos, que são hibridadas no DNA genômico.

A análise por MLPA é feita a partir do Kit contendo sondas para as regiões subteloméricas.

O protocolo para MLPA é dividido em dois dias. No primeiro dia, o DNA é quantificado e diluído para 50ng/μl em volume total de 50 ou 25 μl com TE. Após a diluição adiciona-se 5 μl deste DNA em eppendorf de 0,2 ml. Os eppendorfs são colocados no termociclador no programa MLPA-Den (98°C por 5 minutos, 25°C “for ever”). Enquanto o DNA está na máquina é preparada a solução de anelamento (1,5 μl probe mix, 1,5 μl de Buffer para cada reação). Quando o programa MLPA-Den termina, retira-se o DNA da máquina, adiciona-se 3 μl de solução de anelamento em cada “eppendorf” e volta para a máquina no programa MLPA-Ann (95°C por 1 minuto e 60°C “for ever”). Deixar overnight (por 16 horas).

No segundo dia, a solução Máster Mix (3 μl de ligase Buffer A, 3μl de ligase Buffer B, 25 μl de água mili-Q e 1μl de ligase para cada reação) é preparada. A ligase só é acrescentada na hora de adicionar a solução aos eppendorfs. Completada as 16 horas no programa MLPA-Ann ligar o “instant incubation” à 54°C. Acrescentar a ligase ao Máster Mix e com os eppendorfs ainda na máquina adicionar 32 μl da solução. Ligar o programa de PCR MLPA-Lig (54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos, 4° “forever”). Neste intervalo, preparar a solução Máster Mix I (4 μl PCR Buffer e 26 μl água milli-Q para cada reação) e acrescentar 30 μl desta solução em eppendorfs novos. Preparar também a solução Máster Mix II (2μl enzyme dilution Buffer, 2 μl Primer, 5,5 μl água mili-Q, 0,5 μl Taq polimerase para cada reação), a Taq só será adicionada quando acrescentarmos a solução Máster Mix II às reações.

Terminado o programa MLPA-Lig, retira-se os eppendorfs da máquina e adiciona-se 10 µl desta reação nos eppendorfs novos com a solução Máster Mix I. Esses novos tubos são colocados na máquina em “isntant incubation” à 60°C. Acrescenta-se a enzima Taq polimerase à solução Máster Mix II e acrescenta-se 10 µl desta solução às reações que estão na máquina. Ligar o programa MLPA-PCR (95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto – 32 ciclos – 4°C “for ever”). Depois de completado, retirar os “eppendorfs” da máquina e diluir 1µl de cada reação com 0,25 µl de Size Standart e 7 µl de “louding solution”. Essas diluições então são submetidas a eletroforese em um seqüenciador e os resultados armazenados em um banco de dados no computador.

III.2.4.1. Interpretação dos resultados por MLPA

Os resultados são obtidos por picos de fluorescência analisados a partir do programa Fragment. Cada pico corresponde ao quociente de dosagem (DQ) de cada sonda amplificada. A interpretação dos picos se dá pela comparação dos tamanhos dos picos dos pacientes com os picos dos indivíduos controles. Se os picos forem do mesmo tamanho entre o paciente e o controle significa que DQ normal, ou seja, o paciente não tem a deleção. Se o pico do paciente tiver aproximadamente metade do tamanho do pico controle, então este paciente tem uma deleção desta seqüência alvo. Mas se o pico do paciente for maior, então ele apresenta uma duplicação desta sonda.

Para melhor confiabilidade dos resultados foi desenvolvido um programa para análise de MLPA criado em Excel (NGRL, Manchester Analysis Sheets). Este programa utiliza a média obtida do quociente de dosagem de cada

produto da amplificação. Um DQ normal representa o indivíduo diplóide ($2n$) e tem o valor próximo a 1. Deste modo, a presença de duas cópias da sequência alvo da sonda no DNA genômico pode variar de aproximadamente 0,85 a 1,15. Se a sequência estiver com apenas uma cópia (haplóide) a variação é de aproximadamente 0,35 a 0,65 e três cópias da sequência alvo o DQ normal é aumentado em uma vez e meia e a variação é de cerca de 1,35 a 1,65.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Paciente 1: 46,XX,dup(20)(p11.22p13)

A análise por citogenética tradicional revelou que a paciente apresenta um cromossomo 20 com morfologia alterada. (Figura 10).

O cariótipo do pai foi normal, enquanto que no da mãe um dos cromossomos 20 apresentou morfologia alterada, similar à observada na paciente, só que em mosaicismo.

Para a identificação do material extra presente no braço curto do cromossomo 20, procedeu-se à hibridação *in situ* fluorescente (FISH), com a sonda da Cytocell, WCP 20, confirmando que o material extra era só do cromossomo 20. Nenhuma marcação adicional foi observada (Figura 11).

A sonda do braço curto do cromossomo 20 (Cambio), foi hibridada e revelou que a duplicação era do braço curto (Figura 12).

Para afastar outras possíveis alterações cromossômicas, foi utilizada a técnica por MLPA, utilizando sondas subteloméricas (Kit Salsa P036). Somente a duplicação da região do braço curto do cromossomo 20 foi observada (Figura 13).

Figura 10 – Cromossomo 20 com segmento duplicado, evidenciado pelo bandamento GTG.

Figura 11 – Identificação da duplicação do cromossomo 20. A seta indica o cromossomo 20 com duplicação da sonda WCP 20 (Cytocell)

Figura 12: FISH do braço curto do cromossomo 20 (Cambio), a seta evidencia que a região duplicada é a do braço curto do cromossomo 20.

Figura 13 – MLPA, o gráfico acima (A) mostra um paciente controle, enquanto que o gráfico abaixo (B) se refere à nossa paciente. O pico marcado em rosa evidencia a duplicação da região subtelomérica do braço curto do cromossomo 20.

IV.1.1. MAPEAMENTO DOS PONTOS DE QUEBRA

Os cromossomos artificiais de bactérias (BAC) e de plasmídeos (PAC) foram selecionados no banco de dados Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>).

Iniciamos o mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 20 na banda 20p12.2, utilizando o clone RP11-204H22 (BAC). Posteriormente utilizamos os clones RP11-104O6 (BAC), RP5-852M4 (PAC), RP1-167O22 (PAC), RP5-1096J16 (PAC), RP11-504H3 (BAC), RP5-1025A1 (PAC), RP4-788L20 (PAC) e RP1-234M6 (PAC); localizados respectivamente em 20p12.1, 20p13, 20p11.22, 20p11.23, 20p11.23, 20p11.21, 20p11.21 e 20p11.21 (Figura 14). Todas as sondas estavam duplicadas no cromossomo alterado, exceto a RP5-1025A1, localizada em 20p11.21 (Figura 14 e 15).

Nossa paciente apresentou uma duplicação direta do braço curto do cromossomo 20 (p11.22p13) (Figura 16) em decorrência de mosaicismo materno.

Figura 14 – Ideograma do cromossomo 20 mostrando a localização das sondas utilizadas. Todas as sondas representadas em preto encontram-se duplicadas no braço curto do cromossomo 20, enquanto que a sonda representada em vermelho é a única que não se encontra duplicada.

