# Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos

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

São Paulo 2011

# Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos

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

São Paulo 2011

Orientadora: Dra. Angela M. Vianna Morgante

### FONSECA, ANA CAROLINA DOS SANTOS

Caracterização de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a quadros clínicos

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

 Rearranjos cromossômicos equilibrados 2. Alterações cromossômicas submicroscópicas 3. Hibridação *in situ* fluorescente 4. Hibridação genômica em *microarray*

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

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo concedidos à orientadora (FAPESP CEPID 1998/14254-2) e à aluna (FAPESP 2009/03480-8).

À Deus Aos meus amigos Aos meus familiares Agradeço:

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela possibilidade de realização deste trabalho.

À Dra. Angela M. Vianna Morgante, pela orientação neste projeto, por todos os ensinamentos, pela amizade e confiança depositada em mim.

À Dra. Juliana F. Mazzeu, pelos primeiros ensinamentos, pela amizade e por toda ajuda que me ofereceu durante esses anos.

Às Dras. Ana Cristina Krepischi e Carla Rosenberg, pelos ensinamentos sobre a-CGH, pelos auxílios e colaboração neste estudo.

À Dra. Regina Célia Mingroni Netto, pelos auxílios e ajuda ao longo desses anos.

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

Às Dras. Simone Aparecida Siqueira da Fonseca e Sylvie Antonini, pela permissão da continuidade de seus trabalhos.

À Maraisa, por todo apoio, amizade e ajuda durante esses anos e pelo auxílio na edição deste trabalho.

Aos técnicos Fátima, Mara, Paulo e Lígia, pela ajuda e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Genética Humana, Silvia, Sarita, Rafaella, Adriano, José, Larissa, Jacaré, Lilian, Teresa, Ana Carla, Rezinha, Karina, Daniela, Vitor e Daniel pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

À família dos pacientes, pela colaboração.

À minha família, pelo apoio ao longo dos anos.

Aos meus amigos queridos pela compreensão, atenção e incentivo dado a todo o momento.

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

## Índice

I. INTRODUÇÃO						
I.1 Técnicas de estudo cromossômico						
I.2 Mecanismos de formação de rearranios cromossômicos						
<i>I.3</i> Rearranjos cromossômicos equilibrados associados a sinais e sintomas clínicos						
Interrupção de genes pelas quebras cromossômicas						
Formação de gene híbrido						
Efeito de posição						
Dissomia uniparental						
Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos						
II. OBJETIVOS						
III. PACIENTES E MÉTODOS						
III.1 Pacientes						
III.2 Métodos						
III.2.1 Estudo cromossômico						
Preparações cromossômicas						
Identificação dos rearranjos cromossômicos						
Mapeamento dos pontos de quebra						
III.2.2 Busca de microdeleções e duplicações						
III.2.3 Padrão de inativação do cromossomo X						
Metilação do gene AR						
Incorporação de 5-BrdU						
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO						
IV.1 Translocações cromossômicas que provavelmente afetam a expressão do gene SOX9 33						
IV.1.1 Translocação t(7:17)(p13:q24)						
Aspectos Clínicos						
Mapeamento dos pontos de quebra da t(7;17) por FISH						
Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH 34						
Genes mapeados no segmento dos pontos de quebra						
IV.1.2 Translocação t(17:20)(g24.3:g11.2)						
Aspectos Clínicos						
Mapeamento dos pontos de quebra da t(17;20) por FISH						
Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH 39						
Genes mapeados no segmento dos pontos de quebra						
IV.1.3 As translocações $t(17;20)(q24.3;q11.2) e t(7;17)(p13;q24.3) e o gene SOX9$						
O gene SOX9 no desenvolvimento						
O gene SOX9 e rearranios cromossômicos						
Identificação de elementos reguladores do gene SOX9						
O espectro fenotípico PRS-ACD-CD e sua relação com a região reguladora do						
gene SOX9						
Busca de elementos conservados não codificadores nas unidades de regulação						
de PRS, ACD e de enhancers para o desenvolvimento testicular						
Influência, na expressão do SOX9, de seguências de outros cromossomos						
participantes de translocações com o cromossomo 17						
IV.2 Translocação cromossômica associada a microdeleções em cis a ponto de quebra:						
t(10:21)(p13:q22)						
Aspectos Clínicos						
Mapeamento dos pontos de quebra translocação por FISH 61						
Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH						
Genes mapeados no segmento dos pontos de quebra						
Genes mapeados nos segmentos das delecões do cromossomo 10						
Genes candidatos						
Mecanismo de formação da t(10;21)						

IV.3 Translocação t(X;22)(q22;q13) associada a duplicação do gene PLP1 e doença de
Pelizaeus-Merzbacher em menina
Aspectos Clínicos
Mapeamento dos pontos de quebra translocação por FISH 8
Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH
Genes mapeados nos segmentos da duplicação
Padrão de inativação do cromossomo X
Genes candidatos
0 gene PLP1
a)O gene PLP1 e a doença de Pelizaeus-Merzbacher
b)Mulheres sintomáticas portadoras de duplicações que incluem o PLP1
Mecanismo de formação da t(X;22)
IV.4 Translocação cromossômica familial associada a duplicação e deleções
submicroscópicas
Aspectos Clínicos
Mapeamento dos pontos de quebra da translocação por FISH 10
Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH e
validação por FISH 10
Mecanismo de formação da t(2;5;22) 10:
A importância da combinação de a-CGH e de FISH na caracterização do rearranjo
cromossômico
<i>O efeito clínico do rearranjo cromossômico</i> 11
a ) A duplicação do braço longo do cromossomo 5 11
b) A interrupção do gene SLC1A4 e a deleção em 2p14 12
c) A deleção em 5p15.1 12
Aconselhamento Genético 124
IV.5 Translocação cromossômica que provavelmente afeta a expressão do gene <i>IHH</i> :
t(2;16)(q35;q24.1)
Aspectos Clínicos 12.
Mapeamento dos pontos de quebra da translocação por FISH 12   12 12
Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH 12
Genes mapeados no segmento dos pontos de quebra 12
Genes candidatos 12
O gene IHH
a) O gene IHH e rearranjos cromossômicos
b) Busca de elementos conservados não codificadores candidatos a serem regula-
dores do gene IHH na região próxima ao ponto de quebra do cromossomo 2 133
V. SUMARIO E CONCLUSUES
VI. SUMINIARY AND CUNCLUSIONS
VII. KEFEKENUIAS BIBLIUGKAFICAS

## I. INTRODUÇÃO

#### I. INTRODUÇÃO

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

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

#### I.1 Técnicas de estudo cromossômico

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

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

desenvolvimento de técnicas moleculares aplicadas à citogenética trouxe maior precisão na caracterização dos rearranjos cromossômicos do que a que permite o bandamento.

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

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

Nas técnicas de *spectral karyotyping* (SKY) e multicolor FISH (m-FISH), a marcação específica de cada cromossomo é feita utilizando combinações de fluorocromos. Em um único experimento pode-se analisar todos os cromossomos humanos, o que é particularmente vantajoso na identificação de material cromossômico de origem desconhecida, como no caso de cromossomos marcadores supranumerários e rearranjos cromossômicos complexos, como aqueles que ocorrem nos cânceres.

O nível mais alto de resolução para análise cromossômica baseada na técnica de FISH é atingido quando são usadas fibras de cromatina, como alvos para a hibridação. Nesse método (*fibre-FISH*), as proteínas e histonas são removidas da cromatina que, assim, fica altamente distendida (Speicher e Carter, 2005). Constitui ferramenta especialmente útil para mapear sequências em regiões específicas do genoma, já que permite medir os espaços e sobreposições entre as sondas. Assim a resolução da técnica de FISH vai daquela na sua aplicação em preparações metafásicas/prometafásicas (resolução de 100 kb - 5 Mb), passando pela utilização em núcleos interfásicos (50 kb - 2 Mb) até o nível de fibras de cromatina (1 kb - 500 kb) (Speicher e Carter 2005).

Nos últimos anos, a hibridação genômica em *microarrays* tornou-se uma ferramenta efetiva para a detecção de perdas e ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos (Miller et al., 2010). A resolução do *microarray* é determinada pelo tamanho e pela distância entre as sondas, em sua cobertura parcial ou total do genoma. Na técnica de hibridação genômica comparativa baseada em *microarray* de DNA (a-CGH), o DNA controle e o DNA teste, marcados com fluorocromos diferentes, competem pela hibridação a sondas fixadas e organizadas na superfície de uma lâmina; perdas e ganhos de segmentos são indicadas pela diferença na intensidade da fluorescência dos fluorocromos. Os primeiros *arrays* utilizavam sondas clonadas em BACs (cromossomos artificiais de bactérias), porém plataformas mais recentes têm oligonucleotídeos como alvos de hibridação. Esses *oligoarrays* permitem maior flexibilidade na confecção de sondas, maior cobertura genômica e resolução superior aos *arrays* de BAC.

Outro tipo de *microarray* tem sondas de SNP, que permitem não somente a avaliação de desequilíbrios cromossômicos, mas a genotipagem. Nessa abordagem, a amostra de um único paciente é hibridizada ao *array* e alterações no número de cópias são detectadas pela comparação com hibridações de controles realizados separadamente (Speicher e Carter, 2005). Além de perdas e ganhos de segmentos, os *arrays* de SNP têm a vantagem de detectar perdas de heterozigose e permitir a determinação da origem parental de rearranjos esporádicos (Miller et al., 2010).

A hibridação em microarrays aumentou o poder de resolução da análise cromossômica global do nível de megabase para kilobase; consequentemente desequilíbrios cromossômicos não detectáveis pelas técnicas de bandamento passaram a ser descritos. Por exemplo, a aplicação de a-CGH no estudo de pacientes com deficiência mental ou malformações congênitas mostra que desequilíbrios submicroscópicos estão presentes em 15 a 20% dos casos (Rosenberg et al., 2006; Miller et al., 2010). Recentemente, com base em uma extensa revisão na literatura, o *International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Consortium* recomendou a aplicação inicial do *microarray* no estudo de pacientes com malformações congênitas múltiplas, autismo, atraso de desenvolvimento ou deficiência mental de causas genéticas desconhecidas (Miller et al., 2010). O custo da técnica seria compensado pela elevada taxa de detecção de desequilíbrios submicroscópicos (entre 15 a 20% em comparação aos 3% detectados com o bandamento G). O estudo preconizou que o uso do

bandamento G deve limitar-se ao estudo de pacientes com síndromes cromossômicas conhecidas, histórico de rearranjos cromossômico na família ou de abortos de repetição.

Na análise de rearranjos cromossômicos equilibrados, a aplicação de a-CGH tem permitido não somente detectar alterações submicroscópicas nos pontos de quebra, mas também alterações distantes a ele inclusive em cromossomos que não participam diretamente do rearranjo (Gribble et al., 2005; Sismani et al., 2008), essa uma vantagem em relação à técnica alvo-específica de FISH. Entretanto, deve-se considerar que a hibridação genômica em *array* não revela, na maioria das vezes, o tipo do rearranjo cromossômico que deu origem à perda ou ao ganho de segmentos.

Uma modificação no protocolo de a-CGH permite estudar especificamente os pontos de quebra dos rearranjos cromossômicos (Fiegler et al., 2003). A técnica de *array painting* utiliza *flow sorting* para isolar os cromossomos derivativos e posteriormente esse material é hibridado ao *array*. No caso de translocações equilibradas, ao marcar os cromossomos derivativos com fluorocromos diferentes, sequências proximais e distais ao ponto de quebra de cada cromossomo serão marcadas com cores diferentes. Essa estratégia permite identificar os segmentos que contêm os pontos de quebra, com base na razão entre as intensidades dos sinais dos fluorocromos.

Recentemente, o sequenciamento de próxima geração foi aplicado ao estudo de rearranjos equilibrados (Kloosterman et al., 2011; Talkowski et al., 2011). O uso das novas tecnologias permite identificar e sequenciar múltiplos pontos de quebra simultaneamente. As análises revelaram grande complexidade com a identificação de novos pontos de quebra e de perdas e ganhos de segmentos. Talkowski et al. (2011) admitem que, futuramente, com uma melhor relação custo-benefício, os rearranjos cromossômicos e as variações estruturais serão mapeados e sequenciados, em larga escala, no nível de resolução de pares de base.

#### I.2 Mecanismos de formação de rearranjos cromossômicos

A recombinação homóloga não alélica (*Non Allelic Homologous Recombination* - NAHR) e a junção de extremidades não homólogas (*Non-Homologous End Joining* - NHEJ) são os mecanismos classicamente considerados na formação de rearranjos cromossômicos. Nos últimos anos, o uso de novas ferramentas para a caracterização molecular dos pontos de quebra e junção dos rearranjos cromossômicos vem revelando sua complexidade e vários mecanismos têm sido propostos para explicar a formação

desses rearranjos, baseados em erros na duplicação do DNA, como o *Fork Stalling and Template Switching* - FoSTeS (Lee et al., 2007).

Ocorrendo mais de uma quebra de dupla fita de DNA em uma célula, o reparo por NHEJ pode unir extremidades que não estavam contíguas, originando rearranjos estruturais. Inicialmente as extremidades quebradas emparelham com base na homologia de alguns poucos pares bases e sua junção ocorre após adição ou perda de alguns pares de base, tornando as fitas compatíveis (Figura 1; revisão em Gu et al., 2008).



FIGURA 1. Formação de rearranjos cromossômicos por junção de extremidades não homólogas (NHEJ): Após detecção da quebra pelo mecanismo de reparo (1), as extremidades quebradas das duplas fitas de DNA emparelham por homologia de alguns poucos pares de base (2). A adição ou perda de poucos pares de base (3) tornam as fitas compatíveis, ocorrendo a junção (4), que deixa "cicatriz" indicativa de NHEJ como o mecanismo gerador do rearranjo. (Adaptada de Gu et al., 2008.)

Os rearranjos estruturais podem ainda se originar por recombinação homóloga, quando são utilizadas sequências homólogas não alélicas, como substrato para a recombinação (NAHR; Figura 2). Esse é o mecanismo que origina a maioria dos rearranjos cromossômicos estruturais recorrentes, como a duplicação do cromossomo 17, que causa a doença de Charcot-Marie-Tooth do tipo 1A (CMT1A; MIM 601097), e a deleção do cromossomo 7, que resulta na síndrome Williams-Beuren (WBS; MIM 194050). Em geral, a recombinação ocorre entre repetições de poucas cópias (*Low Copy*)

*Repeats* - LCR), que têm entre 10 e 500 kb de extensão e compartilham mais de 95% de identidade; representam de 5% a 10% do genoma humano. Apesar de mais raramente, elementos repetitivos (*Short Interspersed Nuclear Elements*, SINE; *Long Interspersed Nuclear Elements*, LINE) também podem ser substratos para a recombinação homóloga não alélica (revisão em Shaw e Lupski, 2004).



**FIGURA 2.** Formação de rearranjos cromossômicos por recombinação homóloga não alélica (NAHR): Emparelhamento seguido de recombinação entre *Low Copy Repeats* (LCR; setas laranjas e roxas), que estão orientadas na mesma direção e compartilham alta homologia, resultando em cromossomos com duplicação e deleção. As linhas escuras representam a dupla fita do DNA. (Adaptada de Bailey e Eichler et al., 2006).