Figura 15 – FISH utilizando as sondas do braço curto do cromossomo 20: A) RP5-852M4 (20p13). B) RP11-204H22 (20p12.2). C) RP11-104O6 (20p12.1). D) RP11-504H3 (20p11.23). E) RP5-1096J16 (20p11.23). F) RP4-788L20 (20p11.21). G) RP1-234M6 (20p11.21). H) RP5-1025A1 (20p11.21).

Figura 16: Esquema do cromossomo 20 normal e do cromossomo 20 com a duplicação direta do braço curto.

A TRISSOMIA 20p E O QUADRO CLÍNICO

A trissomia parcial do braço curto do cromossomo 20 é uma anomalia cromossômica rara. As principais características são atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, dismorfismo facial com fácies arredondada e bochechas proeminentes, anomalias vertebrais e anomalias nos dentes. A duplicação 20p tem manifestações clínicas variáveis e que não permitem uma precisa delineação de uma síndrome característica.

Aproximadamente 37 casos de trissomia do braço curto do cromossomo 20 foram descritos (Centerwall *et al.*, 1976; Funderburk *et al.*, 1983; Oppenheimer *et al.*, 2000; Molina-Gomes *et al.*, 2006), sendo a maior parte herdada (Centerwall e Francke, 1977; Funderburk, 1983; Lurie, 1985). Quatro casos foram derivados de inversões (Bown *et al.*, 1986; Voullaire *et al.*, 1999; Ardalan *et al.*, 2005; Molina-Gomes *et al.*, 2006) e um caso de dissomia uniparental paterna em mosaicismo (Venditti *et al.*, 2004) (Tabela 4).

Todos os casos foram diagnosticados no período pós-natal, exceto o de um menino com anencefalia e outro de um feto masculino que na vigésima semana de vida foi diagnosticado, por amniocentese, com uma duplicação do segmento 20pter→20p11.2 e uma monossomia parcial do segmento 20q13.3→qter (Molina-Gomes *et al.*, 2006).

Le Chien *et al.* (1994), descreveram uma trissomia 20p *de novo*; a paciente apresentou crescimento normal, mas atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, face redonda com bochechas proeminentes, micrognatia, narinas antevertidas, e hipertelorismo. As características fenotípicas da paciente estão relacionadas com as de outros pacientes descritos na literatura, com trissomia 20p (Tabela 5 e 6).

Tümer *et al*, 1995, descreveram um menino com trissomia 20p resultante de translocação paterna aparentemente equilibrada entre os cromossomos 18 e 20. O paciente apresentava dismorfismo craniofacial, orelhas com implantação baixa, micrognatia, narinas antevertidas, pescoço curto, mão grandes com braquidactilia, atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia.

Oppenheimer *et al*, 2000, descreveram um tio e uma sobrinha com trissomia 20p decorrente de translocação $t(12;20)(p13.3;p11.1)$. Ambos apresentaram atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, face redonda com bochechas proeminentes, hipertelorismo, narinas antevertidas, anomalias vertebrais e dentais, pouca coordenação motora e deficiência na fala, características estas descritas anteriormente em pacientes com trissomia 20p.

A maior parte dos casos de trissomia 20p também contam com a monossomia parcial de outro cromossomo (3p; 12q; 11q; 5p; 22q; 14q; 21q; 18p; 12p; 4p; 18p; 14p) (Tabela 4).

A nossa paciente apresenta uma trissomia do braço curto do cromossomo 20 [46,XX,dup(20)(p11.22p13) herdada da mãe. A mãe, sem alterações fenotípicas aparentes, apresentou células normais e células com a duplicação parcial de 20p (mosaicismo) em linfócitos. O mosaicismo cromossômico na mãe deve estar presente em pelo menos dois tipos de células, linfócitos e gametas.

Pelo fato da análise citogenética e molecular mostrar que a nossa paciente apresenta uma trissomia 20p pura, as características fenotípicas são de grande importância para ajudar a delinear a síndrome. Apenas três casos considerados de trissomia 20p pura foram descritos na literatura (Le Chien *et*

al., 1994; Sidwell *et al.*, 2000; Ravel *et al.*, 2003) (Tabela 5). De fato, nossa paciente compartilha muitas similaridades com os pacientes descritos com trissomia 20p (Tabela 4 e 5), atraso DNPM, hipertelorismo, face arredondada com bochechas proeminentes, coordenação motora pobre, anomalias vertebrais e dentárias e assimetria craniana com fronte alta e larga (Tabela 6). Apresentou também dificuldade de aprendizado, distúrbio de comportamento e crescimento acelerado após menarca, altura atual de 1.70 m ($90 < p < 97.5$) embora a altura da mãe seja de 1.73m de altura e a do pai 1.70m.

Três genes estão localizados no segmento que está duplicado (20p11.2-13), o primeiro deles é o gene do receptor 4 de somatostatina (*SSTR4*). A somatostatina está distribuída pelo corpo e é importante reguladora do sistema endócrino e nervoso, inibindo a secreção do hormônio de crescimento (Faivre *et al.*, 2000). A associação do crescimento acelerado após menarca com a duplicação do gene *SSTR4* sugere que o fenótipo observado na nossa paciente poderia estar relacionado a um efeito de dose deste gene. O segundo gene presente neste segmento é o *BMP2* que codifica uma proteína morfogenética do osso e que tem uma função direta com o sistema nervoso, já que o sistema nervoso autônomo parassimpático e simpático possuem uma alta concentração de *BMP2*. O terceiro gene encontrado na região cromossômica duplicada é o *GHRH* que codifica proteínas relacionadas com o hormônio de crescimento. A hipersecreção deste hormônio está relacionada com gigantismo observado em crianças (Zimmerman *et al.*, 1993). Assim como o primeiro gene, o efeito de dose dos outros dois também poderia estar relacionado com o fenótipo da paciente.

Não se tem ainda um fenótipo característico associado com a trissomia 20p, isto porque dentre os casos descritos, ocorre uma variabilidade nos pontos de quebra e na quantidade de material duplicado do braço curto do cromossomo 20 e, nos casos de translocação, pequenas regiões deletadas nos cromossomos envolvidos poderiam estar contribuindo para o fenótipo.

As principais características a serem consideradas para a suspeita clínica da síndrome de trissomia 20p são fáceis típica, isto é, arredondada com bochechas proeminentes, fronte alta e larga, assimetria craniana, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, dificuldades na coordenação motora, deficiência de aprendizado, distúrbios de comportamento, anomalias vertebrais e crescimento acelerado após puberdade.

Tabela 4: Principais características fenotípicas descritas para a trissomia 20p

Casos Referência	Translocação parental aparentemente equilibrada	Peso ao nascimento (Kg)	ADNPM	Coordenação motora pobre	Face arredondada com bochechas proeminentes	Fissuras palpebrais antevertidas	Anormalias dentárias	Anormalias vertebrais	Hipertelorismo
1-13: Centerwall e Francke (1977)*	13/13	2,100 – 4,300	12/12	8/9	8/13	8/12	8/9	9/10	6/9
14: Archidiacono <i>et al.</i> (1979)	t(3;20)(p27;p11)mat	2,750	+	+	+	+	+	+	+
15: Marcus <i>et al.</i> (1979)	t(12;20)(q24.5;q11)pat	2,640	0	0	+	-	0	-	-
16: Rudd <i>et al.</i> (1979)	-	2,553	+	0	+	+	0	-	+
17: Schinzel (1980)	t(13;20)(p11;q11)mat	2,500	+	+	+	+	0	-	-
18: Delicado <i>et al.</i> (1981)	t(11;20)(q35;q11)mat	3,300	+	0	+	+	0	0	+
19: Funderburk <i>et al.</i> (1983)	t(5;20)(p15;p11)pat	3,740	+	0	+	+	-	+	-
20: Chen <i>et al.</i> (1983)	t(20;22)(p11;q11)mat	3,250	+	+	+	+	0	+	-
21: Balestrazzi <i>et al.</i> (1984)	t(20;22)(p11;p11) <i>de novo</i>	3,050	+	+	+	+	-	+	+
22: Lurie <i>et al.</i> (1985)	t(14;20)(q32.3;p11.1)pat	2,300	+	+	+	+	0	0	-
23: Bown <i>et al.</i> (1986)	-	0	+	0	+	+	0	0	0
24: Grammatico <i>et al.</i> (1991)**	2/2-t(20;21)(p11;q22)mat	2,800/4,000	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
25: Tümer <i>et al.</i> 1995	t(18;20)(p10;q10)pat	3,500	0	0	+	-	0	0	0
26: Voullaire <i>et al.</i> (1999)	-	0	+	0	0	0	0	0	0
27: Oppenheimer <i>et al.</i> (2000)**	2/2-t(12;20)(p13.3;p11.1)pat	2,200/3,000	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

Continuação da Tabela 4...

Casos Referência	Translocação parental aparentemente equilibrada	Peso ao nascimento (Kg)	ADNPM	Coordenação motora pobre	Face arredondada com bochechas proeminentes	Fissuras palpebrais antevertidas	Anormalias dentárias	Anormalias vertebrais	Hipertelorismo
28: Faivre <i>et al.</i> (2000)	-	3,900	-	0	+	-	+	-	0
29: Wieczorek <i>et al.</i> (2003)	t(18;20)(p11.2;p12.3)pat	2,510	+	0	+	-	+	0	+
30: Thomas <i>et al.</i> (2004)	t(14;20)(p13.3;p12.2)mat	2,335	0	0	0	0	0	0	0
31: Venditti <i>et al.</i> (2004)	-	2,500	+	0	+	-	0	0	0
32: Ardalan <i>et al.</i> (2005)	-	2,500	+	0	+	0	0	0	0
33: Molina-Gomes <i>et al.</i> (2006)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
34: Chaabouni <i>et al</i> (2007)	-	3,450	+	0	+	+	+	+	0
Total		2,100-4,300	30/31	17/18	28/33	22/31	16/19	18/20	13/23

(*) Resumo dos 13 casos descritos; (**) Dois casos descritos; +: presente; -: ausente; 0: não relatado

Tabela 5 - Principais características fenotípicas descritas para os pacientes considerados com trissomia 20p pura.

Referência	Le Chien (1994)	Sidwell <i>et al.</i> (2000)	Ravel <i>et al.</i> (2003)	Nossa paciente	Total
Região duplicada	20pter → 20q11	t(4;20)(pter;q11.1),i(20)(q11.1) <i>de novo</i>	20p12.1 → p13	20p11.2 → p13	
Peso ao nascimento (Kg)	3,024	2,500	2,790	2,960	
Idade ao exame	3 anos	19 anos	2 anos e 36 meses	21 anos	
ADNPM	+	+	+	+	4/4
Coordenação motora pobre	0	+	0	+	2/2
Face arredondada com bochechas proeminentes	+	+	+	+	4/4
Fissuras palpebrais antevertidas	-	+	-	+	2/4
Anormalias dentárias	-	-	-	+	1/4
Anormalias vertebrais	0	-	0	+	1/2
Anomalias renais	-	+	0	-	1/3
Hipertelorismo	+	+	0	+	3/3
Deficiência de aprendizado	0	+	0	+	2/2
Distúrbio de comportamento	0	0	+	+	2/2
Mãos grandes	-	-	0	+	1/3
Pés grandes	-	-	0	+	1/3
Distúrbios na fala	+	+	+	-	3/4
Hérnia umbilical	-	+	0	+	2/3
Crescimento acelerado após puberdade	-	+	0	+	2/3
Assimetria craniana com fronte alta e larga	0	+	+	+	3/3
Outros	otite média crônica	criptorquidia à esquerda e osteopenia	dilatação dos ventrículos laterais	hiperextensibilidade das articulações	

+: presente; -: ausente; 0: não informado

Tabela 6 – Comparação entre as principais características da trissomia 20p e as da nossa paciente.

Trissomia parcial 20p	Nossa paciente
Face arredondada com bochechas proeminentes	+
Atraso de desenvolvimento motor	+
Coordenação motora pobre	+
Fissuras palpebrais antivertidas	+
Hipertelorismo	+
Estrabismo	-
Defeitos cardíacos	-
Anomalias vertebrais	+
Anomalias nos dentes	+
Dificuldade de aprendizado	+
Distúrbio de comportamento	+
Crescimento acelerado após puberdade	+
Assimetria craniana com fronte alta e larga	+

+: presente; -: ausente

IV.2. Paciente 2: 46,XY,t(5;14)(q14.1;q31.3)*de novo*

O paciente 2 apresentou uma translocação *de novo* [46,XY,t(5;14)(q14.1;q31.3)] (Figura 16). O cariótipo dos genitores foi normal.

Para a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), duas sondas totais da Vysis®, WCP 5 e WCP 14 foram utilizadas. Esta técnica confirmou o diagnóstico cromossômico do paciente. Nenhuma marcação adicional foi observada (Figura 17).

Figura 16 – Translocação entre os cromossomos 5 e 14, evidenciada pelo bandamento GTG.

Figura 17 – Paciente 2. Identificação da translocação envolvendo os cromossomos 5 e 14. A) Biblioteca do cromossomo 5 (Vysis). B) Biblioteca do cromossomo 14 (Vysis). As setas mais largas evidenciam os cromossomos derivados, enquanto que a outra seta evidencia o cromossomo normal.

IV.2.2. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 14

No cromossomo 14, utilizamos sete sondas para delimitarmos o ponto de quebra (Figura 18). A quebra foi localizada, na etapa de hibridação, no segmento contido no clone RP11-315O17, situado na banda 14q31.3, que hibridou o cromossomo 14, o der(5) e o der(14) (Figura 19 e 20).

Figura 18 – Ideograma evidenciando os sete clones utilizados para a delimitação do ponto de quebra no cromossomo 14. Os sinais de hibridação dos clones representados em pretos foram observados nos cromossomos 14 e der(14), enquanto que os sinais de hibridação dos clones representados em vermelho encontravam-se nos cromossomos 14 e der(5). A quebra foi localizada no segmento contido no clone evidenciado em azul, marcação no cromossomo 14, der(5) e der(14).

Figura 19 - A) Os sinais da sonda RP11-179O11 foram detectados nos cromossomos 14 e der(14). Nenhuma marcação foi observada no cromossomo der(5), mostrando que o clone presente nesta região (14q31.2) não foi translocado. B) Os sinais da sonda RP11-315O17, localizada na região 14q31.3, foram detectados nos cromossomos 14, der(14) e der(5) evidenciando o ponto de quebra. C) Os sinais da sonda RP11-79J20, localizada na região 14q32.11, foram detectados nos cromossomos 14 e der(5). Nenhuma marcação foi observada no cromossomo der(14), mostrando que o clone presente nesta região foi translocado.