O estudo dos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos pode fornecer informações sobre o mecanismo de reparo que contribuiu para sua formação. Como a maioria dos trabalhos focaram rearranjos cromossômicos recorrentes, grande parte do conhecimento nessa área baseia-se no estudo dos mecanismos associados a esse tipo de rearranjo.

No caso das translocações Robertsonianas, o emparelhamento de sequências repetitivas pericentroméricas, que teriam homologia em cromossomos acrocêntricos, facilitariam a transferência de braços cromossômicos pela troca entre sequências emparelhadas em disposição invertida ou por recombinação em U. Os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos contêm múltiplas cópias de DNA satélite e genes de RNA ribossômico 18S e 28S, sendo algumas sequências únicas para cada cromossomo e outras, compartilhadas entre acrocêntricos. O *clustering* de pontos de quebra das translocações Robertsonianas recorrentes rob(13q14q) e rob(14q21q) sugere um mecanismo específico de formação desse tipo rearranjo. Em 97% dessas translocações o ponto de quebra no cromossomo 14 ocorre nas mesmas sequências satélites. Nos cromossomos 13 e 21, o ponto de quebra ocorre em sequências satélites e em genes de

RNA ribossômico. Sequências compartilhadas pelos cromossomos 13, 14 e 21, estando no cromossomo 14 em orientação oposta às sequências nos cromossomo 13 e 21, facilitariam a ocorrência de translocações rob(13q14q) e rob(14q21q) em relação à rob(13q21q) (revisão em Shaffer e Lupski, 2000).

O mecanismo de recombinação homóloga não alélica também foi proposto para a formação da translocação recíproca recorrente t(4;8)(p16;p23). Ambos os pontos quebra ocorrem em *clusters* de genes receptores olfativos, sugerindo que a recombinação entre esses lócus em 4p16 e 8p23 seja responsável pela formação do rearranjo (Giglio et al., 2001). Assim como as translocações Robertsonianas recorrentes, a t(4;8)(p16;p23) forma-se preferencialmente na gametogênese materna (Page et al., 1997; Giglio et al., 2002).

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

Em geral, são desconhecidos os mecanismos de formação e as sequências participantes da maior parte dos rearranjos cromossômicos equilibrados não recorrentes. O aprimoramento das técnicas citogenéticas, em associação com a análise do DNA e o crescente conhecimento da sequência e da arquitetura do genoma humano tornaram factível a elucidação dos mecanismos de formação desses rearranjos cromossômicos.

Com o objetivo de caracterizar os rearranjos cromossômicos equilibrados assim como seus mecanismos geradores, Higgins et al. (2008) clonaram e sequenciaram 18 pontos de quebra de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados, presentes em indivíduos com malformações congênitas graves. Em apenas um caso foram encontradas, em ambos os pontos de quebra, sequências que, pela similaridade compartilhada, poderiam ter mediado a formação do rearranjo por NAHR. Nos pontos de quebra da maioria dos rearranjos foram detectadas duplicações, inserções e deleções de poucos pares de base, uma indicação de NHEJ como mecanismo gerador do rearranjo. O mecanismo de NHEJ também foi proposto no caso de translocações entre o cromossomo X e um autossomo, em que não havia homologia extensa entre os segmentos envolvidos e se detectaram pequenas deleções, duplicações e inserções nos pontos de quebra e junção (van Bakel et al., 1995; Vianna-Morgante et al., 2004).

Recentemente um novo mecanismo foi proposto para a formação de rearranjos cromossômicos. Lee et al. (2007) aplicaram oligoarrays e sequenciamento dos pontos de quebra para analisar duplicações não recorrentes, que incluíam o gene PLP1 (proteolipid protein 1), associadas à doença de Pelizaeus-Merzbacher, (PMD; MIM 312080). Apesar de terem identificado duplicações em tandem em 65% dos casos, os rearranjos eram mais complexos com segmentos duplicados interrompidos por segmentos intactos, triplicados ou deletados. O mecanismo de Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) foi proposto para explicar a complexidade desses rearranjos. Baseia-se na correção da duplicação do DNA, interrompida por lesões ou formação de estruturas secundárias; diante da interrupção da forquilha de duplicação, a fita lagging invade outras forquilhas próximas, até completar a duplicação da fita lagging na forquilha original. A mudança de forquilha exige a presença de microhomologias com os sítios invadidos para o priming da extremidade 3' reiniciar a replicação (Figura 3). FoSTeS aparece como explicação para outros rearranjos complexos, como deleções no cromossomo 17 associadas à síndrome de Smith-Magenis (MIM, 182290) (Gu et al., 2008) e duplicações que incluem o gene MECP2 (Carvalho et al., 2009), podendo ser um mecanismo frequente na origem de rearranjos estruturais.

#### I.3 Rearranjos cromossômicos equilibrados associados a sinais e sintomas clínicos

Apesar de a maioria dos portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados serem clinicamente normais, cerca de 7% dos rearranjos equilibrados esporádicos estão associados a alterações fenotípicas (Warburton, 1991). Estudos de indivíduos com deficiência mental e malformações congênitas evidenciaram que as translocações aparentemente equilibradas são mais freqüentes nesse grupo do que na população geral (Tharapel et al.,1977; Fryns e van den Berghe,1979).



FIGURA 3. Formação de rearranjo cromossômico por *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS): (1) Após o início da duplicação do DNA (linhas azul escuro e vermelho), lesões ou estruturas secundárias podem levar à parada da duplicação; a fita *lagging* (linha vermelha pontilhada) invade uma segunda forquilha de duplicação próxima (linhas sólidas, roxa e verde) via micro-homologia, (2) reiniciando-se a síntese de DNA (linha pontilhada verde). (3) Uma terceira forquilha (linhas sólidas, cinza e preta) pode ser invadida por essa fita *lagging*, continuando a duplicação (linha preta pontilhada). Uma série de eventos FoSTeS pode ocorrer até (4) a fita *lagging* original completar a duplicação. (Adaptada de Lee et al., 2007).

Diferentes mecanismos têm sido identificados ou sugeridos para explicar a associação entre rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e quadros clínicos. Uma das explicações mais óbvias é a interrupção de genes pelas quebras cromossômicas (Zatz et al., 1981; Bonaglia et al., 2001). Elementos reguladores também podem ser danificados pelas quebras (Leipoldt et al., 2007). A expressão de genes situados próximos aos pontos de quebra pode ser alterada devido a "efeito de posição"; nesse caso, o rearranjo não altera diretamente o gene ou sua região promotora, mas a mudança de posição pode separar o gene de um elemento regulador ou pode aproximá-lo da região reguladora de outro gene (Kleinjan e Heyningen, 1998). Recentemente a aplicação de *microarrays* de DNA ao estudo de rearranjos aparentemente equilibrados tem revelado a complexidade de muitos deles, que incluem microdeleções e duplicações próximas aos pontos de quebra ou neles próprios e que podem explicar os fenótipos alterados (Gribble et al., 2005; De Gregori et al., 2007; Sismani et al., 2008).

Assim, a caracterização dos pontos de quebra de rearranjos cromossômicos equilibrados pode levar à identificação de genes candidatos a serem responsáveis pelos

quadros clínicos a eles associados. No entanto, é importante ressaltar que a associação entre fenótipo alterado e rearranjos equilibrados pode ser ao acaso e indivíduos clinicamente normais portadores de rearranjos aparentemente equilibrados podem ter genes interrompidos pelos pontos de quebra (Baptista et al., 2008).

#### • Interrupção de genes pelas quebras cromossômicas

As quebras cromossômicas podem interromper a estrutura de genes. A identificação do gene da distrofina foi um dos primeiros casos de mapeamento de um gene a partir de uma translocação. No início da década de 80 foram publicados vários trabalhos que descreveram mulheres afetadas por distrofia muscular do tipo Duchenne (DMD), que eram portadoras de translocações recíprocas entre o cromossomo X e um autossomo (Zatz et al., 1981, Boyd et al., 1986). Em todos esses casos, o ponto de quebra no cromossomo X ocorreu na banda Xp21, o que sugeria que o gene mutado na DMD estava localizado nesse segmento e que tinha sido interrompido pelas quebras que originaram as translocações. Esses resultados juntamente com a detecção de deleções em afetados permitiram a clonagem do gene da distrofina (Koenig et al., 1987). A manifestação da DMD, que tem herança recessiva, nas mulheres foi resultado da inativação do cromossomo X normal. Em geral, esse padrão de inativação é observado em portadoras de translocações X- autossomo; o desvio da inativação casual decorre da seleção contrária às células que inativam o cromossomo X translocado, que não são equilibradas do ponto de vista funcional, pois apresentam dissomia parcial do cromossomo X e monossomia parcial do autossomo. O estudo de translocações Xautossomo levou à identificação de muitos outros genes no cromossomo X, relacionados a doenças.

O estudo de rearranjos equilibrados tem sido importante na identificação de genes candidatos a quadros de deficiência mental com herança ligada ao X, especialmente nos casos não sindrômicos, em que os estudos de ligação são dificultados (revisão em Vandeweyer et al., 2009). Zemni et al. (2000), por exemplo, verificaram que o gene TM4SF2 (*Transmembrane 4 Superfamily, Member 2*), mapeado em Xp11.4, tinha sido interrompido pela translocação t(X;2)(p11.4;p21.3) em uma paciente com deficiência mental não sindrômica. A expressão do fenótipo foi resultado da inativação do cromossomo X normal. O gene TM4SF2 é altamente expresso no sistema nervoso central, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo, sendo indicado candidato ao quadro clínico. Isso foi confirmado com a detecção de mutações no gene TM4SF2 em três

famílias em que a deficiência mental não sindrômica tinha sido mapeada no segmento Xp11.4. Posteriormente mutações nesse gene foram descritas em outros homens afetados (Abidi et al., 2002; Maranduba et al., 2004). Além do gene *TM4SF2*, 13 genes candidatos a deficiência mental sindrômica e não sindrômica foram identificados no cromossomo X em estudos de translocações equilibradas. A associação causal está confirmada para 10 deles, pela identificação de mutações em outros pacientes com deficiência mental (revisão em Vandeweyer et al., 2009).

Genes localizados em cromossomos autossômicos também foram identificados em estudos de rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos. Esses genes são sensíveis a dosagem e os quadros clínicos estão associados a haploinsuficiência dos genes interrompidos pelas quebras cromossômicas.

Um dos exemplos mais conhecidos é o do gene da neurofibromatose tipo 1 (NF1; MIM 162200). O estudo de duas translocações com pontos de quebra em 17q11.2 levou à identificação do gene da doença nesse segmento. Schmidt et al. (1987) descreveram uma família com afetados por NF1 associada a uma translocação t(1;17)(p34;q11.2) e Ledbetter et al. (1989) descreveram uma translocação t(17;22)(q11.2;q11.2) em uma afetada por NF1. Wallace et al. (1990) verificaram que o gene *NF1 (neurofibromin 1)* tinha sido interrompido pelas quebras dessas translocações no cromossomo 17 e descreveram uma mutação no gene *NF1* em outro afetado pela doença.

Um exemplo mais recente é a síndrome de Cornelia de Lange (CDLS1; MIM 122470). Tonkin et al. (2004) descreveram uma criança com CDLS1, portadora de translocação equilibrada t(5;13)(p13.1;q12.1). A caracterização do ponto de quebra no cromossomo 5 mostrou que o gene *NIPBL (Nipped-B-like)* tinha sido interrompido. A função desse gene em células de mamíferos não era conhecida, mas o padrão de expressão era compatível com o fenótipo da síndrome. Considerando o gene como candidato, os autores estudaram outros afetados pela síndrome e identificaram nove mutações de ponto no gene *NIPBL*.

O estudo de rearranjos equilibrados tem sido importante também na identificação de genes candidatos a deficiência mental não ligada ao X. Vandeweyer et al. (2009), em sua revisão sobre rearranjos equilibrados entre autossomos, associados a deficiência mental, realacionam 15 genes candidatos, mas apenas *GLI3 (GLI family zinc finger 3)* foi validado, pela presença de mutações em outros indivíduos com deficiência mental (Johnston et al., 2005). Cacciagli et al. (2010) descreveram uma paciente com

deficiência mental moderada a grave e hipotonia, portadora de translocação t(10;13) (p12.1;q12.13). A caracterização do rearranjo mostrou que o gene *ATP8A2 (ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8A, member 2)*, mapeado em 13q12.13, foi interrompido pelo ponto de quebra. Esse foi o único gene alterado pelo rearranjo e a análise por a-CGH não identificou desequilíbrios submicroscópicos. O gene *ATP8A2*, que codifica uma ATPase, é altamente expresso no cérebro humano e de camundongo. Os autores não detectaram mutações nesse gene em uma amostra pequena de 38 pacientes com quadros similares ao da portadora da translocação, isso significando que mutações no gene *ATP8A2* não é causa frequente de deficiência mental, o que também acontece com a maioria dos genes já relacionados a deficiência mental.

A síndrome da deleção terminal 22q13.3 é caracterizada por grave atraso de linguagem, deficiência mental moderada, hipotonia e dismorfismos faciais (MIM 606232). Bonaglia et al. (2001) identificaram uma criança com quadro típico da síndrome, portadora de translocação equilibrada t(12;22)(q24.1;q13.3). O ponto de quebra no cromossomo 22 interrompia o gene *SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3)*, que é altamente expresso no córtex cerebral e cerebelo. Os autores sugeriram que a haploinsuficiência desse gene seria responsável pela síndrome da deleção terminal em 22q13.3. Posteriormente, Wilson et al. (2003) identificaram uma região crítica de 130 kb comum a 46 pacientes, que incluía o gene *SHANK3*.

Além da identificação de genes candidatos para doenças monogênicas, o estudo de rearranjos equilibrados também pode contribuir para elucidar os mecanismos genéticos responsáveis por doenças complexas. Bache et al. (2006) avaliaram o potencial da associação entre translocações equilibradas e essas doenças. Para isso, investigaram a presença de várias doenças complexas em portadores de translocações equilibradas sem histórico de doença de manifestação precoce. Foram considerados como potencialmente associados a doenças complexas, as translocações que cossegregavam com o quadro clínico com um *lod score* significativo ou aquelas translocações cujos pontos de quebra estavam localizados em regiões que já haviam sido associadas às doenças. Os autores identificaram 42 pontos de quebra potencialmente associados a doenças complexas. A associação mais consistente ocorreu entre um ponto de quebra em 1p36 em uma translocação t(1;18)(p36.1;q21) familial que segregava com dislexia. O loco DYX8, também mapeado em 1p36, já havido sido associado à dislexia em estudo de ligação (Tzenova et al., 2004). Outra associação muito provável ocorreu entre uma translocação t(9;17)(q33;q25.3) e distúrbio bipolar

famílial. A associação entre o segmento 17q25.3 e o distúrbio bipolar foi apoiada pela identificação, no mesmo trabalho, de dois pacientes com depressão e pontos de quebra de translocação nesse segmento.