Figura 20 – A região do ponto de quebra no cromossomo 14. A figura superior evidencia a região do ponto de quebra, mostrando o clone RP11-315017, o qual abrange aproximadamente 168 Kb de DNA. A figura abaixo evidencia que, na região do ponto de quebra, não existem genes descritos. As informações mostradas estão à esquerda em cada uma das figuras, mostrando o comprimento, banda cromossômica, genes, clones e comprimento (Adaptado de Ensembl).

IV.2.3. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 5

Iniciou-se o mapeamento dos pontos de quebra localizados por bandamento GTG, hibridando clones mapeados a intervalos de aproximadamente 1 Mb nas bandas identificadas. Delimitamos os segmentos que flanqueiam os pontos de quebra utilizando clones aí mapeados para identificar aqueles em que se localizavam as quebras.

Iniciamos o mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 5 nas bandas 5q13.1; 5q13.2 e 5q14.1. A quebra foi localizada, na etapa de hibridação, no segmento contido no clone RP11-30D15, em 5q14.1. Outro clone mapeado também em 5q14.1 (RP11-2J21), porém mais distal em

relação ao centrômero, não estava translocado (marcação no cromossomo 5 e der(5) (Figura 21, 22 e 23).

Figura 21 – Ideograma do cromossomo 5, evidenciando as sondas utilizadas para a delimitação do ponto de quebra deste cromossomo. Os sinais de hibridação dos clones representados em preto foram observados nos cromossomos 5 e der(5), enquanto que os sinais de hibridação para os clones representados em vermelho foram encontrados nos cromossomos 5 e der(14). O ponto de quebra foi localizado entre o clone RP11-2J21 e RP11-30D15.

Figura 22 - A) Os sinais das sondas RP11-30D15 foram detectados nos cromossomos 5 e der(14). Nenhuma marcação foi observada no cromossomo der(5), mostrando que o clone presente nesta região (5q14.1) foi translocado. B) Os sinais das sondas RP11-2J21, localizada também na região 5q14.1, foram detectados nos cromossomos 5 e der(5) mostrando que o clone presente nesta região não foi translocado.

Figura 23 – Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 5. Na parte superior da figura, ideograma do cromossomo 5, com a banda 5q14.1 destacada, abrangendo 2.2 Mb. À esquerda, está a descrição da informação mostrada (comprimento, banda cromossômica, genes, clones e comprimento). O clone RP11-2J21 não se encontra translocado, enquanto que o clone RP11-30D15 encontra-se translocado (Adaptado de Ensembl).

IV.2.4. Os genes localizados nos pontos de quebra

Em relação ao cromossomo 14, nosso paciente apresentou como ponto de quebra o segmento 14q31.3. A tabela 7 reúne as características clínicas observadas em pacientes com deleções que compreendem o segmento cromossômico 14q31.3.

Embora o ponto de quebra do rearranjo presente em nosso paciente tenha sido localizado em 14q31.3, ele apresentou muitas anormalidades que são comumente encontradas nos casos de deleção terminal 14q32 como, por exemplo, retardo mental, dolicocefalia, orelhas proeminentes, hipertelorismo, estrabismo, fissuras palpebrais para baixo, palato alto e em ogiva, telecanto, hélices malformadas, prega palmar única, miopia severa, coloboma e ptose.

Nosso paciente apresenta duas importantes malformações oculares, coloboma e microftalmia unilaterais. Bessant *et al*, em 1999, descrevem que, pelo menos catorze fatores de transcrição são essenciais para o desenvolvimento normal do olho, juntamente com outros trinta e dois fatores de transcrição, restritos a diferentes tecidos, que são expressos em algum estágio de desenvolvimento do olho.

Genes responsáveis por anormalidades oculares, como coloboma, microftalmia e catarata são encontrados em algumas regiões do cromossomo 14 (14q21-22; 14q24.3 e 14q32) (OMIM).

O ponto de quebra encontrado no rearranjo presente no paciente 2 não contém genes (14q31.3) (Figura 20). Ao compararmos as características clínicas do nosso paciente com os pacientes descritos na tabela 7 e, tendo em vista o retardo mental e anormalidades oculares como principais causas

fenotípicas do nosso paciente, sugerimos algumas hipóteses: 1) de que tenha ocorrido uma perda do segmento 14q31.3 no momento da formação do rearranjo. 2) De que exista algum gene dentro deste segmento (14q31.3) responsável pelo desenvolvimento do olho e 3) algum gene dentro deste segmento, estando interrompido, estaria interferindo na expressão de outros genes.

Já em relação ao cromossomo 5, a delimitação do ponto de quebra neste cromossomo inclui onze genes, sendo três deles considerados pseudogenes (Q9BUN3_HUMAN; HOMER1 e PAPD4). Até o momento não existe nenhum caso descrito na literatura descrevendo uma deleção nesta região. Quanto às características destes genes, quatro deles produzem proteínas que atuam no sistema nervoso (AP3B1; SCAMP1; BHMT2 e CMYA5). Os padrões de expressão destes genes são mostrados na figura 24. A função das proteínas ainda não foi identificada, porém, sabe-se que estes genes são expressos no cérebro de pessoas normais (Genecards); um deles, estando interrompido, pode estar contribuindo para o comprometimento mental do paciente.

Figura 24 – Expressão dos genes AP3B1; SCAMP1; BHMT2 e CMYA5 em tecidos humanos normais. BMR = medula óssea; SPL = baço; TMS = timo; BRN = cérebro; SPC = medula espinhal; HRT = coração; MSL = músculo esquelético; LVR = fígado; PNC = pâncreas; PST = próstata; KDN = rim; LNG = pulmão (adaptado de GeneCards).

Tabela 7 – Características fenotípicas descritas para pacientes com deleções que compreendem o segmento cromossômico 14q31.3.

	Nielsen <i>et al.</i> (1978)	Turleau <i>et al.</i> (1984)	Kawamura <i>et al.</i> (1985)	Yamamoto <i>et al.</i> (1986)	Yen <i>et al.</i> (1989)	Gorski <i>et al.</i> (1990)	Nosso paciente
Segmento deletado	q31qter	q23q32	q24.3q32.1	q24.3q32.1	q31.1	q31q32.3	q31.3
Idade gestacional	Termo	37 semanas	42 semanas	37 semanas	NI	43 semanas	Termo
Peso ao nascimento (g)	4000	2760	3800	2350	4400	3841	2600
Atraso psicomotor	+	+	+	+	+	+	+
Falha no desenvolvimento	-	+	+	-	0	+	+
Microcefalia	-	+	+	+	+	+	+
Dificuldade de se alimentar	-	+	+	+	0	-	-
Fissuras palpebrais pequenas	-	+	+	+	-	-	-
Epicanto	-	-	-	-	+	+	-
Estrabismo	+	-	-	+	-	+	+
Orelhas proeminentes	+	+	+	-	+	+	+
Boca de carpa	-	+	+	+	0	+	+
Lábio superior fino	-	-	-	-	0	+	-
Palato alto	+	-	-	-	+	+	+
Dentição anormal	-	-	+	-	0	+	-
Micrognatia	+	+	+	+	+	+	-
Defeito cardíaco	-	+	-	-	-	-	-
Anomalias renais	-	+	-	-	0	+	-
Criptorquidismo	-	+	-	-	0	+	-
Anomalias do esqueleto	+	+	+	-	0	+	-
Anomalias oculares	0	0	0	0	+	0	+
Prega palmar transversal	-	+	-	+	0	+	+

+ : presente; - : ausente; 0 : não informado

IV.3. Paciente 3: 46,XY,t(1;15)(p13.2;q25.2)

Pelos métodos citogenéticos tradicionais, o paciente apresentou uma translocação entre o braço curto do cromossomo 1 e braço longo do cromossomo 15 [46,XY,t(1;15)(p13.2;q25.2)] (Figura 25).

Para a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), utilizamos duas sondas totais, uma da Vysis®, WCP 15 e outra da Cytocell, WCP 1. Esta técnica confirmou a translocação e nenhuma marcação adicional foi observada (Figura 26).

Figura 25: t(1;15): Os cromossomos translocados e seus homólogos normais, após bandamento GTG. As setas indicam as regiões dos possíveis pontos de quebra.

Figura 26 – A) Identificação dos segmentos translocados entre os cromossomos 1 e 15 por FISH de biblioteca do cromossomo 15 (Vysis). B) Biblioteca do cromossomo 1 (Cytocell). As setas mais largas evidenciam os cromossomos derivados, enquanto que a outra seta evidencia o cromossomo normal.

IV.3.1. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 15

Iniciou-se o mapeamento dos pontos de quebra localizados por bandamento GTG, hibridando clones mapeados a intervalos de aproximadamente 1 Mb nas bandas identificadas. Delimitamos os segmentos que flanqueiam os pontos de quebra utilizando clones aí mapeados para identificar aqueles em que se localizavam as quebras.

Utilizamos oito clones para a delimitação do ponto de quebra do cromossomo 15 (Figura 27). A quebra foi localizada, na etapa de hibridação, no segmento contido no clone RP11-152F13, em 15q25.2 (marcação nos

cromossomos 15 e der(1). Outro clone mapeado também em 15q25.2 (RP11-499F3), porém mais proximal em relação ao centrômero apresentava os sinais de hibridação nos cromossomos 15 e der(15), evidenciando que este clone não estava translocado (Figura 28).

Figura 27 – Ideograma do cromossomo 15 mostrando os clones utilizados para a delimitação do ponto de quebra, os sinais de hibridação dos clones representados em preto foram observados nos cromossomos 15 e der(15), enquanto que os sinais de hibridação dos clones representados em vermelho encontravam-se nos cromossomos 15 e der(1).

Figura 28: A) Os sinais da sonda RP11-499F3 foram detectados nos cromossomos 15 e der(15). Nenhuma marcação foi observada no cromossomo 1, mostrando que o clone presente nesta região (15q25.2) não estava translocado. B) Os sinais das sondas RP11-152F13, localizada na mesma região do clone RP11-499F3, porém mais distal, foram detectados no cromossomo 15 e no der(1), mostrando que o clone presente nesta região estava translocado.

Figura 29 - Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 15. Na parte superior da figura, ideograma do cromossomo 15, com a banda 15q25.2 destacada, abrangendo 2.0 Mb. À esquerda, está a descrição da informação mostrada (comprimento, banda cromossômica, genes, clones e comprimento). Os sinais de hibridação do clone RP11-499F3 foram vistos no cromossomo 15 e der(15), enquanto que os sinais de hibridação do clone RP11-152F13 encontrava-se no cromossomo 15 e der(1) (Adaptado de Ensembl).

IV.3.2. Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 1

No cromossomo 1, utilizamos sete clones para a delimitação do ponto de quebra (Figura 29). A quebra foi localizada, na etapa de hibridação, no segmento contido no clone RP5-1037B23, em 1p13.2. Outro clone mapeado em 1p13.2-13.1 (RP4-663N10), porém mais proximal em relação ao centrômero, não estava translocado, os sinais de hibridação deste clone foram observados nos cromossomos 1 e der(1) (Figura 30).

Figura 29 – Ideograma do braço curto do cromossomo 1 evidenciando os sete clones utilizados para a delimitação do ponto de quebra. Os sinais de hibridação dos clones representados em pretos estavam presentes no cromossomo 1 e der(15), enquanto que os sinais de hibridação dos clones representados em vermelho estavam presentes no cromossomo 1 e der(1).

Figura 30 - A) Os sinais das sondas RP5-1037B23, localizada na região 1p13.2, foram detectados nos cromossomos 1 e der(15) mostrando que o clone presente nesta região foi translocado. B) Os sinais da sonda RP4-663N10 foram detectados nos cromossomos 1 e der(1). Nenhuma marcação foi observada no cromossomo der(15), mostrando que o clone presente nesta região (1p13.2-13.1) não foi translocado.

Figura 31 - Delimitação do ponto de quebra no cromossomo 1. Na parte superior da figura, ideograma do cromossomo 1, com a banda 1p13.2-13.1 destacada, abrangendo 2.0 Mb. À esquerda, está a descrição da informação mostrada (comprimento, banda cromossômica, genes, clones e comprimento). O clone RP5-1037B23 encontra-se translocado, enquanto que o clone RP4-663N10 não se encontra translocado (Adaptado de Ensembl).

IV.3.3. Os genes presentes nos pontos de quebra e o quadro clínico

Conseguimos delimitar os pontos de quebra dos cromossomos envolvidos no rearranjo (cromossomo 1 e 15), porém até o momento não existe descrição na literatura para estes pontos de quebra e para esta translocação. Analisando os genes presentes nos pontos de quebra do cromossomo 1 (*TRIMB3*; *DENND2C*; *BCAS2*; *CSDE1*; *AMPD1*; *NRAS*; *SYCP1*; *TSHB*; *TSPAN2* e *NGFB*) e do cromossomo 15 (*MEX3B*; *EFTUD1*; *QBIVV3* e *Q6P168*) (Figura 29 e 31). Verifica-se que a maioria destes genes é expresso no sistema nervoso e nos músculos de pessoas normais (Genecards). Nosso paciente apresenta poucas alterações fenotípicas: atraso na aquisição fala, gagueira, dificuldade na articulação das palavras, tornando-as incompreensíveis, e dificuldades escolares, provavelmente em decorrência da perda de algum desses genes.

Um rearranjo cromossômico constitucional, aparentemente equilibrado quando observado em bandamento GTG, pode estar relacionado a alterações fenotípicas por diversos mecanismos: a) haploinsuficiência de um ou mais genes, b) a presença de deleções/duplicações nos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos que explicariam o quadro clínico do paciente.

A associação entre translocações recíprocas aparentemente equilibradas e doenças genéticas, além de facilitar a identificação de genes para doenças monogênicas e de manifestação precoce, também pode levar à identificação de genes candidatos a doenças complexas, geneticamente heterogêneas ou de manifestação tardia.