#### • Formação de gene híbrido

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

Apesar de raros, existem relatos de formação de transcritos híbridos associados a translocações em afetados por deficiência mental e malformações congênitas (Nothwang et al., 2001, Ramocki et al., 2003, Backx et al., 2011). Nothwang et al. (2001) descreveram o primeiro caso de formação de gene quimérico não associado a câncer. Uma translocação (1;19)(q21.3;q13.2) *de novo* foi detectada em uma criança com deficiência mental, ataxia e atrofia do cérebro. O rearranjo interrompeu nos cromossomos 1 e 19, respectivamente, os genes *CLK2 (cdc-like kinase 2)* e *PAFAH1B3 (platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 3*). No cromossomo derivativo 1 formou-se um gene híbrido composto pelos exons 2 a 13 do *CLK2* e pelos exons 1 a 4 do *PAFAH1B3*, que codifica uma proteína formada pelos 136 aminoácidos iniciais de PAFAH1B3 e pelo polipeptídio completo e não modificado codificado pelo *CLK2*, já que o exon 1 desse gene não é transcrito. Os autores avaliaram se as funções dos polipeptídios ficaram conservadas no híbrido. O *CLK2* codifica uma quinase que atua na regulação da atividade de fatores de *splicing* ricos em serina e arginina, função

que ficou conservada no polipeptídeo híbrido. Já o *PAFAH1B3* codifica um polipeptídio que se liga a LIS1, formando um complexo com atividade de proteína G heterotrimérica. No polipeptídeo híbrido houve perda de capacidade de ligação a LIS1 e perda da atividade hidrolítica de PAFAH1B3. Os autores sugerem que o fenótipo do paciente está relacionado a haploinsuficiência de *PAFAH1B3*.

Em uma paciente com manifestações neurológicas, incluindo agenesia do corpo caloso, foi identificada uma translocação t(2;9)(p24;q32) (Ramocki et al., 2003). O estudo por FISH e a análise por PCR revelou que dois genes Zn-finger (*KIAA1803* e *ASXL2*), expressos em todos os tecidos, tinham sido interrompidos. Consequentemente, o rearranjo originou um transcrito híbrido em cada cromossomo derivativo. Apesar de os genes *KIAA1803* e *ASXL2* serem candidatos a atuarem no desenvolvimento do sistema nervoso, o mecanismo associado ao fenótipo pode ser a haploinsuficiência de um ou ambos os genes ou de ganho de função dos polipeptídeos híbridos.

Recentemente, Backx et al. (2011) estudaram um paciente com deficiência mental e agenesia do corpo caloso, portador de uma translocação recíproca esporádica t(6;14)(q25.3;q13.2). A caracterização molecular do rearranjo revelou um genótipo complexo com a interrupção dos genes ARID1B (AT rich interactive domain 1B (SWI1like)) e MRPP3 (mitochondrial RNase P protein 3) e consequente formação de genes híbridos nos cromossomos derivativos. A presença dos transcritos híbridos foi detectada por RT-PCR e confirmada por sequenciamento. O mecanismo patogênico mais provável seria a haploinsuficiência de um ou de ambos os genes alterados. O gene ARIRID1B, que atua na remodelagem da cromatina, constituí um bom candidato devido a seu padrão de expressão; além disso, mutações em outro gene da mesma família, KDM5C (lysine (K)-specific demethylase 5C), causa deficiência mental sindrômica e não sindrômica (Jensen et al., 2005). Adicionalmente, um paciente incluído no DECIPHER (registro 4662), é portador de uma microdeleção que inclui apenas o ARIRID1B. O paciente tem atraso de fala, retardo mental e comportamento autístico. No entanto, o ganho de função ou efeito dominante negativo dos transcritos híbridos não pode ser descartado.

Assim, nessas translocações constitutivas, mesmo diante da formação de produtos híbridos, a haploinsuficiência de genes interrompidos pelas quebras cromossômicas parece ser a causa dos quadros clínicos.

#### • Efeito de posição

O efeito de posição é definido como uma alteração da expressão gênica devida a mudança de posição do gene do seu ambiente cromossômico, não estando associado a mutação ou deleção intragênica, mantendo-se portanto, a unidade transcricional e o promotor intactos (Kleinjan e Heyningen, 1998). O efeito de posição pode estar associado a alterações fenotípicas por dois mecanismos principais: heterocromatização ou alteração da relação espacial do gene com elementos reguladores em cis. No último caso, o rearranjo pode afastar um gene de elementos reguladores próprios ou de um elemento de fronteira ou ainda pode aproximá-lo de elementos reguladores de outro gene. Com raras exceções, os genes já associados ao efeito de posição codificam fatores de transcrição que atuam no desenvolvimento, refletindo a importância do controle temporal e espacial da expressão desses genes. O estudo de rearranjos com pontos de quebra 3' ou 5' a esses genes tem contribuído para elucidar a complexidade das regiões reguladoras de genes que atuam no desenvolvimento em mamíferos (revisão em Kleinjan e Lettice, 2008).

Recentemente, Kleinjan e Coutinho (2009) propuseram que doenças causadas por interrupção da arquitetura em cis da região reguladora de um loco gênico sejam chamadas de "cis-ruption disorders". Um exemplo é a displasia campomélica (CD, MIM 114290), doença rara e frequentemente letal, caracterizada por alterações esqueléticas, entre as quais se destacam o encurvamento e a diminuição do comprimento dos ossos longos. A maioria dos afetados são portadores de mutações na região codificadora do gene SOX9 (Sry-related hmg-box gene 9), mapeado no braço longo do cromossomo 17. Todavia existem relatos de afetados que não possuem essas mutações, mas são portadores de rearranjos equilibrados cujos pontos de quebra se localizam upstream ao SOX9. Leipoldt et al. (2007) classificou os pontos de quebra desses rearranjos em *clusters* proximais e distais, localizados, respectivamente, a 50-375 kb e 789-932 kb upstream ao gene SOX9. A curvatura anormal dos ossos longos, característica principal da CD, está ausente nos portadores de rearranjos cujos pontos de quebra se localizam no *cluster* distal. Nesses casos, a doença é chamada de displasia campomélica acampomélica (ACD). Mais recentemente, Benko et al. (2009), descreveram pontos de quebra localizados a mais de 1Mb upstream ao SOX9 em afetados pela sequência de Pierre Robin (PRS; MIM 261800), caracterizada por fissura de palato, micrognatia e glossoptose. A sequência de PRS está frequentemente presente em algumas síndromes mendelianas, incluindo a CD e a ACD. Diante desse cenário,

Gordon et al. (2009) propõem que a região reguladora do *SOX9* se estenda além de 1,23 Mb *upstream* ao gene. Os rearranjos cromossômicos removeriam um ou mais elementos reguladores em cis, levando a alteração da expressão do *SOX9* e aos quadros clínicos.

Outro gene para o qual o efeito de posição já foi proposto é o *PAX6 (paired box* 6), mapeado em 11p13, cuja haploinsuficiência está associada a aniridia (NA, MIM 106210). Já foram descritos indivíduos afetados que eram portadores de rearranjos cromossômicos com pontos de quebra *downstream* ao gene, o mais distal localizando-se a 125 kb do último exon do *PAX6* (Fantes et al., 1995; Lauderdale et al., 2000; Crolla e van Heyningen, 2002). Todos os pontos de quebra se localizam no último intron do gene *ELP4* [*elongation protein 4 homolog (S. cerevisiae)*], que é expresso em todos os tecidos. Estudos em camundongos indicam que a interrupção do *ELP4* não contribui para o fenótipo.

O rearranjo pode também aproximar o gene de elementos reguladores de outro gene. Um exemplo clássico é o linfoma de Burkitt (BL; MIM 113970), caracterizado pela proliferação monoclonal de linfócitos-B5; em 80% dos casos a translocação t(8:14)(q24:q32) está presente na linhagem tumoral. No cromossomo derivativo 14 o gene *c-myc* [*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*], translocado do cromossomo 8, está justaposto aos de imunoglobulina e passa a estar sob o controle de seus reguladores, tendo sua expressão exacerbada. O gene *c-myc* atua em vários aspectos da biologia celular incluindo proliferação, diferenciação, metabolismo e apoptose. A superexpressão do gene *c-myc* no cromossomo derivativo (14) altera essas funções e, consequentemente, desenvolve-se o tumor.

Além da alteração de elementos reguladores em cis, o rearranjo cromossômico pode influenciar a expressão de gene(s) próximo(s) ao ponto de quebra devido a alteração da estrutura da cromatina. A heterocromatização pode ocorrer quando o rearranjo aproxima uma região de eucromatina a uma região de heterocromatina; o estado mais condensado do DNA da heterocromatina pode avançar para a região eucromática justaposta, silenciando genes, de forma aleatória, mas estável. Rees et al., (1994) descreveram uma translocação em mosaico, associada a β-talassemia, na qual o gene da cadeia β da hemoglobina foi translocado intacto do cromossomo 11 para o cromossomo 22, junto ao centrômero. Os autores sugerem que o gene estaria silenciado devido à proximidade com a região pericentromérica, de cromatina constitutiva.

#### • Dissomia uniparental (UPD)

A dissomia uniparental (UPD) é definida pela presença no cariótipo de um par de cromossomos homólogos ou de segmentos cromossômicos homólogos com mesma origem parental. É classificada como isodissomia uniparental quando o mesmo cromossomo ou segmento cromossômico está presente em duplicata. Quando são herdados dois cromossomos homólogos diferentes ou parte deles de um mesmo genitor, tem-se uma heterodissomia uniparental.

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

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

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

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

#### • Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos

Os rearranjos cromossômicos equilibrados são detectados por técnicas de citogenética clássica, dessa forma são considerados equilibrados aqueles rearranjos nos quais não são identificadas alterações maiores que 5 Mb, que podem ser visualizadas ao microscópico óptico. A partir de 2005, foram publicados vários trabalhos que aplicam array-CGH no estudo de rearranjos equilibrados associados a quadros clínicos (Gribble et al., 2005, De Gregori et al., 2007, Baptista et al., 2008; Fantes et al., 2008; Higgins et al., 2008; Sismani et al., 2008; Schluth-Bolard et al., 2009). Esses estudos têm mostrado que microdeleções e microduplicações de segmentos genômicos podem ser responsáveis por parte significativa dos fenótipos alterados associados a esses rearranjos (Tabela 1). Estima-se que 33,5% dos pacientes estudados eram portadores de desequilíbrios submicroscópicos.

Apesar de a maioria dos desequilíbrios submicroscópicos estarem localizados nos pontos de quebra que originam os rearranjos (15,5%), 9% estavam fora deles, mas localizados nos cromossomos rearranjados. As alterações nos pontos de quebras podem ter ocorrido durante a formação dos rearranjos, enquanto que aquelas distantes aos pontos de quebra podem não estar associadas aos rearranjos ou refletir um mecanismo mais complexo em sua formação (Higgins et al., 2008). Surpreendentemente, em 9% dos rearranjos equilibrados estudados foram detectadas alterações submicroscópicas em cromossomos que não participavam dos rearranjos (Tabela 1).

Como mostra a Tabela 1, houve diferenças nas frequências de alterações submicroscópicas entre os vários estudos que, pelo menos em parte, são atribuíveis às diferentes metodologias utilizadas. As menores frequências de alterações foram observadas nos trabalhos que utilizaram *arrays* de 1 Mb (Fantes et al., 2008; Sismani et al., 2008). Interessantemente, apenas um estudo (Fantes et al., 2008) detectou ganho de segmentos, todos os outros desequilíbrios sendo deleções. Isso pode ser resultado do mecanismo de formação dos rearranjos, levando preferencialmente à perda de material. Por outro lado, esse resultado pode refletir a menor patogenicidade das duplicações, que assim não estariam presentes nos indivíduos selecionados para os estudos (Schluth-Bolard et al., 2009).

O grande desafio, no entanto, consiste em determinar quais desequilíbrios, de fato, estão associados aos quadros clínicos, já que variações no número de cópias (CNV) também são encontradas em indivíduos da população geral (Redon et al., 2006).

Estudo	a-CGH (plataforma)	Portadores de desequilíbrios submicroscópicos	Desequilíbrio no ponto de quebra	Desequilíbrio em cis ao ponto de quebra	Desequilíbrio não associados ao rearranjo
1	BAC PAC 3500 clones/array painting	5/10	1/10	1/10	3/10
2	Oligo 44B/244K (Agilent)	11/27	7/27	1/27	3/27
3	Sanger 30K Whole Genome TilePath	4/14	3/14	1/14 (*)	1/14
4	1Mb 'CytoChip' BlueGnome	6/46	3/46	3/46	0/46
5	2600 BAC arrays/244K (Agilent)	6/11	2/11	3/11	1/11
6	Cytochip 1-Mb BlueGnome	3/12	1/12	1/12	1/12
7	Oligo 44K/244K (Agilent)	16/33	7/16	4/33	5/33

Tabela 1. Perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos em portadores de rearranjos cromossômicos equilibrados.

Estudo: (1) Gribble et al. (2005); (2) De Gregori et al. (2007); (3) Baptista et al. (2008); (4) Fantes et al. (2008); (5) Higgins et al. (2008); (6) Sismani et al.(2008); (7) Schluth-Bolard et al. (2009) (\*)Paciente portador de desequilíbrios no ponto de quebra e em cis ao rearranjo

A caracterização de rearranjos aparentemente equilibrados não associados a quadros clínicos, evidenciando no que diferem daqueles associados com quadros clínicos, pode contribuir para a compreensão dessas associações. Baptista et al. (2008) e Fantes et al. (2008) analisaram translocações cromossômicas equilibradas presentes tanto em indivíduos normais quanto em portadores de sinais e sintomas clínicos. Mostraram que indivíduos fenotipicamente normais podem ter genes interrompidos pelos rearranjos, que não seriam sensíveis a dosagem ou que se localizam em regiões de variações no número de cópias (CNV). Entretanto, somente em rearranjos equilibrados associados a anormalidades clínicas foram detectados desequilíbrios submicroscópicos

nos pontos de quebra ou em cis a eles nos cromossomos rearranjados. Dessa forma os desequilíbrios submicroscópicos em cis podem ser responsáveis por grande parte dos fenótipos clínicos observados em pacientes com rearranjos equilibrados. Estabelecer a relação causal dessas perdas e ganhos de segmentos cromossômicos com os fenótipos dos portadores e entender sua relação com os rearranjos equilibrados associados a eles são desafios atuais.

Cox et al. (2003) estudaram uma criança com deficiência mental não sindrômica portadora de translocação t(X;8)(q28;q12). No ponto de quebra do cromossomo X foi detectada uma duplicação de 650 kb. Nessa região estão mapeados 11 genes, sendo nove expressos no cérebro. Os autores atribuem o quadro clínico a dosagem alterada de gene(s) mapeado(s) na região duplicada do cromossomo X.