V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Este trabalho compreendeu o estudo de duas translocações cromossômicas “de novo” aparentemente equilibradas e uma duplicação do braço curto do cromossomo 20 em decorrência de mosaicismo materno. O objetivo foi determinar os pontos de quebra por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e identificar genes candidatos que pudessem explicar o quadro clínico dos portadores.

Paciente 1: trissomia 20p

A paciente 1 apresentou uma duplicação direta do braço curto do cromossomo 20 (p11.22p13) em decorrência de mosaicismo materno. Para o mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 20, foram utilizados segmentos de DNA clonados em BAC e PAC e vistos por meio de FISH. Dos nove clones testados apenas um não estava duplicado (20p11.21). A paciente apresentou muitas similaridades com os pacientes descritos com trissomia 20p, atraso DNPM, hipertelorismo, falta de coordenação motora, face arredondada com bochechas proeminentes, anomalias vertebrais e dentárias e assimetria craniana com fronte alta e larga. Apresentou também dificuldade de aprendizado, distúrbio de comportamento e crescimento acelerado após menarca. Pelo fato da análise citogenética e molecular mostrar que a nossa paciente apresenta uma trissomia 20p pura, as características fenotípicas são de grande importância para ajudar a delinear essa síndrome. Três genes estão localizados no segmento que está duplicado (20p11.2-13), o primeiro deles é o gene do receptor 4 de somatostatina (*SSTR4*). A somatostatina está distribuída

pelo corpo e é importante reguladora do sistema endócrino e nervoso, inibindo a secreção do hormônio de crescimento. O segundo gene é o *BMP2* que codifica uma proteína morfogenética do osso e que tem uma função direta com o sistema nervoso. O terceiro gene encontrado na região cromossômica duplicada é o *GHRH* que codifica proteínas relacionadas com o hormônio de crescimento. O efeito de dose desses três genes poderia estar relacionado com o fenótipo da paciente.

Paciente 2: *t(5;14)*

O paciente 2 apresentou uma translocação *de novo* [46,XY,t(5;14)(q14.1;q31.3)]. No cromossomo 14, utilizamos sete sondas para delimitarmos o ponto de quebra. A quebra foi localizada no segmento contido no clone RP11-315O17, situado na banda 14q31.3 o qual hibridou o cromossomo 14, o der(5) e o der(14). No cromossomo 5 foram utilizadas dez sondas. A delimitação da quebra foi localizada no segmento contido no clone RP11-30D15, em 5q14.1. Embora o ponto de quebra do rearranjo presente em nosso paciente tenha sido localizado em 14q31.3, ele apresentou muitas anormalidades que são comumente encontradas nos casos de deleção terminal 14q32 como, por exemplo, retardo mental, dolicocefalia, orelhas proeminentes, hipertelorismo, estrabismo, fissuras palpebrais para baixo, palato alto e em ogiva, telecanto, hélices malformadas, prega palmar única, miopia severa, coloboma e ptose. Em relação ao cromossomo 14, o ponto de quebra encontrado no nosso paciente não contém genes (14q31.3). Tendo em vista o retardo mental e anormalidades oculares como principais causas fenotípicas do nosso paciente, sugerimos algumas hipóteses: 1) de que tenha

ocorrido uma perda do segmento 14q31.3 no momento da formação do rearranjo. 2) De que exista algum gene dentro deste segmento (14q31.3) responsável pelo desenvolvimento do olho e 3) algum gene dentro deste segmento, estando interrompido, estaria interferindo na expressão de outros genes. Já em relação ao cromossomo 5, a delimitação do ponto de quebra neste cromossomo inclui onze genes, sendo que quatro deles produzem proteínas que atuam no sistema nervoso (AP3B1; SCAMP1; BHMT2 e CMYA5). A função das proteínas ainda não foi identificada, porém sabe-se que estes genes são expressos no cérebro de pessoas normais; um ou alguns genes, estando interrompido, podem estar contribuindo para o comprometimento mental do paciente.

Paciente 3: t(1;15)

A análise cromossômica mostrou que o paciente 3 apresentou uma translocação entre o braço curto do cromossomo 1 e braço longo do cromossomo 15 [46,XY,t(1;15)(p13.2;q25.2)]. Utilizamos oito clones para a delimitação do ponto de quebra do cromossomo 15. A quebra foi localizada no segmento contido no clone RP11-152F13, em 15q25.2. Analisando os genes presentes nos pontos de quebra do cromossomo 1 e do cromossomo 15, verifica-se que a maioria destes genes é expresso no sistema nervoso e nos músculos de pessoas normais. Nosso paciente apresenta poucas alterações fenotípicas: atraso na aquisição fala, gagueira, dificuldade na articulação das palavras, tornando-as incompreensíveis e dificuldades escolares, provavelmente em decorrência da perda de algum desses genes.

VI. ABSTRACT

Two apparently “de novo” balanced translocations and one duplication of the short arm of chromosome 20 were studied. Our aim was to determine the breakpoints by chromosomal analysis through fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and identify candidate genes and how they were involved with the clinical phenotypes of the patients. Patient 1 carried a duplication of the short arm of chromosome 20 (p11.22p13), inherited from the mother that showed normal and dup(20) lymphocytes. The duplication was determined by FISH using BAC and PAC clones, and nine clones were duplicated except one (20p11.21). The patient shared many of the common characteristics of trisomy 20p including delay in motor development, hypertelorism, poor coordination, round face with prominent cheeks, vertebral and dental abnormalities and cranial asymmetry with high and large forehead. She also had learning difficulties, behavioral disorders and pubertal growth spurt at 12 years. As our patient is an example of pure trisomy 20p, the features are of particular importance to delineate the syndrome. Three genes were mapped on the segment that contain the duplication (20p11.2-13), one of these genes is the *SSTR4* (Somatostatin receptor 4). The somatostatin is widely distributed throughout the body and is important regulator of endocrine and nervous system function. It is an inhibitor of growth hormone secretion. The second gene is the *BMP2* that produce bone morphogenetic proteins and it has a direct function with the nervous system. The third gene is the *GHRH* that produce proteins connected with the growth hormone. These genes might have been over expressed and thus contributing to the patient’s clinical features. Patient 2, carried a 46,XY,t(5;14)(q14.1;q31.3)*de novo* translocation. On chromosome 14

the breakpoint was mapped to a segment contained in BAC RP11-315O17 (14q31.3). On the chromosome 5 the breakpoint was mapped to a segment contained in BAC RP11-30D15 (5q14.1). Although the breakpoint, on the chromosome 14, has been mapped in 14q31.3, our patient shared many of the common characteristics of terminal 14q32 deletion: mental retardation, dolicocephaly, prominent ears, hypertelorism, strabismus, upturned palpebral fissures, highly arched palate, simian crease, severe myopia, coloboma and palpebral ptosis. As mental retardation and ocular abnormalities were the main patient's clinical features, we are suggesting that: 1) a region of segment 14q31.3 was deleted. 2) A gene inside this segment (14q31.3) could be responsible for ocular development and 3) a disrupted gene could interfere on the expression of other genes. On chromosome 5 eleven genes were localized and four of them are expressed in nervous system (AP3B1; SCAMP1; BHMT2 e CMYA5). One of these genes might have been disrupted and is contributing to the patient's clinical features. Patient 3 was the carrier of a 46,XY,t(1;15)(p13.2;q25.2)*de novo* translocation. The breakpoint on chromosome 15 was mapped to the segment contained in clone RP11-152F13 (15q25.2). The breakpoint on chromosome 1 was mapped to the segment contained in clone RP5-1037B23 (1p13.2). The genes mapped at the breakpoint regions of chromosome 1 and chromosome 15 are expressed in nervous system and muscles. Our patient shows few clinical features: speech delay, stutter and learning difficulties, probably because one or more of these genes, mapped at the breakpoint region, could be disrupted.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ardalan A, Prieur M, Choiset A, Turleau C, Goutieres F, Girard-Orgeolet S. Intrachromosomal insertion mimicking a pericentric inversion: molecular cytogenetic characterization of a three break rearrangement of chromosome 20. **American Journal of Medical Genetics** **138A**: 288-293, 2005.