Mademont-Soler et al. (2010) estudaram uma paciente com alterações faciais, malformações de Dandy-Walker, perda auditiva e hiperlaxia de pele, que também era portadora da translocação t(6;13)(q23;q32). O a-CGH revelou uma deleção de 2,5 Mb no ponto de quebra do cromossomo 13. O quadro clínico da paciente sobrepõe-se àqueles já descritos em portadores de deleções em 13q32, indicando que a perda desse segmento contribui para o fenótipo. Os autores sugerem que os genes *ZIC2 (Zic family member 2)* e *ZIC5 (Zic family member)*, mapeados nesse segmento, são os principais candidatos ao quadro clínico.

Assim como em rearranjos cromossômicos *de novo*, a análise por a-CGH mostra que rearranjos cromossômicos herdados também podem estar associados a desequilíbrios submicroscópicos nos cromossomos derivativos distantes aos pontos de quebra. Lybaek et al. (2008) utilizaram array-CGH e FISH para investigar uma inversão no braço longo do cromossomo 14 associada, em uma família, ao quadro de esferocitose, dificuldades de aprendizagem/deficiência mental. Foi identificada, em um dos afetados, uma deleção de 2,1 Mb mapeada a 1,6 Mb do ponto de quebra telomérico da inversão. A mãe e o tio materno também eram portadores da deleção. Nessa região estão mapeados 16 genes, dentre os quais, o gene *SPTB (beta-spectrin)*, em que mutações de perda de função já foram identificadas em pacientes com esferocitose. Os autores atribuem a dificuldades de aprendizagem/deficiência mental observada na família à haploinsuficiência de outro(s) gene(s) mapeado(s) na região da deleção no cromossomo 14, sendo os genes *PLEKHG3 [pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member]* e *MAX (MYC associated factor X)* os principais candidatos, devido à alta expressão no sistema nervoso. Como a avó do probando e outros prováveis portadores da inversão haviam falecido, os autores não puderam determinar se a deleção e a inversão originaram-se ou não independentemente.

Papadopoulou et al. (2010) investigaram um paciente com deficiência mental e malformações congênitas múltiplas, que era portador de translocação equilibrada t(9;15)(q31;q26). Aplicando a-CGH, foi identificada uma duplicação de 5-6 Mb, em 9q34 e três deleções de 8,1 a 12,2 Mb, no cromossomo 15. A validação desse resultado por FISH mostrou que o segmento duplicado do cromossomo 9 estava inserido no cromossomo derivativo 15 e que as deleções estavam no cromossomo 15 derivativo, portanto em cis ao ponto de quebra da translocação. Tanto a duplicação de gene(s) mapeado(s) no segmento duplicado do cromossomo 9, quanto a haploinsuficiência de gene(s) localizados(s) nos segmentos deletados do cromossomo 15 podem contribuir para o fenótipo.

Como a análise por *microarrays* permite a investigação global do genoma, pode detectar, em portadores de rearranjos equilibrados, alterações em cromossomos que não participam desses rearranjos. Em determinados casos, os rearranjos cromossômicos e as alterações detectadas em outros cromossomos podem contribuir para o fenótipo. Hayashi et al. (2007) descreveram uma translocação equilibrada t(5;13)(p13.1;q12.1) em uma criança portadora de síndrome de Cornelia de Lange, associada a outros sinais. O gene *NIPBL*, cuja haploinsuficiência causa a síndrome, foi interrompido pela translocação. Aplicando a-CGH, os autores identificaram uma deleção de 1 Mb no braço longo do cromossomo 1, incluindo seis genes (*FIBL-6, PRG4, TPR, OCLM, PDC* e *PTGS2*) e atribuíram as características não típicas de CDLS à haploinsuficiência de gene(s) mapeado(s) nesse segmento.

Entretanto, o rearranjo pode estar de fato equilibrado e o fenótipo ser causado por perda ou ganho de segmentos de cromossomos que não participam dele. Morales et al. (2009) descreveram uma paciente com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, retardo de crescimento, dismorfismos faciais, clinodactilia e miopia. A criança era portadora de inversão *de novo* no braço longo do cromossomo 7, inv(7)(q21.12q34). Genes próximos aos pontos de quebra não puderam ser associados aos sinais clínicos. Por meio de a-CGH foi identificada uma deleção no braço curto do cromossomo 3 del(3)(p12.3p13). As manifestações clínicas da paciente sobrepunham-se às de outros portadores de deleções nesse segmento cromossômico, apontando para a haploinsuficiência de gene(s) mapeado(s) no segmento deletado do cromossomo 3 como causa do quadro clínico.

## **II. OBJETIVOS**

#### **II. OBJETIVOS**

Com este estudo, nosso objetivo foi identificar mecanismos pelos quais rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados possam estar associados de maneira causal a determinados quadros clínicos. Para isso estudamos rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados detectados em pacientes com malformações congênitas, atraso de desenvolvimento neuropsicotomor ou comprometimento intelectual. Os pontos de quebra foram mapeados por FISH de segmentos mapeados nos pontos de quebra identificados por bandamento G. Microdeleções e microduplicações foram investigadas por array-CGH. As informações obtidas foram relacionadas aos mapas físicos do genoma humano e às características clínicas dos pacientes na busca de genes candidatos.

**III. PACIENTES E MÉTODOS** 

#### III. PACIENTES E MÉTODOS

#### **III.1 Pacientes**

Os indivíduos selecionados para este estudo foram identificados como portadores de rearranjos aparentemente equilibrados no Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (LGH-IB-USP), para onde foram encaminhados por diferentes serviços médicos, para diagnóstico e aconselhamento genético. Para inclusão no estudo, os pacientes ou seus responsáveis legais, foram informados sobre a pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 096/2009).

A amostra foi constituída de seis translocações equilibradas, cinco delas não herdadas e uma, segregando na família com o quadro clínico.

#### III.2 Métodos

#### III.2.1 Estudo cromossômico

#### • Preparações cromossômicas

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

#### • Identificação dos rearranjos cromossômicos

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

#### • Mapeamento dos pontos de quebra

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

As bactérias com os clones de interesse foram cultivadas em meio LB (1% bactotriptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl; pH 7,5), contendo o antibiótico para seleção de bactérias resistentes com os segmentos de interesse. Para a extração dos clones, utilizou-se o kit Illustra<sup>TM</sup> PlasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare, New Jersey, EUA). As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina ou digoxigenina por meio, respectivamente, da incorporação dos nucleotídeos Bio-16-dUTP ou Dig-11-dUTP, utilizando os kits de marcação Biotin-Nick Translation Mix ou Dig-Nick Translation (ambos da Roche Applied Science, Manheim, Alemanha), conforme
instruções do fabricante. As sondas foram desnaturadas a 95°C em meio de hibridação (50% formamida, e 10% dextran sulfato, em 2xSSC). A supressão de sequências repetitivas foi feita com DNA humano Cot-1 (Invitrogen). O DNA dos cromossomos foi desnaturado em 70% formamida/2xSSC a 72°C. A hibridação foi realizada em câmara úmida por 48 a 72 horas a 37°C. Para a detecção das sondas marcadas com biotina, utilizamos avidina conjugada a FITC e para a detecção de sondas marcadas com digoxigenina, utilizamos anti-digoxigenina conjugada a rodamina. As lâminas foram montadas em Vectashield Mouting Medium (Vector Laboratories, Califórnia, EUA) contendo o corante DAPI (0,8  $\mu$ g/mL) (Sigma, Saint Louis, EUA). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Carl Zeiss, Alemanha). Para a documentação, as imagens foram capturadas por câmara de CCD e processadas, utilizando-se o software ISIS (MetaSystem, Alemanha).

## III.2.2 Busca de microdeleções e duplicações

A presença de desequilíbrios genômicos submicroscópicos foi investigada pela técnica de array-CGH. Utilizamos nesse estudo a plataforma Human Genome CGH Microarray Kit 2x105A (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). No estudo de dois pacientes foi utilizado o SurePrint G3 Human CGH 8x60K (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). O primeiro desses oligoarrays contém duas áreas com aproximadamente 105.000 oligonucleotídeos de 60 pb e o segundo contém oito áreas com aproximadamente 60.000 oligonucleotídeos de 60 pb. Os procedimentos de purificação das amostras, hibridação e lavagem foram realizados conforme descrito pelo fabricante (Agilent Technologies), com modificações. Na etapa de digestão do DNA genômico, para a plataforma de 105A, foram utilizados 800 ng de DNA, em volume final de 22 µL de reação contendo 5 U de cada uma das enzimas Alu I e Rsa I, 1,7 µg de BSA (albumina de sangue bovino) e Buffer C 10X (10% do volume final). Para a plataforma 60K, foram utilizados 500 ng de DNA genômico, em volume final de 13 µL de reação, contendo 5 U de cada uma das enzimas Alu I e Rsa I, 1,0 µg de BSA e Buffer C 10X (10% do volume final). As amostras foram digeridas por duas horas a 37°C em estufa, seguida da inativação das enzimas por 20 min a 65°C. Para a marcação das amostras foram utilizados os kits Fluorescent Labelling System (BlueGnome, Cambridge, UK), para a plataforma de 105A e Agilent Labelling mix (Agilent Technologies), para a plataforma 60K. Os procedimentos e quantidades de cada reagente seguiram as instruções dos fabricantes dos kits. Em resumo, foram adicionados random primers à reação da digestão, seguindo-se desnaturação do DNA por cinco minutos a 95°C e incubação em gelo por cinco minutos. Para a marcação, foi adicionada uma mistura contendo tampão, dNTP, Cy3-dCTP (para a amostra teste) ou Cy5-dCTP (para a amostra referência) e enzima Klenow. As amostras foram mantidas por duas horas a 37°C em estufa, procedendo-se em seguida à inativação da enzima por 10 min a 65°C. As amostras marcadas foram purificadas, utilizando-se o kit  $Illustra^{TM}$ ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro Columns (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante. Nas amostras analisadas na plataforma 60K, foram adicionados 25 µL de TE, antes da etapa de purificação. A quantificação do DNA genômico marcado e a atividade específica dos fluorocromos Cy3-dCTP e Cy5-dCTP foi determinada no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Para a etapa de precipitação 50 µL do DNA teste (marcado com Cy3) e 50 µL do DNA referência (marcado com Cy5) foram adicionados a 5 µg (plataforma de 60K) ou 25 µg (plataforma 105A) de Human Cot-1 DNA (Invitrogen), para o volume final de 105 µL (plataforma 60K) ou 125 µL (plataforma 105A). Em seguida, foram adicionados NaAc (3 M, pH 5,0; 10% do volume final) e etanol 100% gelado (2,5X o volume final). As amostras foram precipitadas por 15 min a -80°C ou por duas horas a -20°C. Após centrifugação a 13.200 rpm, por 15 min a 4°C, adicionou-se etanol 70% gelado às amostras e procedeu-se a centrifugação por mais cinco minutos a 13.200 rpm, descartando-se o sobrenadante. Seguiu-se nova centrifugação por um minuto, descartando-se o sobrenadante. O DNA marcado foi então ressuspendido em TE previamente aquecido a 72°C e mantido por cinco minutos a 72°C, seguindo-se nova ressuspensão em vórtex. Foram adicionadas as soluções blocking solution 10X e hybridization buffer 2X e procedeu-se à desnaturação por três minutos a 95°C e 30 min a 37°C, em banho-maria. Adicionou-se todo o volume das amostras às lamelas da lâmina de suporte do *microarray* e colocou-se a lâmina de *microarray* sobre ela. As amostras foram então hibridadas a 65°C por 16-48 h. A lâmina de microarray foi mergulhada em Buffer 1 por cinco minutos, depois em Buffer 2 (previamente aquecido a 37°C) por um minuto, seguindo 10 s em acetonitrila (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 30 s em Stabilization Drying Solution. As imagens do array obtidas com o Agilent High-Resolution Microarray scanner, foram processadas e analisadas, utilizando o pacote de programas Feature Extraction e Agilent Genomic Workbench (ambos da *Agilent Technologies*), usando o algoritmo estatístico ADM-2 e limiar de sensibilidade 6,7. Apenas as alterações abrangendo no mínimo três oligonucleotídeos consecutivos com razão  $\log_2$  alterada foram consideradas pelo programa como possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico. Usando esses critérios, os tamanhos mínimos das CNV detectadas pelas plataformas 60K e 105A são de, respectivamente, 100-160 Kb e 60-90 Kb.

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

## III.2.3 Padrão de inativação do cromossomo X

Determinamos o padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico da paciente portadora de translocação t(X;22), com base na metilação do gene AR e também citologicamente em metáfases, após incorporação de 5-BrdU.

#### • Metilação do gene AR

O estudo do padrão de inativação foi realizado, analisando-se a metilação da repetição polimórfica CAG do gene *AR* (*Androgen Receptor Gene*; Xq11-12), conforme descrito por Allen et al. (1992), com modificações. Próximo à repetição CAG existe um sítio de restrição da enzima *Hpall*, que se encontra metilado apenas no X inativo. A análise do padrão de inativação do cromossomo X é realizada amplificando-se a repetição CAG a partir de DNA genômico submetido ou não a digestão com a enzima *HpalI*. Como a enzima *HpalI* apenas corta os sítios de restrição desmetilados, ou seja dos alelos do gene *AR* localizados no cromossomo X ativo, esses alelos não são amplificados. Duas amostras de 1.000 ng de DNA foram tratadas simultaneamente: uma amostra foi submetida à digestão com 20 U da enzima *HpalI* (Invitrogen), em volume final de 20  $\mu$ l de reação, por 16 h a 37°C; após a digestão, a enzima foi inativada, incubando-se as amostras a 95°C for cinco minutos; a outra amostra foi incubada, na

ausência da enzima *Hpall*. A amplificação foi realizada em um volume de 30 µl de reação de PCR com quatro µl do produto digerido ou não digerido, 1,5 U de Taq polymerase, Buffer 1X, 250 µM de cada deoxiribonucleotídeo, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% DMSO e 15 pmoles de cada primer (*forward*-FAM: 5' gct gtg aag gtt gct gtt cct cat 3' e *reverse*: 5' tcc aga atc tgt tcc aga gcg tgc 3'). As condições de ciclagem foram um ciclo de 95°C (cinco min), 28 ciclos de 95°C (45 s), 60°C (30 s), 72°C (30 s), extensão final a 72°C (10 min). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese no aparelho *ABI 310 DNA Analyzer* e analisados com o *software GeneMapper* (Applied Biosystems,Califórnia, EUA). A razão de inativação foi determinada utilizando-se os valores dos picos de amplificação dos alelos digeridos e não digeridos: (phd1/phu1)/(phd1/phu1)+(phd2/phu2), em que phd1 = alelo menor após digestão, phu1 = alelo menor não digerido, phd2 = alelo maior após digestão e phu2 = maior alelo não digerido (Bittel et al., 2008).

## • Incorporação de 5-BrdU

O padrão de inativação do cromossomo X foi analisado em metáfases de linfócitos de sangue periférico, após incorporação de 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU, Sigma), seguida de coloração com acridina laranja. O tratamento com 5-BrdU, na concentração final de 200 µg/mL, foi realizado nas sete horas finais de cultivo dos linfócitos. Após serem mantidas em estufa a 37°C, por sete a quinze dias, as lâminas com o material foram submetidas a banhos de etanol (90%, 70% e 50%), lavadas com água destilada e secas ao ar. Em seguida foram cobertas por um filme de acridina laranja (0,5 mg/mL em tampão fosfato) por 20 min. Após serem lavadas com água destilada e secas ao ar, as lâminas foram montadas em tampão fosfato, pH 6,8. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 (Carl Zeiss). Os cromossomos X normal e translocado foram identificados com base em sua morfologia e padrão de bandas R. Para a documentação, as imagens foram capturadas por câmera CCD e processadas utilizando-se o software ISIS (MetaSystem, Alemanha).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

# IV.1 Translocações cromossômicas que provavelmente afetam a expressão do gene *SOX9*

## IV.1.1 Translocação t(7;17)(p13;q24)

#### • Aspectos Clínicos

A paciente foi encaminhada ao Serviço de Aconselhamento Genético do LGH-IB-USP, aos 12 anos de idade, por apresentar baixa estatura (136,5 cm; 3<sup>o</sup> percentil), atraso na idade óssea e anormalidades esqueléticas que incluíam escoliose toracolombar, 11 pares de vértebras torácicas, deformidades do tórax e da cintura escapular consequentes a hipoplasia dos arcos costais superiores (principalmente dos primeiros quatro pares). O desenvolvimento intelectual era normal para a idade. Seus pais eram clinicamente normais. Nasceu a termo, após cesariana, devido a apresentação pélvica. Nos primeiros seis anos de vida, teve bronquites recorrentes.

A análise cromossômica, após bandamento G, revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço curto do cromossomo 7 e o braço longo do cromossomo 17 - t(7;17)(p13;q24) (Figura 4). O exame cromossômico de seus pais revelou cariótipos normais.



**FIGURA 4.** t(7;17)(p13;q24): Ideograma (ISCN 2009; cariótipo com 550 bandas G) dos cromossomos 7, 17 e dos derivativos der(7) e der(17). As setas indicam os pontos de quebra mapeados após bandamento G.

## • Mapeamento dos pontos de quebra da t(7;17) por FISH

Realizamos a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra determinados pela análise após bandamento G (Tabelas 2 e 3). O ponto de quebra do cromossomo 7 foi mapeado entre os clones RP11-256F18 (chr7:42,933,463-43,097,151, Human GRCh36 Assembly, hg18) e RP5-1032B10 (chr7:43,150,215-43,272,694), um segmento de 53 kb (chr7:43,097,151-43,150,215) (Figura 5). No cromossomo 17 o ponto de quebra foi localizado no clone RP11-261A13 (chr17:66,711,133-66,856,750), com sinais de hibridação nos cromossomos der(17) e der(7), neste ligeiramente maior (Figura 6A). O clone RP11-261A13, também contém o ponto de quebra (Figura 6A). O clone RP11-261A13, também contém o ponto de quebra (Figura 6A). O clone RP11-433D1 (chr17:66,773,681-66,947,354), que se sobrepõe mais distalmente ao clone RP11-1087C16, mostrou sinal de hibridação apenas no cromossomo der(7) (Figura 6A). Esses resultados permitiram delimitar o ponto de quebra no cromossomo 17 em um segmento de 62 kb (chr17: 66,771,133-66,773,681, hg18) (Figura 6B).

## • Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH

A análise por a-CGH, usando a plataforma 105A (*Agilent*), não detectou desequilíbrios submicroscópicos associados ou não aos pontos de quebra.

#### • Genes mapeados nos segmentos dos pontos de quebra

No cromossomo 7, o gene *HECW1* (*HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1*) está no segmento delimitado para a quebra e pode ter sido interrompido. O gene codifica uma ligase de ubiquitina E3 que é detectada principalmente em tecidos neurais. Miyazaki et al. (2004) mostraram que a proteína HECW1 liga-se à proteína mutante SOD1, que é responsável pela morte de neurônios motores característica da esclerose lateral amiotrófica (ALS; MIM 105400). Os autores sugerem que a proteína atue no controle da qualidade das proteínas celulares por meio da eliminação de proteínas com dobramento alterado. Nenhum gene está mapeado no segmento do ponto de quebra do cromossomo 17.

Clone	Posição (hg 18; Build 36)	Sinal de hibridação
RP5-1178G13	chr7:40,440,824-40,626,764	der(17)
RP11-100C21	chr7:42,647,635-42810331	der(17)
RP11-256F18	chr7:42,933,463-43,097,151	der(17)
RP5-1032B10	ch7:43,150,215-43,272,694	der(7)
RP11-36H20	chr7: 43,453,095-43,594,872	der(7)
RP11-111G20	chr7:45,249,962-45,415,314	der(7)

Tabela 2: Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 7.

Tabela 3: Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 17.

Clone	Posição (hg 18; Build 36) Sinal de hibridaçã	
RP11-74H8	chr17: 62,106,611-62,246,769	der(17)
RP11-283E7	chr17:64,303,771-64,454,324	der(17)
RP11-238F2	chr17: 66,270,805-66,332,110	der(17)
RP11-1003J3	chr17: 66,328,112-66,530,874	der(17)
RP11-420O5	chr17: 66,528,875-66,592,885	der(17)
RP11-1087C16	chr17:66,654,574-66,827,652	der(7);der(17)
RP11-261A13	chr17: 66,711,133-66,856,750	der(7);der(17)
RP11-433D11	chr17:66,773,681-66,947,354	der(7)
RP11-103M22	chr17: 66,856,751-67,000,180	der(7)
RP11-475k15	chr17:66,867,169-67,056,520	der(7)
RP11-203M16	chr17: 67,004,133-67,092,253	der(7)
RP11-134J16	chr17:67,043,280-67,209,694	der(7)
RP11-166M16	chr17: 67,169,003-67,327,047	der(7)
RP11-171G2	chr17: 68,199,364-68,366,895	der(7)





FIGURA 5. t(7;17)(p13;q24) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 7: (A) Hibridação *in situ* fluorescente dos clones do cromossomo 7 RP11-256F18 e RP5-1032B10. Os sinais de hibridação foram visualizados, respectivamente, no cromossomo der(17) e no cromossomo der(7). Assim, o ponto de quebra situa-se no segmento de 53 kb delimitado por esses clones. (B) Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 7, delimitado pelo retângulo de linhas interrompidas; estão indicados o gene *HECW1* mapeado nesse segmento e os clones que delimitaram o ponto de quebra; em verde, o clone distal com sinal de hibridação no cromossomo der(17) e em azul, o clone proximal, com sinal de hibridação no cromossomo der (7). Adaptado de *UCSC, hg 18*.

#### **RP11-261A13**



RP11-1087C16

RP11-433D11



B.





#### IV.1.2 Translocação t(17;20)(q24.3;q11.2)

#### • Aspectos Clínicos

Criança do sexo masculino, nascida a termo de país clinicamente normais. Ao nascimento, o menino apresentou taquipnéia e tiragem subdiafragmática moderada, com dependência de oxigênio. Apresentava fendas em palato duro e mole, úvula bífida e retrognatia discreta. A suspeita diagnóstica foi de sequência de Pierre Robin. Tomografia computadorizada de tórax revelou apenas imagem de condensação em base direita. Nasofibroscopia revelou desvio de septo, sem queda de língua ou espasmos laríngeos. A polissonografia registrou apneias obstrutivas centrais e de pequena duração. Recebeu alta hospitalar com um mês de idade, sendo readmitido um mês depois com quadro de desconforto respiratório, palidez cutânea e queda do estado geral. Suspeitou-se de bronquiolite ou pneumonia aspirativa. Evoluiu com apneia e parada cardiorrespiratória, seguida de reversão do quadro, após massagem cardíaca, aparentemente sem sequelas neurológicas. O exame físico, além da fissura palatina, revelou deformidade da caixa torácica, incluindo pectus carinatum, hemivértebras e escoliose progressiva, com limitação da expansão do tórax. Aos quatro meses e meio, pesava 6.600 g ( $<3^{\circ}$  percentil) e media 59 cm ( $<3^{\circ}$  percentil). Nessa ocasião, o Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, onde a criança era acompanhada, nos enviou sangue, com a solicitação de exame do cariótipo. Os pais nos informaram que, aos nove meses de idade, a criança continuava apresentando quadro de insuficiência respiratória. Não sentava, mas tinha bom contato com o ambiente.

A análise cromossômica, após bandamento G, revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço longo do cromossomo 17 e o braço longo do cromossomo 20, t(17;20)(q24.3;q11.2) (Figura 7). O exame cromossômico de seus pais revelou cariótipos normais.



**FIGURA 7.** t(17;20)(q24.3;q11.2): Ideograma (ISCN, 2009; cariótipo com 550 bandas G) dos cromossomos 17, 20 e dos derivativos der(17) e der(20). As setas indicam os pontos de quebra mapeados após bandamento G.

#### • Mapeamento dos pontos de quebra da t(17;20) por FISH

Realizamos a hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra determinados pela análise após bandamento G (Tabelas 4 e 5). No cromossomo 17, o ponto de quebra foi localizado no clone RP11-203M16 (chr17: 67,004,133-67,092,253, Human GRCh36 Assembly, hg18), com sinais de hibridação nos cromossomos der(17) e der(20); o clone produziu um sinal de hibridação cruzada nos braços curtos dos cromossomos 20 e der(20) (Figura 8A). O clone RP11-474K15 (chr17:66,867,169-67,056,520), que se sobrepõe parcialmente ao clone RP11-203M16, também contém o ponto de quebra com sinal mais intenso no cromossomo der(17), indicando que esse cromossomo contém a maior parte da sequência do clone (Figura 8A). O clone RP11-134J16 (chr17:67,043,280-67,209,694) que se sobrepõe distalmente ao clone RP11-203M16, mostrou sinal de hibridação no cromossomo der(20), mas não no der(17); um segundo sinal de hibridação cruzada foi detectada nos braços curtos dos cromossomos 20 e der(20) (Figura 8A). Esses resultados permitiram delimitar o ponto de quebra no cromossomo 17 em um segmento de 39 kb (chr17: 67,004,133-67,043,280) (Figura 8B).

O ponto de quebra do cromossomo 20 foi mapeado no clone RP11-234K24 (chr20:34,193,483-34,346,674), um segmento de 176 kb. O sinal mais intenso no cromossomo der(20) indica que esse cromossomo contém a maior parte da sequência do clone (Figura 9A). A hibridação dos clones RP11-10K23 (chr20:34,042,596-34,228,427) e RP11-369K4 (chr20:34,112,567-34,295,940), que se sobrepõem ao clone RP11-234K24 em sua região proximal, produziu sinais no cromossomo der(20), mas não no cromossomo der(17) (Figura 9A). Assim, o ponto de quebra no cromossomo 20 localiza-se em um segmento de 50 Kb (chr20:34,295,940-34,346,674) contido no clone RP11-234K24 (Figura 9B).

#### • Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH

A análise por a-CGH, usando a plataforma 105A (*Agilent*), não detectou desequilíbrios submicroscópicos associados ou não ao ponto de quebra.

## • Genes mapeados no segmento dos pontos de quebra

No cromossomo 20, o C200rf4 (*chromosome 20 open reading frame 4*), sem função conhecida, está mapeado no segmento de 50 kb delimitado para o ponto de quebra. Nenhum gene está localizado no segmento de 39 kb do ponto de quebra do cromossomo 17.

Clone	Posição (hg 18; Build 36)	Sinal de hibridação
RP11-74H8	chr17: 62,106,611-62,246,769	der(17)
RP11-283E7	chr17:64,303,771-64,454,324	der(17)
RP11-238F2	chr17: 66,270,805-66,332,110	der(17)
RP11-1003J3	chr17: 66,328,112-66,530,874	der(17)
RP11-42005	chr17: 66,528,875-66,592,885	der(17)
RP11-1087C16	chr17:66,654,574-66,827,652	der(17)
RP11-261A13	chr17: 66,711,133-66,856,750	der(17)
RP11-433D11	chr17:66,773,681-66,947,354	der(17)
RP11-103M22	chr17: 66,856,751-67,000,180	der(17)
RP11-475k15	chr17:66,867,169-67,056,520	der(17);der(20)
RP11-203M16	chr17: 67,004,133-67,092,253	der(17);der(20)
RP11-134J16	chr17:67,043,280-67,209,694	der(20)
RP11-166M16	chr17: 67,169,003-67,327,047	der(20)
RP11-171G2	chr17: 68,199,364-68,366,895	der(20)

Tabela 4: Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 17.

Tabela 5: Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 20.

Clone	Posição (hg 18;Build 36)	Sinal de hibridação
RP11-410N8	chr20:30,605,464-30,669,072	der(20)
RP11-353C18	chr20:33,649,510-33,824,849	der(20)
RP11-10K23	chr20:34,042,596-34,228,427	der(20)
RP11-369K4	chr20:34,112,567-34,295,940	der(20)
RP11-234K24	chr20:34,193,483-34,346,674	der(17);der(20)
RP3-469A13	chr20:34,885,946-34,886,508	der(17)

#### RP11-203M16



**RP11-474K15** 

**RP11-134J16** 



**FIGURA 8. t(17;20)(q24.3;q11.2 - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 17: (A)** Hibridação *in situ* fluorescente dos clones do cromossomo 17, RP11-203M16 , RP11-474K15 e RP11-134J16. Os sinais de hibridação dos clones RP11-203M16 e RP11-474K15 foram visualizados nos cromossomos der(20) e der(17), indicando que o ponto de quebra está contido na sequência comum aos dois clones. O sinal de hibridação do clone RP11- 134J16 foi visualizado no cromossomo der(20). (**B**) Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 17, delimitado pelo retângulo de linhas interrompidas; em vermelho, clones com sinais de hibridação nos cromossomos der(17) e der(20) e em azul, clone com sinal de hibridação no cromossomo der(20), mas não no der(17). O ponto de quebra situa-se no segmento de 39 kb que se sobrepõe nos clones RP11-203M16 e RP11-474K15, delimitado pela porção do clone RP11-474K15 que não se sobrepõe ao clone RP11-203M16 e pelo clone RP11-134J16. Adaptada de *UCSC, hg 18*.



**FIGURA 9.** t(17;20)(q24.3;q11.2) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 20: (A) Hibridação *in situ* fluorescente dos clones do cromossomo 20: RP11-234K24, RP11 10K23 (sinal vermelho) e RP11 369K4 (sinal verde). Os sinais de hibridação do clone RP11-234K24 foram visualizados nos cromossomos der(17) e der(20), indicando que o clone contém o ponto de quebra. Os clones RP11-10K23 e RP11-369K4, que se superpõem ao clone RP11-234K24 hibridaram com o der(20), mas não com o der(17). (B) Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 20, delimitado pelo retângulo de linhas interrompidas; em vermelho, clone com sinais de hibridação nos cromossomos der(20) e der(17) e em verde, clone com sinal de hibridação no cromossomo der(20), mas não no der(17). O ponto de quebra localiza-se no segmento de 50 kb do clone RP11-234K24, que não se surpepõe aos outros clones. Adaptado de *UCSC*, *hg 18*.