Balestrazzi P, Viridis R, Frassi C, Negri V, Rigoli E, Bernasconi S. "De novo" trisomy 20p with macroorchidism in a prepuberal boy. **Ann. Genet.** **27(1)**: 58-9, 1984.

Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG. Monosomy 1p36 breakpoint suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions. **Human Molecular Genetic** **12**: 2153-2165, 2003.

Ballif BC, Gajecka M, Shaffer LG, Monosomy 1p36 breakpoints indicate repetitive DNA sequence elements may be involved in generating and/or stabilizing some terminal deletions. **Chromosome Research** **12(2)**: 133-41, 2004.

Barber JCK. Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. **American Journal of Medical Genetics: Review.** 609-629, 2005.

Bown N, Cross I, Davison EV, Burn J. Partial trisomy 20p resulting from a recombination of a familial pericentric inversion. **Hum. Genet.** **74(4)**: 417-9, 1986.

Centerwall W e Francke U. Familial trisomy 20p five cases and two carriers in three generations a review. **Ann. Genet.** **20(2)**: 77-83, 1977.

Ciccone 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?. **Human Genetic** **117(6)**: 571-82, 2005.

Carter NP, Vetrie D. Applications of genomic microarrays to explore human chromosome structure and function. **Human Molecular Genetics** **13(2)**: 297-302, 2004.

Chaabouni M, Turleau C, Karboul L, Jemaa LB, Maazoul F, Attié-Bitach T, Romana S, Chaabouni H. Clinical report: de novo trisomy 20p of paternal origin. **American Journal of Medical Genetics** **143A**: 1100-1103, 2007.

Chen H, Hoffman WH, Tyrkus M, Al Saadi A, Bawle E. Partial trisomy 20p syndrome and maternal mosaicism. **Ann Genet** **26**: 21-25, 1983.

Cheng SD, Spinner NB, Zackai EH, Knoll JHM. Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosomes 15 from 11 patients. **Am J Human Genetic** **55**: 753-759, 1994.

Daniel A, Baker E, Chia N, Haan E, Malafiej P, Hinton L, Clarke N, Adès L, Darmanian A, Callen D. Recombinations of intrachromosomal transposition of subtelomeres in chromosomes 1 and 2: a cause of minute terminal chromosomal imbalances. **American Journal Medical Genetic** **117(1)**: 57-64, 2003.

Delicado A, Lopez Paires I, Vincent P, Gracia R. Partial trisomy 20. **Ann Genet** **24**: 54-56, 1981.

Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chisoe S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiewich R, Beare DM, Clamp M, Smink LJ *et al*. The DNA sequence of human chromosome 22. **Nature** **402**: 489-495, 1999.

Fraive L, Viot G, Prieur M, Turleau C, Gosset P, Romana S, Munnich A, Vekemans M, Cormier-Daire V. Apparent Sotos Syndrome (cerebral gigantism) in a child with trisomy 20p11.2-p12.1 mosaicism. **American Journal of Medical Genetics** **91**: 273-276, 2000.

Freenstra I, Fang J, Koolen DA, Siezen A, Evans C, Winter, RM, Lees MM, Riegel M, de Vries BBA, Van Ravenswaaij CMA, Schinzel A. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); an online database for rare chromosome abnormalities. **European Journal of Medical Genetics**: 1-13, 2005.

Fryns, J. P.; Van Den Berghe H. Possible excess of mental handicap and congenital malformations in autosomal reciprocal translocations. **Ann. Génét.** **22 (3)**: 125-127, 1979.

Fryns JP, Kleczkowska A. Kenis M. De novo complex chromosomal rearrangement (CCR) in a severely mentally retarded boy. **Ann Genet.** **27(1)**: 62-4, 1984.

Funderburk SJ, Sparkes RS, Sparkes MC. Trisomy 20p due to a paternal reciprocal translocation. **Ann Genet.** **26(2)**: 94-97, 1983.

Gajecka M, Glotzbach CD, Jarmuz M, Ballif BC, Shaffer LG. Identification of cryptic imbalance in phenotypically normal and abnormal translocation carriers. **European Journal of Human Genetics**: 1-8, 2006.

Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B; Association des Cytogeneticiens de Langue Francaise. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. **Hum Reprod.** **16**: 82-90, 2001.

Gorski JL, Uhlmann WR, Glover TW. A child with multiple congenital anomalies and karyotype 46,XY,del(14)(q31q32.3): further delineation of chromosome 14 interstitial deletion syndrome. **American Journal of Medical Genetics** **37**: 471-474, 1990.

Grammatico P, Cupilari F, Di Rosa C, Falcolini M, Del Porto G. 20p duplication as a result of parental translocation: familial case report and a contribution to the clinical delineation of the syndrome. **Clin. Genet.** **41(6)**: 285-289, 1992.

Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ling Ng B, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings 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. **Journal of Medical Genetics** **42**: 8-16, 2005.

Haber, James E. Partners and pathways repairing a double-strand break. **Trends in Genetic** **16(6)**: 259-264, 2000.

Hill AS, Foot NJ, Chaplin TL, Young BD. The most frequent constitutional translocation in humans, the t(11;22)(q23;q11) is due to a highly specific alu-mediated recombination. **Human Molecular Genetics** **9(10)**: 1525-1532, 2000.

Hook EB e Hamerton JL. The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies-differences between studies-results by sex and by severity of phenotypic involvement. In: Hook, E. B., Porter, I. H. (eds). **Population cytogenetics**. Academic, New York, pp 63-79, 1977.

Inoue K e Lupski JR. Molecular Mechanisms for Genomic Disorders. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** **3**: 199-242, 2002.

Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. **Genome research** **10**: 597-610, 2007.

Karmous-Benailly H, Giuliano F, Massol C, Bloch C, De Ricaud D, Lambert JC, Perelman S. Unbalanced inherited complex chromosome rearrangement involving chromosome 8, 10, 11 and 16 in a patient with congenital malformations and delayed development. **European Journal of Medical Genetics**: 1-8, 2006.

Kawamura G, Suzuki M, Segawa T, Kohno S. A case of partial monosomy of 14q. **J Pediatr Pract (Jpn)** **48**: 32-34, 1985.

Kleinjan DJ, Heyningen V. 1998. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet* **7**: 1611-8.

Kurahashi H, Shaik 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). **Human Molecular Genetic 9**: 1665-1670, 2000.

LeChien KA, McPherson E, Estop AM. Duplication 20p identified via fluorescent in situ hybridization. **American Journal of Medical Genetics 50(2)**: 187-9, 1994.