## IV.1.3 As translocações t(17;20)(q24.3;q11.2) e t(7;17)(p13;q24.3) e o gene SOX9

As duas translocações têm em comum a região do ponto de quebra no cromossomo 17. Em ambas, os segmentos delimitados para os pontos de quebra nos outros cromossomos contêm genes de função desconhecida ou cuja função não pôde ser relacionada diretamente com os quadros clínicos. Clinicamente, os dois pacientes apresentam, em comum, alterações esqueléticas torácicas. A associação entre rearranjos cromossômicos com quebras em 17q24.3 e quadros clínicos de sequência de Pierre Robin (PRS; MIM 261800), displasia campomélica (CD; MIM 114290) e displasia campomélica acampomélica (ACD; MIM 114290), com diferentes graus de gravidade, está registrada na literatura. Esses rearranjos alterariam a regulação do gene *SOX9* (chr17:67,628,756-67,634,155), na proximidade dos pontos de quebra (Gordon et al., 2009).

## • O gene SOX9 no desenvolvimento

As proteínas SOX constituem um grupo de fatores de transcrição caracterizados pela presença de um domínio de ligação ao DNA, denominado high mobility group box (HMG box). Membros da família atuam no desenvolvimento embrionário e alguns, como SRY, SOX2, SOX10 e SOX9, já foram associados a quadros clínicos. O gene SOX9, mapeado em 17q24.3, codifica uma proteína com 509 aminoácidos. Além do domínio HMG box, o SOX9 apresenta um domínio de transativação na extremidade Cterminal, que indica seu papel como ativador de transcrição (Sudbeck et al., 1996). Análises da expressão do Sox9 em camundongos revelaram que esse gene atua em sucessivos estágios da diferenciação da cartilagem, tanto no início da condensação mesenquimal, quanto posteriormente, durante a expressão de genes da matriz da cartilagem (Akiyama et al., 2002; Barna et al., 2007). Durante a condrogênese, já foi demonstrado que genes codificadores de colágeno, como col2al e col11a22 são alvos da ação de sox9 (Bell et al., 1997; Lefebvre et al., 1997). Além de seu papel na condrogênese, o SOX9 é necessário para a diferenciação celular em coração, sistema nervoso central, notocorda, pâncreas, orelha interna e testículos (Gordon et al., 2009). O papel do SOX9 na determinação sexual é reforçado pela expressão diferencial do gene no desenvolvimento masculino e feminino (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996). Além disso, o SOX9 atua durante o desenvolvimento da crista neural, que origina os elementos esqueléticos da face (Spokony et al., 2002; Sakai et al., 2006). Essa diversidade de tecidos e etapas do desenvolvimento sugere um complexo mecanismo de regulação do *SOX9* (Gordon et al., 2009).

Mutações na região codificadora do *SOX9* causam displasia campomélica (CD), uma doença rara e frequentemente letal, caracterizada por alterações esqueléticas, entre as quais se destacam o encurvamento e a diminuição do comprimento de ossos longos, hipoplasia das escápulas, anomalias dos ossos da pelve, mineralização deficiente dos pedículos torácicos, asas ilíacas estreitas, presença de 11 pares de costelas e primeiros metacarpos curtos (Pop et al., 2004). Micrognatia, retroglossia, palato fendido, pulmões hipoplásicos e tórax em sino estão frequentemente presentes e são as principais causas dos graves problemas respiratórios que se manifestam logo após o nascimento (Mansour et al., 1995), levando ao óbito cerca de 95% dos afetados, ainda no período neonatal. Cerca de 2/3 dos afetados, com cariótipo 46,XY, apresentam reversão sexual (Mansour et al., 1995), confirmando a ação do gene *SOX9* na diferenciação dos testículos.

## • O gene SOX9 e rearranjos cromossômicos

Apesar de a maioria dos pacientes com CD apresentar mutação na região codificadora do *SOX9*, existem relatos de afetados que não possuem essas mutações, mas são portadores de rearranjos equilibrados cujos pontos de quebra localizam-se *upstream* ao *SOX9* (Figura 10). Leipoldt et al. (2007) classificaram os pontos de quebra desses rearranjos em *clusters* proximais e distais, localizados, respectivamente, a 50 - 375 kb e 789 - 932 kb *upstream* ao gene *SOX9*. O estudo desses rearranjos cromossômicos evidenciou certa relação entre a localização dos pontos de quebra e a gravidade do quadro clínico. A curvatura anormal dos ossos longos, característica principal da CD, está ausente nos portadores de rearranjos cujos pontos de quebra localizam-se no *cluster* distal (Gordon et al., 2009). Nesses casos a doença é chamada de displasia campomélica acampomélica (ACD) e a maioria dos afetados não apresenta complicações graves em decorrência das alterações esqueléticas.

Foram também descritos pacientes com manifestações típicas de ACD, portadores de microdeleções na região *upstream* ao *SOX9*, detectadas por a-CGH (Pop et al., 2004; Lecointre et al., 2009; Jakubiczka et al., 2010). Apesar do cariótipo 46,XY, esses pacientes também apresentavam reversão sexual, com ausência de testículos e desenvolvimento de genitália externa feminina.



**FIGURA 10. Esquema da região genômica de 2 Mb** *upstream* **ao** *SOX9***:** Os retângulos em cor cinza representam os *clusters* proximal, distal e de PRS (sequência de Pierre Robin). Os clusters proximal e distal foram delimitados de acordo com a classificação proposta por Leipoldt et al. (2007). O cluster de PRS foi delimitado de acordo com os rearranjos descritos por Benko et al. (2009). Os elementos E1 (Bagheri-Fam et al., 2006), E2 (Sekido e Lovell-Badge, 2008), E3 (Bagheri-Fam et al., 2006) e E4 (Benko et al., 2009) representam *enhancers* já caracterizados. Os retângulos pretos indicam microdeleções identificadas em pacientes com PRS, em caso isolado (SP4) e em caso familial (F1) (Benko et al., 2009); F representa uma mutação de ponto detectada em paciente com PRS. (Adaptada de Gordon et al., 2009).

A importância do *SOX9* no processo de diferencial sexual é evidenciada por duplicações na região *upstream* ao gene. Cox et al. (2011) descreveram uma família portadora de uma duplicação de 178 kb localizada a aproximadamente 600 kb *upstream* ao *SOX9*. Três homens adultos com cariótipo 46,XX eram portadores da duplicação. Eles possuíam testículos e desenvolvimento de características sexuais secundárias e comportamentais compatível com o de homens normais, mas eram azoospérmicos. Anteriormente uma duplicação localizada *upstream* ao *SOX9* já havia sido detectada em um indivíduo XX com presença de testículo (Huang et al., 1999). Portanto, apesar de o *SRY* ser necessário para a ativação do *SOX9* e o desenvolvimento sexual masculino, níveis elevados de SOX9 parecem ser suficientes para induzir a diferenciação de testículos.

Mais recentemente pontos de quebra localizados a mais de 1 Mb *upstream* ao *SOX9* foram detectados em afetados pela sequência de Pierre Robin (PRS), que afeta os ossos craniofaciais e cujas principais manifestações clínicas incluem fissura de palato, glossoptose e micrognatia. A PRS pode estar presente em algumas síndromes Mendelianas, incluindo a CD e a ACD. Benko et al. (2009) estabeleceram o "*cluster* de PRS" na região reguladora do *SOX9*, a partir da análise de translocações equilibradas cujos pontos de quebra estavam localizados entre 1,03 e 1,23 Mb *upstream* ao *SOX9* (Figura 10; Tabela 6). Além disso, foram descritas deleções, *upstream* ao gene. Diante desse cenário, Gordon et al. (2009) sugeriram o uso do termo *SOX9 Spectrum Disorders* (*SSD*), que se aplicaria ao conjunto de doenças resultantes de alterações no *SOX9*. Um resumo das translocações ou deleções com pontos de quebra *upstream* ao *SOX9*, em pacientes com diagnóstico de ACD ou PRS, está na Tabela 6.

Alteração no cromossomo 17	Posição 5' em relação ao <i>SOX9</i>	Fenótipo	Sexo	Referência
t(12;17)(q21.32;q24.3-q25.1)	74–88 kb	ACD* Óbito (11 meses)	M*	Ninomiyaet al. (1996)
t(13;17)(q22;q25.1)	134–142 kb	ACD	M*	(1996) Wirth et al. (1996)
Deleção (1,5 Mb)	380-1.869 kb	ACD	M*	Pop et al. (2004)
Deleção (960 kb)	517-1.477 kb	ACD	M*	Lecointre et al. (2009)
Deleção 4,2 Mb	500 kb	ACD	M*	Jakubiczka et al. (2010)
46,XY,t(17;20)(q24.3;q11.2)	624-585 kb	ACD*	Н	Este estudo
46,XX,t(12;17)(q14.3;q24.3)	776-811 kb	hipoplasia mandibular e malar	H*	Refai et al. (2010).
46,X,t(Y;17)(q11.2;q24.3)	789 kb	ACD*	M*	Leipoldt et al. (2007)
46,XX,t(7;17)(p.13;q24)	917-855 kb	ACD	Μ	Este estudo
t(4;17)(q28.3;q24.3) familial	900 kb	ACD	M e H	Velagaleti et al. (2005)
t(13;17)(q22.1;q22.3) familial	932 kb	ACD	M e H	Hill-Harfe et al. (2005)
t(17;22)(q25.1;p11.2)	890-950 kb	ACD * Óbito (6 anos)	М	Pfeifer et al. (1999)
Deleção (75 kb)	1,38 Mb	PRS	?	Benko et al. (2009)
Deleção (320 kb)	1,58 Mb	PRS	?	Benko et al. (2009)
t(5;17)(q15;q24) familial	1,03 Mb	PRS	M e H	Benko et al. (2009)
t(2;17)(q32;q24) familial	1,16 Mb	PRS	M e H	Benko et al. (2009)
t(2;17)(q24.1;q24.3) familial	1,23 Mb	PRS	M e H	Benko et al. (2009)

Tabela 6: Translocações ou deleções com pontos de quebra *upstream* ao gene *SOX9*, listadas em ordem crescente da distância do ponto de quebra em 17q até o gene *SOX9*, e o fenótipo dos portadores.

ACD = Displasia campomélica acampomélica; ACD\* = Pacientes com graves complicações respiratórias; PRS = Sequência de Pierre Robin

H = Homem XY; H\* = Homem XX ; M = Mulher XX; M\* = Mulher XY (reversão sexual)

#### • Identificação de elementos reguladores do SOX9

A identificação de elementos reguladores no genoma humano é facilitada pela comparação entre sequências não codificadoras presentes no genoma de vertebrados distantes como *pufferfish* e aves (Dermitzakis et al., 2005). Essa estratégia é baseada no fato de a conservação de uma sequência ao longo da evolução ser um indicador de função biológica. A grande concentração de elementos não codificadores conservados (*conserved non-coding elements*, CNE), próximos a genes reguladores de desenvolvimento, sugere que essas sequências sejam importantes para o controle da expressão gênica durante o desenvolvimento (Woolfe et al., 2005).

A diversidade de tecidos e etapas do desenvolvimento em que o SOX9 atua sugere a necessidade de um complexo mecanismo para o controle de sua expressão (Gordon et al., 2009). A identificação de sequências conservadas na região próxima ao SOX9 e o estudo desses elementos em camundongos transgênicos têm contribuído para a identificação de elementos que atuam como enhancers. Os dados sugerem que há grande concentração desses elementos na região 375 kb upstream ao SOX9. Wunderle et al. (1998) geraram camundongos transgênicos quanto ao SOX9/LacZ, contendo extensões variáveis de sequências de DNA upstream ao SOX9. A expressão do transgene contendo 375 kb de DNA upstream ao SOX9 recapitulou o padrão de expressão do sox9 endógeno, enquanto que o transgene com 75 kb de DNA upstream ao SOX9 apresentou diminuição acentuada da expressão em relação ao sox9 endógeno, principalmente em tecidos em que ocorre condrogênese. Bagheri-Fam et al. (2006) mostraram que várias sequências, entre 290 kb upstream e 95 kb downstream ao SOX9, eram capazes individualmente de induzir a expressão do gene repórter em locais específicos do embrião. Um desses elementos E1 (Figura 10) atua especificamente na notocorda, garganta, epitélio branquial e pâncreas. O elemento E3 (Figura 10), um enhancer mapeado a 251 kb upstream ao SOX9, induziu a expressão do gene repórter em crista neural, arcos branquiais mesenquimais derivados da crista neural e vesícula ótica, enquanto a adição de dois elementos *upstream* aumentou o nível de expressão nesses tecidos. Esses dados sugerem que além de enhancers tecido-específicos, existiriam enhancers "globais", que elevariam a expressão do gene em tecidos nos quais o SOX9 é expresso (Gordon et al., 2009). Recentemente dois elementos reguladores (E4; Figura 10) capazes individualmente de induzir a expressão do gene repórter na mandíbula de embriões de camundongos, foram identificados a mais de 1,1 Mb upstream ao SOX9 (Benko et al., 2009). Uma mutação de ponto foi identificada no elemento regulador

mais proximal, em um caso isolado de PRS (F; Figura 10). A importância do *SOX9* no desenvolvimento sexual é corroborada pela identificação de um *enhancer* específico de testículo a menos de 15 kb *upstream* ao *SOX9* (Sekido e Lovell-Badge, 2008).

# • O espectro fenotípico PRS-ACD-CD e sua relação com a região reguladora do gene SOX9

A identificação dos três *clusters* (proximal, distal e PRS) *upstream* ao *SOX9* baseou-se nos fenótipos de pacientes portadores de rearranjos equilibrados. Rearranjos com pontos de quebra acima de 1,03 Mb do *SOX9* foram detectados em casos isolados de PRS (Tabela 6; Figura 10). Translocações equilibradas com pontos de quebra entre 932 e 789 kb *upstream* ao *SOX9* foram identificadas em afetados pela displasia campomélica acampomélica (Tabela 6; Figura 11) e aquelas translocações com pontos de quebra entre 375 e 50 kb estavam associadas principalmente a displasia campomélica (Figura 11). O espectro fenotípico dos portadores de rearranjos equilibrados com pontos de quebra próximos ao *SOX9* fornece, portanto, informação importante para o entendimento da região reguladora do gene.

Nossa análise, por hibridação *in situ*, das translocações t(7;17)(p.13;q24) e t(17;20)(q24.3;q11.2) situou os pontos de quebra no cromossomo 17, respectivamente, a 917-855 kb e 624-585 kb *upstream* ao *SOX9*. Ambos os pacientes apresentam alterações faciais ou esqueléticas que permitem o diagnóstico de displasia campomélica acampomélica. Anteriormente, o *cluster* distal dos pontos de quebra de rearranjos equilibrados, associados a ACD, estava mapeado entre 932-789 kb *upstream* ao SOX9. Nosso paciente portador da translocação t(17;20) permite redefinir o limite do *cluster* distal, mas proximal ao gene *SOX9*, em 585 kb *upstream* a esse gene (Figura 11).