Lupski, James R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends in Genetic 14(10)**: 417-422, 1998.

Lurie IW, Rumyantseva NV, Zaletajev DV, Gurevich DB, Korotkova IA. Trisomy 20p: case report and genetic review. **J. Genet. Hum. 33(1)**: 67-75, 1985.

Marcus ES, Fuller B, Riccardi VM. Triplication of chromosome arm 20p due to inherited translocation and secondary non-disjunction. **American Journal of Medical Genetics 4**: 47-50, 1979.

Moens PB. The double-stranded DNA helix in recombination at meiosis. **Genome 46**: 936-937, 2003.

Molina-Gomes D, Nebout V, Daikha-Dahmane F, Vialard F, Ville Y, Selva J. Partial trisomy 20p resulting from recombination of a maternal pericentric inversion: case report of a prenatal diagnosis by chorionic villus sampling. **Prenatal diagnosis 26**: 239-241, 2006.

Moustacchi E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. **Mut Res 464**: 35-40, 2000.

Nielsen J, Homma A, Rasmussen K, Ried E, Sorensen K, Saldana-Garcia P. Deletion 14q and pericentric inversion 14. **Journal Medical Genetic 15**: 236-238, 1978.

Oppenheimer S, Dignan P, Soukup S. Partial trisomy 20p: familial occurrence. **American Journal of Medical Genetics 95(4)**: 316-9 (Review), 2000.

Patsalis PC, Evangelidou P, Charalambous S, Sismani C. Fluorescence *in situ* hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. **European Journal of Human Genetics 12**: 647-653, 2004.

Ravel TJL, Vermeesch JR, Fryns JP. De novo interstitial tandem duplication of chromosome 20p12.1p13. **American Journal of Medical Genetics 117A**: 76-79, 2003.

Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. 2007. Diverse chromosome breakage mechanisms underlie subtelomeric rearrangements, a common cause of mental retardation. **Hum Mutat. 28 (2)**: 177-82.

Rudd NL, Bain HW, Giblett E, Chen SH, Worton RG. Partial trisomy 20 confirmed by gene dosage studies. **American Journal of Medical Genetics 4**: 357-364, 1979.

Schlade-Bartusiak K, Costa T, Summers AM, Nowaczyk MJ, Cox DW. FISH-Mapping of telomeric 14q32 deletions: search for the cause of seizures. **American Journal of Medical Genetics 138A**: 218-224, 2005.

Schinzel A. Trisomy 20pter q11 in a malformed boy from a t(13;20)(p11;q11) translocation carrier mother. **Human Genetic 53**: 169-172, 1980.

Shaffer LG e Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. **Annu. Rev. Genet. 34**: 297-329, 2000.

Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML *et al.* Chromosome 22-specific low copy repeats and 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. **Human Molecular Genetic 9**: 489-501, 2000.

Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. **Human Molecular Genetics 13**: 57-64, 2004.

Sidwell RU, Pinson MP, Gibbons B, Byatt SA, Svennevik EC, Hastings RJ, Flynn DM. Pure trisomy 20p resulting from isochromosome formation and whole arm translocation. **Journal Medical Genetics 37**: 454-458, 2000.

Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper, JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M, Elizondo L, Park S, Lupski, JR. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. **American Journal Human Genetic 72**: 1101-1116, 2003.

STANKIEWICZ, P. e LUPSKI, J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. **Trends in Genetics**, vol. 18, nº 2, February 2002.

Tharapel AT, Summitt RL, Wilroy RS, Martens P. Apparently balanced *de novo* translocations in patients with abnormal phenotypes: report of 6 cases. **Clinical Genetics 11**: 255-269, 1977.

Thomas MA, Duncan AMV, Bardin C, Kaloustian VMD. Lissencephaly with der(17)t(17;20)(p13.3;p12.2)mat. **American Journal of Medical Genetics 124A**: 292-295, 2004.

Tümer Z, Berg A, Mikkelsen M. Analysis of a whole arm translocation between chromosomes 18 and 20 using fluorescence in situ hybridization: detection of a break in the centromeric alpha-satellite sequences. **Hum. Genet. 95(3)**: 299-302, 1995.

Turleau C, Grouchy J, Chavin-Colin F, Dore F, Seger J, Dautzenberg M, Arthuis M, Jeanson C. Two patients with interstitial del(14q), one with features of Holt-Oram syndrome. Exclusion mapping of PI (alpha-1-antitrypsin). **Ann Genet** **27**: 237-240, 1984.

Van Ommen GJ, Breuning MH, Raap AK. FISH in genome research and molecular diagnostics. **Curr Opin Genet Dev** **5**: 304-308, 1995.

Velagaleti GV, Bien-Willner GA, Northup JK, Lockhart LH, Hawkins JC, Jalal SM, Withers M, Lupski JR, Stankiewicz P. Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two patients with campomelic dysplasia. **American Journal of Human Genetic** **76(4)**: 652-62, 2005.

Venditti CP, Hunt P, Donnenfeld A, Zackai E, Spinner NB. Mosaic paternal uniparental (iso)disomy for chromosome 20 associated with multiple anomalies. **American Journal of Medical Genetics** **124A**: 274-279, 2004.

Voullaire LE, Webb GC, Leversha MA. Chromosome deletion at 11q23 in an abnormal child from a family with inherited fragility at 11q23. **Hum Genet. Jun**; **76(2)**: 202-4, 1987.

Voullaire L, Saffery R, Davies J, Earle E, Kalitsis P, Slater H, Irvine DV, Choo KHA. Trisomy 20p resulting from inverted duplication and neocentromere formation. **American Journal of Medical Genetics** **85**: 403-408, 1999.

Yamamoto Y, Sawa R, Okamoto N, Matsui A, Yanagisawa M, Ikemoto S. Deletion 14q(24.3 to q32.1) syndrome: significance of peculiar facial appearance in its diagnosis and deletion mapping of Pi (alpha-1-antitrypsin). **Human Genetic** **74**: 190-192, 1986.

Yen FS, Podruch P, Weisskopf B. A terminal deletion (14)(q31.1) in a child with microcephaly, narrow palate, gingival hypertrophy, protuberant ears, and mild mental retardation. **Journal of Medical Genetic** **26(2)**: 130-133, 1989.

Wieczorek D, Bartsch O, Gillessen-Kaesbach G. Distal monosomy 18p/distal trisomy 20p: a recognizable facial phenotype? **American Journal of Medical Genetics** **120A**: 429-433, 2003.

Zimmerman D, Young WF Jr, Ebersold MJ, Scheithauer BW, Kovacs K, Horvath E, Whitaker MD, Eberhardt NL, Downs TR, Frohman LA. Congenital gigantism due to growth hormone-releasing hormone excess and pituitary hyperplasia with adenomatous transformation. **J. Clin. Endocr. Metab.** **76**: 216-222, 1993.

VII.1. Banco de dados eletrônicos

CHORI: Protocolo de extração de DNA de BAC:
<http://bacpac.chori.org/home.html>

On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM; papa MIM):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

University of California Santa Cruz – UCSC Genome Browser:
<http://www.genome.ucsc.edu>

Ensembl Genome Browser:
<http://www.ensembl.org>