FIGURA 11. Localização, em relação ao gene SOX9, dos pontos de quebra de rearranjos aparentemente equilibrados e deleções em pacientes com displasia campomélica e acampomélica: A linha horizontal representa a região 1,1 Mb *upstream* ao SOX9, dividida em espaços de 100 kb; elementos não codificadores, conservados entre vertebrados, estão indicados por pequenos círculos. Os pontos de quebra dos rearranjos equilibrados agrupam-se em *clusters*, distal (932-585 kb) e proximal (375-50 kb), de acordo com sua distância ao SOX9; as setas verticais indicam os pontos de quebra de translocações e inversões em pacientes com displasia campomélica acampomélica (A) ou com displasia campomélica, com encurvamento de ossos longos, grave (C) ou leve (M). Mulheres XX e mulheres XY são representadas, respectivamente, por círculos vazios e pretos. Homens XY e homens XX são representados, respectivamente, por quadrados vazios e pretos; os quadrados cinza indicam a presença de hipospádia. Casos familiais são representados pela letra F. As translocações t(7;17) e t((17;20) descritas neste trabalho estão indicadas. Um dos pacientes (H) com ponto de quebra no cluster distal apresentou apenas hipoplasia mandibular e maxilar. As barras pretas horizontais representam as deleções presentes em homens XX com displasia campomélica acampomélica. Essas deleções estendem-se além da região de 1 Mb *upstream* ao gene esquematizada na figura. (Adaptada de Leipoldt et al., 2007).

A maioria dos *enhancers* identificados próximos ao *SOX9* localiza-se até 375 kb *upstream* ao gene; os pacientes com quadros clínicos mais graves têm pontos de quebra nessa região (*cluster* proximal) (Figura 11). É razoável supor que uma parte importante da região reguladora do *SOX9* esteja localizada nessa região proximal. Nessa região, que passamos a denominar de unidade de regulação proximal, estaria localizado o conjunto básico de *enhancers* tecido-específicos do *SOX9* (Figura 12). A interrupção da comunicação do gene com essa unidade básica de regulação explicaria por que a grande maioria dos pacientes com rearranjos no *cluster* proximal são portadores de CD ou ACD com complicações graves. Além da curvatura dos ossos longos, os graves problemas respiratórios que se manifestam logo após o nascimento levam esses pacientes ao óbito ainda no período neonatal.



FIGURA 12. Unidades reguladoras propostas para o segmento genômico de 2 Mb imediatamente *upstream* ao *SOX9* e sua relação com os rearranjos equilibrados e as deleções com pontos de quebra nessa região: Na parte superior da figura estão representadas as três principais regiões reguladoras do *SOX9*: as unidades de regulação proximal (em verde), de ACD (em azul) e de PRS (em vermelho). Os elementos E1, E2, E3 e E4 representam *enhancers* já caracterizados por Bagheri-Fam et al. (E1 e E3), Sekido e Lovell-Badge (E2) Benko et al. (E4). Abaixo, os retângulos em cor cinza representam os *clusters* proximal, distal e de PRS. Os retângulos pretos indicam microdeleções identificadas em pacientes com PRS, em caso isolado (SP4) e em caso familial (F1) (Benko et al., 2009). As barras pretas horizontais representam as deleções em mulheres XY (circulos escuros) com displasia campomélica (A). As setas indicam a distância em relação ao *SOX9*. Na unidade de regulação proximal (em verde) estaria localizado o conjunto básico de *enhancers* tecido-específicos do *SOX9*. Nas unidades de regulação de PRS (em vermelho) e ACD (em azul) estariam localizados *enhancers* específicos, respectivamente, das estruturas craniofacias e esqueléticas (escápula, costelas e vértebras). (Adaptada de Gordon et al., 2009).

No entanto, em portadores de rearranjos equilibrados com pontos de quebra acima de 585 kb, a unidade de regulação proximal permanece intacta. As manifestações clínicas desses pacientes indicam que existem elementos reguladores acima de 375 kb *upstream* ao *SOX9*. Baseados na distribuição dos pontos de quebra de rearranjos equilibrados em casos isolados de PRS e casos de ACD (*clusters* distal e de PRS), Gordon et al. (2009) propõem a existência de duas regiões que concentram elementos reguladores localizadas a mais de 932 kb *upstream* ao *SOX9*: uma unidade de regulação de PRS (entre 1,23 Mb e 1,88 Mb *upstream* ao *SOX9*), que estaria situada entre o *cluster* de PRS e a extremidade proximal da deleção associada a um caso isolado de PRS (Sp4; Figura 12), e a unidade de ACD (entre 932 kb e 1,03 Mb *upstream* ao *SOX9*), que estaria situada entre o *cluster* de PRS e o *cluster* distal (Figura 12). Como salientam Gordon et al. (2009), elementos reguladores tecido-específicos necessários

para o desenvolvimento correto das estruturas esqueléticas (escápula, costelas e vértebras), tipicamente afetadas na ACD, mas não em PRS, estariam situados na unidade de regulação ACD. Por sua vez, a unidade de regulação de PRS seria formada de elementos reguladores tecido-específicos das estruturas craniofaciais. As duas unidades de regulação funcionariam independentemente. Em rearranjos equilibrados com pontos de quebra até 932 kb upstream ao SOX9, os elementos reguladores tecidos específicos das unidades de PRS e ACD perderiam a comunicação em cis com o SOX9, resultando em alterações de escápula, costelas e vértebras e de estruturas craniofaciais. Já os rearranjos equilibrados com pontos de quebra acima de 1,03 Mb afetariam somente a unidade de PRS. Alternativamente, Gordon et al. (2009) propõem que as duas unidades de regulação seriam formadas por um ou mais elementos reguladores "gerais" que elevariam os níveis de expressão do gene nos tecidos capazes de responder ao SOX9. De acordo com essa hipótese, a expressão do gene durante o desenvolvimento seria regulada por enhancers tecido-específicos localizados ao longo da região reguladora do SOX9 e por enhancers "globais", localizados nas unidades de regulação de PRS e ACD. Os enhancers "globais" elevariam a expressão do gene nos tecidos que já expressam o SOX9. Nos casos isolados de PRS, o afastamento ou deleção dos elementos reguladores "gerais" localizados na unidade de regulação de PRS, diminuiriam os níveis de expressão do gene em todos os tecidos que expressam o SOX9. No entanto, somente as estruturas craniofaciais seriam afetadas, já que seriam mais sensíveis aos níveis de SOX9. De forma análoga, podemos admitir que nos rearranjos associados ao fenótipo de ACD, o afastamento das regiões reguladoras de PRS e ACD diminuiria ainda mais os níveis de expressão do gene, afetando outras estruturas como escápula, costelas e vértebras.

Entretanto, além dos rearranjos equilibrados com pontos de quebra próximos ao *SOX9*, as deleções *upstream* ao gene também fornecem evidências a respeito da estrutura de sua região reguladora. Curiosamente, as manifestações clínicas em pacientes portadores dessas deleções *upstream* ao *SOX9* [380-1.869 kb *upstream* ao *SOX9*, Pop et al. (2004); 517-1.477 kb *upstream* ao *SOX9*, Lecointre et al. (2009); 500–3.700 kb *upstream* ao *SOX9*, Jakubiczka et al. (2010); Tabela 6; Figuras 11 e 12] são semelhantes àquelas de paciente portadores de translocações com pontos de quebra mapeados no *cluster* distal (Tabela 6; Figura 11): t(13;17) (ponto de quebra 932 kb *upstream* ao *SOX9*; Hill-Harfe et al., 2005), translocação t(4;17) (ponto de quebra 900 kb *upstream* ao *SOX9*; Velagaleti et al., 2005) e a translocação t(7;17) que descrevemos

(ponto de quebra 917-855 kb upstream ao SOX9). Essas translocações e deleções estão associadas a alterações esqueléticas que permitem o diagnóstico de ACD, no entanto não acompanhadas de complicações respiratórias no período neonatal ou outras condições letais. Assim, a perda da região localizada entre as unidades de regulação de ACD e proximal (entre 932-375 kb upstream ao SOX9; Figura 12) não está contribuindo para uma maior gravidade do fenótipo em portadores de deleções. Uma de nossas hipóteses é que elementos de regulação do SOX9 que afetem as estruturas esqueléticas estejam localizados apenas nas unidades reguladoras proximal, de PRS e ACD. Como a unidade de regulação proximal é mantida intacta, o fenótipo em portadores de deleções estaria associado à perda das unidades de regulação de ACD e PRS, assim como em portadores de translocações equilibradas com pontos de quebra no cluster distal. No entanto, os três portadores de deleções descritos têm cariótipo XY e reversão sexual (Tabela 6). O segmento deletado comum a esses pacientes, no qual não ocorram rearranjos que não estejam associados a reversão sexual, pode conter reguladores de SOX9 que atuam no desenvolvimento dos testículos (Figuras 11 e 12). Uma observação que apóia essa hipótese é a descrição de três homens de uma mesma família que eram portadores de uma duplicação de 178 kb localizada aproximadamente 600 kb upstream ao SOX9 (Cox et al., 2011). Esses pacientes, todos com cariótipo XX, não apresentavam alterações esqueléticas, mas tinham testículos e seu desenvolvimento sexual secundário e comportamento eram semelhantes aos de homens normais. O exame histológico detectou células de Leydig e células de Sertoli, mas os túbulos seminíferos estavam atrofiados e não havia espermatogênese. Conforme propõem os autores, esses pacientes indicam que entre 600-778 kb upstream ao SOX9 estejam localizados enhancers específicos de testículos, cuja expressão estaria exacerbada devido à sua duplicação. A perda dessa região em portadores de deleções (Pop et al., 2004; Lecointre et al., 2009; Jakubiczka et al., 2010) resultaria em ausência de testículos, apesar do cariótipo XY e da presença do gene SRY. No entanto, o portador da t(17;20) que descrevemos, tem cromossomos sexuais XY e desenvolvimento masculino, e o ponto de quebra do cromossomo 17 foi localizado entre 624-585 kb upstream ao SOX9. Assim, o segmento do cromossomo 17 distal ao ponto de quebra da t(17;20) tem que conter os enhancers postulados para o desenvolvimento testicular, para que continuem em cis com o SOX9 no cromossomo 17 rearranjado. Considerando o segmento 600-778 kb upstream ao SOX9 como candidato a conter esses enhancers (Cox et al., 2011), o ponto de quebra dessa translocação deve estar no segmento de aproximadamente 600-624 kb upstream ao *SOX9*. O mapeamento mais preciso desses pontos de quebra é necessário para que se possa delimitar a suposta região reguladora da atuação do *SOX9* no desenvolvimento testicular. É importante ressaltar que um *enhancer* específico de testículo (E2; Figura 10), denominado TES, foi isolado em camundongos (Sekido e Lovell-Badge, 2008). A sequência ortóloga em humanos, hTES, localiza-se entre 10-15 kb *upstream* ao *SOX9* (Knower et al., 2011) e, portanto, estaria mapeada na unidade de regulação proximal. Nossos resultados indicam que, assim como elementos reguladores das estruturas esqueléticas, elementos reguladores das gônadas estariam localizados na unidade de regulação proximal e também em regiões distais ao gene, nesse caso, a 600-778 kb *upstream* ao *SOX9*.

Em resumo, a região reguladora do SOX9 seria formada por três unidades básicas: a unidade de regulação proximal e as unidades de regulação de ACD e PRS (Figura 12). O conjunto básico de enhancers tecido-específicos estaria situado na unidade proximal localizada cerca de 375 kb upstream ao SOX9, coincidindo com o cluster proximal. Nas unidades de PRS (entre 1,23 Mb e 1,88 Mb upstream ao SOX9) e de ACD (entre 932 kb e 1,03 Mb upstream ao SOX9), propostas por Gordon et al. (2009), estariam localizados enhancers tecido-específicos das estruturas esqueléticas ou enhancers gerais que elevam os níveis de expressão do gene nos tecidos que já expressam o SOX9 (Figura 12). Rearranjos com pontos de quebra no cluster proximal separariam o SOX9 das três unidades reguladoras, estando associados, na maioria dos casos, a displasia campomélica. Em portadores de rearranjos equilibrados com pontos de quebra entre 585 kb e 932 kb upstream ao SOX9 ou de deleções que incluem esse segmento, a unidade de regulação proximal permanece intacta, mas as unidades de regulação de ACD e PRS são separadas do SOX9 ou deletadas, resultando em fenótipo menos grave, a displasia acampomélica campomélica. Translocações equilibradas com ponto de quebra no cluster de PRS separariam o SOX9 apenas da unidade de regulação de PRS, afetando o desenvolvimento das estruturas faciais; a perda de segmentos na unidade de PRS, upstream ao cluster de PRS, explicam os casos isolados de PRS, apresentando deleções de segmentos. Enhancers que influenciariam a atuação do SOX9 no desenvolvimento testicular estariam localizados na porção distal do cluster distal de pontos de quebra de translocações (próximo a 600 kb upstream ao SOX9). Outro enhancer já caracterizado (Sekido e Lovell-Badge, 2008) localiza-se na unidade de regulação proximal.

## • Busca de elementos conservados não codificadores nas unidades de regulação de PRS, ACD e de enhancers para o desenvolvimento testicular

A maioria dos enhancers já isolados localizam-se até 375 upstream ao SOX9, com exceção de dois enhancers a 1,1 Mb do gene (Benko et al., 2009). Baseando-se na proposta de Gordon et al. (2009), que sugere a existência da unidade de regulação de PRS e a unidade de regulação ACD, buscamos elementos conservados não codificadores nessas duas regiões para a identificação de possíveis elementos reguladores do SOX9. Para essa análise utilizamos o programa ECR Browser, que permite alinhar sequências de várias linhagens de vertebrados e a análise comparativa do segmento alvo (Ovcharenko et al., 2004). A comparação foi feita entre o genoma humano, de chimpanzé, macaco rhesus, cão, bovino, camundongo, rato e galinha. Foram consideradas sequências com mais de 75% de identidade, compostas de no mínimo 350 pares de bases (Benko et al., 2009). A análise genômica comparativa das unidades de regulação PRS e ACD identificou vários elementos conservados. A Figura 13 mostra a comparação do segmento correspondente à região entre 932 kb e 1,03 Mb usptream ao SOX9 (chr17:66,602,885-66,696,756), candidata a conter os elementos necessários para desenvolvimento correto das estruturas esqueléticas (escápula, costelas e vértebras) tipicamente afetadas na ACD. Foi possível identificar cinco sequências de 366 a 876 pares de bases, altamente conservadas durante a evolução, compartilhando 75-80% de identidade, presentes nas oito linhagens de vertebrados; são, portanto, candidatas. A Figura 14 mostra a comparação do segmento correspondente à região entre 1,23 Mb e 1,9 Mb upstream ao SOX9 (chr17:65,730,750-66,400,448), candidata a conter os elementos necessários para desenvolvimento correto das estruturas craniofaciais tipicamente afetadas em PRS. Esse segmento compreende a extremidade distal do *cluster* de PRS e o ponto de quebra proximal da deleção SP4 (Figura 12). Nela, identificamos 10 elementos de 351 a 648 pares de base altamente conservados durante a evolução, compartilhando 75-85% de identidade. O estudo desses CNE em animais transgênicos pode revelar se atuam como enhancers.



**FIGURA 13.** Análise genômica comparativa da unidade de ACD, *upstream* ao gene *SOX9:* (A) Esquema das unidades reguladoras propostas para o segmento genômico de 2 Mb, imediatamente *upstream* ao SOX9. [os retângulos indicam as regiões reguladoras proximal (verde), de ACD (azul) e de PRS (vermelho)]. (B) Sequências genômicas, correspondentes ao segmento entre 932kb e 1,03 Mb *upstream* ao *SOX9*, em galinha, rato, camundongo, bovino, cão, macaco *rhesus* e chimpanzé comparadas à sequência humana: foram identificadas cinco sequências altamente conservadas entre esses vertebrados (setas azuis). Da esquerda para a direita, essas sequências contêm, respectivamente, 493, 432, 366, 876 e 407 pares de bases e 81%, 75%, 77%, 78%, 78% e 75% de identidade. Em rosa, elementos conservados; em azul, transposons e elementos repetitivos simples; em vermelho, regiões intergênicas. O eixo horizontal corresponde ao alinhamento da sequência referência. O eixo vertical, que varia de 50 a 100%, corresponde ao nível de identidade do nucleotídeo nesse alinhamento. (Retirada do *ECR browser*).



**FIGURA 14.** Análise genômica comparativa da unidade de PRS *upstream* ao gene *SOX9:* (A) Esquema das unidades reguladoras propostas para o segmento genômico de 2 Mb, imediatamente *upstream* ao SOX9. [os retângulos indicam as regiões reguladoras proximal (verde), de ACD (azul) e de PRS (vermelho)]. (B) Sequências genômicas, correspondentes ao segmento entre 1,23 Mb e 1,58 Mb *upstream* ao *SOX9*, em galinha, rato, camundongo, bovino, cão, macaco *rhesus* e chimpanzé comparadas à sequência humana: foram identificadas 10 sequências contêm, respectivamente, Da esquerda para a direita, essas sequências contêm, respectivamente, Da esquerda para a direita, essas sequências contêm, respectivamente, 648, 351, 463, 474, 486, 565, 544, 486, 565, 544, 389, 373, 512 pares de bases e 85%, 75%, 74%, 77%, 74%, 77%, 78%, 76%, 75% e 77% de identidade. Em rosa, elementos conservados; em azul, transposons e elementos repetitivos simples; em vermelho, regiões intergênicas. O eixo horizontal corresponde ao alinhamento da sequência referência. O eixo vertical, que varia de 50 a 100%, corresponde ao nível de identidade do nucleotídeo nesse alinhamento. (Retirada do *ECR browse* 

Considerando a região 600-778 kb *upstream* ao *SOX9* como candidata a conter *enhancers* para o desenvolvimento testicular (Cox et al., 2011), sugerimos acima que o segmento do cromossomo 17 da t(17;20) distal ao ponto de quebra, localizado entre 624-585 kb *upstream* ao *SOX9*, teria que conter esses *enhancers* para que continuassem em cis com o *SOX9*, diante do desenvolvimento masculino normal apresentado pelo paciente. Para identificação desses elementos reguladores, buscamos por elementos conservados não codificadores na região de 39 kb que contém o ponto de quebra do cromossomo 17 da t(17,20) (chr17:67,004,133-67,043,280). Utilizando os parâmetros citados cima, identificamos um único segmento conservado de 580 pares de base e 78% de identidade (chr17:67,019,107-67,019,689, hg 18) (Figura 15). Esse segmento contém

uma sequência altamente conservada de 360 pares de base com 91% de identidade entre o genoma humano, de macaco *rhesus*, cão, bovino, camundongo, rato, galinha. A sequência de 360 pares está conservada em todos os grupos de vertebrados estudados, com exceção do chimpanzé no qual, a sequência foi perdida. Esse elemento conservado de 360 pares de base e identidade de 91% é um bom candidato para atuar como um elemento regulador do desenvolvimento dos testículos. A sequência correspondente (chr17:67,019,272-67,019,632, hg 18) localiza-se a cerca de 609 kb *upstream* ao *SOX9*. Para que esse elemento tivesse permanecido em cis ao *SOX9* na t(17;20) o ponto de quebra do cromossomo 17 deve ocorrer em um segmento de 15kb (ch17: 67,004,133-67,019,272) localizado entre 624-609 kb *upstream* do *SOX9*.



**FIGURA 15.** Análise genômica comparativa do segmento que contêm o ponto de quebra do cromossomo 17 da translocação t(17;20): (A) Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 17, delimitado pelo retângulo de linhas interrompidas (Detalhes na Figura 6). (B) Sequências genômicas correspondentes ao segmento de 39 kb que contêm o ponto de quebra do cromossomo 17 em galinha, rato, camundongo, bovino, cão, macaco *rhesus* e chimpanzé comparadas à sequência humana: uma sequência de 360 pares de bases (seta azul) compartilha 91% de identidade entre os vertebrados, tendo sido entretanto perdida no chimpanzé. Esse elemento conservado pode atuar como um *enhancer* para o desenvolvimento testicular (ver detalhes no texto). Nesse caso para que esse elemento tivesse permanecido em cis ao *SOX9* na t(17;20) o ponto de quebra do cromossomo 17 deve ocorrer em um segmento de 15kb, proximal a sequência conservada. Em rosa, elementos conservados; em azul, transposons e elementos repetitivos simples; em vermelho, regiões intergênicas. O eixo horizontal corresponde ao alinhamento da sequência referência. O eixo vertical, que varia de 50 a 100%, corresponde ao nível de identidade do nucleotídeo nesse alinhamento. (Retirada do *ECR browser*).

## • Influência, na expressão do SOX9, de sequências de outros cromossomos participantes de translocações com o cromossomo 17

Apesar de a alteração de elementos reguladores em cis parecer ser o principal mecanismo responsável pela alteração da expressão do SOX9, a variabilidade de fenótipos associada a rearranjos com pontos de quebra próximos evidencia a complexidade da região reguladora do SOX9. É possível que outros fatores, como alterações na estrutura da cromatina, possam interferir na expressão do gene. O ponto de quebra da translocação t(17;22) associada à ACD, com graves complicações respiratórias e consequente óbito (Pfeifer et al., 1999), foi mapeado 890-950 kb upstream ao SOX9, próximo aos das translocações, em dois casos familiais, t(4;17) (ponto de quebra 900 kb upstream ao SOX9; Velagaleti et al., 2005) e t(13;17) (ponto de quebra 932 kb upstream ao SOX9; Hill-Harfe et al., 2005) e ao ponto de quebra da translocação t(7;17) que descrevemos (ponto de quebra 917-855 kb upstream ao SOX9), todos com manifestações fenotípicas brandas (Figura 11; Tabela 6). Os mesmos elementos reguladores em cis podem ter sido alterados nesses casos. De forma similar a translocação t(Y;17) (ponto de quebra 789 kb upstream ao SOX9; Leipoldt et al., 2007), associada a manifestações clinicas graves, incluindo complicações respiratórias, teve o ponto de quebra mapeado próximo ao da t(12;17) (ponto de quebra 776-811 kb upstream ao SOX9; Refai et al., 2010), cujo portador apresentava apenas algumas alterações esqueléticas. Nos dois rearranjos, cujos portadores tiveram complicações graves, os autores (Pfeifer et al., 1999; Leipoldt et al., 2007) propõem que a translocação do gene SOX9 para região de heterocromatina ou para sua proximidade tenha provocado diminuição da expressão/silenciamento do gene. Na translocação descrita por Pfeifer et al. (1999), o ponto de quebra no cromossomo 22 ocorreu em 22p11.2, aproximando o SOX9 ao centrômero, a menos de 1 Mb de uma região cromossômica composta de sequências altamente repetitivas. Na translocação descrita por Leipoldt et al. (2007), o gene SOX9 foi translocado para a proximidade da região heterocromática do braço longo do cromossomo Y. Nos dois casos de translocações familiais com pontos de quebra no cluster distal (Velagaleti et al., 2005; Hill-Harfe et al., 2005) e na translocação t(7;17) que descrevemos, os pontos de quebra não estavam próximos a segmentos de heterocromatina.

A translocação t(12;17)(q14.3;q24.3), com ponto de quebra 776-811 kb *upstream* do *SOX9* (Refai et al., 2010), estava associada a alterações esqueléticas, que incluiam apenas hipoplasia mandibular e malar, apesar de a quebra cromossômica

separar o *SOX9* das unidades reguladoras de ACD e PRS. Além disso, o paciente possuía testículos e fenótipo masculino, apesar de ser XX. Nessa translocação o ponto de quebra do cromossomo 12 foi mapeado em uma região de 19 kb, possivelmente removendo uma porção do pseudogene *LOC204010*, e próximo ao gene *Deynar*. Os autores sugerem que elementos reguladores residuais do pseudogene ou do gene *Deynar* aumentem a expressão do *SOX9*. O fenótipo masculino em indivíduos XX já tinha sido descrita em associação com duplicações nas proximidades do *SOX9*, que levariam a sua expressão exacerbada, como discutimos acima.

Nosso paciente portador da translocação t(17;20)(q24.3;q11.2) apresentava quadro grave de ACD, com complicações respiratórias. O *SOX9* não foi aproximado a segmento heterocromático. Uma possibilidade é que sequências do cromossomo 20 possam ter interferido na expressão do *SOX9*, diminuindo-a. No segmento de 50 kb em que foi mapeado o ponto de quebra desse cromossomo está o C20orf4, que pode ter sido interrompido pelo rearranjo. Elementos silenciadores desse gene ou do gene *DLGAP4* (*disks large-associated protein 4 isoform a*) mapeado a 82 kb distal ao ponto de quebra no cromossomo 20, podem ter alterado a expressão do *SOX9*. Buscamos elementos conservados não codificadores na região próxima ao ponto de quebra do cromossomo 20 para a identificação de possíveis elementos reguladores do C20orf4 ou *DLGAP4*. Foram consideradas sequências com mais de 75% de identidade, compostas de no mínimo 200 pares de bases (Benko et al., 2009). Não foram identificadas sequências conservadas entre os genomas humano, de macaco *rhesus*, cão, camundongo e galinha. Alternativamente o C20orf4 pode ter sido interrompido e sequências do C20orf4 em cis à região reguladora do SOX9 tenham interferido na expressão do gene.

Outro dado que mostra a importância das sequências de outros cromossomos na expressão do *SOX9* vem dos pacientes portadores de deleção, que incluem as unidades de ACD e de PRS. Nesses casos, em que não há influência de sequências de outros cromossomos, observa-se um quadro esquelético típico de ACD, sem complicações respiratórias.

Assim, translocações equilibradas com pontos de quebra localizados no *cluster* distal, associadas a quadros mais graves de ACD ou apenas a alterações faciais, devem ter a variabilidade de seus efeitos fenotípicos devida a diferenças na expressão do *SOX9* relacionadas às sequências dos outros cromossomos participantes dessas translocações. Portanto, a alteração da expressão do gene *SOX9* em portadores de translocações equilibradas parece depender não só da interrupção ou separação de elementos reguladores próprios quanto da natureza das sequências trazidas para a proximidade do gene.

# IV.2 Translocação cromossômica associada a microdeleções em cis a ponto de quebra: t(10;21)(p13;q22)

#### • Aspectos Clínicos

A paciente, primeira filha de pais não consanguíneos e clinicamente normais, nasceu de parto cesariana eletiva, com peso de 3.390 g ( $50^{\circ}$  percentil), comprimento de 49 cm (percentil 50) e perímetro cefálico de 34 cm (percentil 25). Aos quatro meses de idade, foi encaminhada a neurologista por apresentar atraso de desenvolvimento neuropsicomotor associado à microcefalia. A criança tinha contato visual pobre e não apresentava sorriso social; a sustentação da cabeça era inconstante. O laudo do exame neurológico relata a presença de microcefalia (PC=39,5 cm; 10º percentil), não associada a outros sinais físicos; hipertonia espástica moderada dos quatros membros, predominante nas pernas, associada a hiperreflexia osteotendinosa; os reflexos primários estavam exaltados. Não foram observadas alterações na ecografia cerebral; o eletroencefalograma (EEG) revelou discreto alentecimento difuso da atividade de base e a ressonância magnética craniana não revelou alterações. Foi, no entanto, questionado o estágio de maturação da mielina, sugerindo-se acompanhamento. Os exames bioquímicos de sangue, a triagem de erros inatos do metabolismo em sangue e urina e a sorologia para doenças infecciosas congênitas tiveram resultados negativos. Foi indicado o exame cromossômico, inicialmente realizado em outro laboratório. Esse exame, após bandamento G, revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço curto do cromossomo 10 e o braço longo do cromossomo 21, t(10;21)(p13;q22) (Figura 16). O exame dos genitores revelou cariótipos normais. Foi solicitada ao LGH a continuação da investigação cromossômica, para verificar se a alteração estava realmente equilibrada.



**FIGURA 16.** t(10;21)(p13;q22): Ideograma (ISCN 2009; cariótipo com 550 bandas G) dos cromossomos 10, 21 e dos derivativos derivativos, der(10) e der(21). As setas indicam os pontos de quebra mapeados após bandamento G.

## • Mapeamento dos pontos de quebra da translocação por FISH

Para o mapeamento dos pontos de quebra que originaram a translocação, realizamos hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabelas 7 e 8).

Clones	Posição no genoma (hg 18; Build 36)	Sinal de hibridação
RP11-566K1*	chr10:10,830,787-11,020,034	ausente no der(10)
RP11-730A19*	chr10:13,060,479-13,254,681	ausente no der(10)
RP11-275E20	chr10:14,321,741-14,514,319	der(21)
RP11-2K17	chr10:14,952,610-15,140,768	der(10)
RP11- 264E18*	chr10:129,933,125-130,095,118	ausente no der(10)

Tabela 7: Clones de BAC utilizados no mapeamento do ponto de quebra e para a localização das deleções detectadas por a-CGH no cromossomo 10.

\*Clones utilizados para localização das deleções detectadas por a-CGH

Tabela 8: Clones de BAC utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 21.

Clones	Posição hg 18; Build 36)	Sinal de hibridação
RP11-410P24	chr21:32,849,566-33,019,511	der(21)
RP11-102E10	chr21:36,765,659-36,936,719	der(21)
RP11-351D2	chr21:43,550,744-43,727,862	der(21)
RP11-397E9	chr21:44,672,693-44,846,917	der(21); der(10)

Os sinais de hibridação dos clones RP11-275E20 (chr10:14,321,741-14,514,319; Human GRCh36 Assembly, hg18) e RP11-2K17 (chr10:14,952,610-15,140,768), presentes, respectivamente, nos cromossomos derivativos der(21) e der(10), permitiram localizar o ponto de quebra do cromossomo 10 no segmento de 440 kb flanqueado por esses clones (chr10:14,514,319-14,952,610) (Figura 17). No cromossomo 21, o ponto de quebra foi mapeado no segmento de 172 kb do clone RP11-397E9 (chr21:44,672,693-44,846,917), com sinais nos cromossomos der(21) e der(10) (Figura 18). A intensidade semelhante do sinal nos cromossomos derivativos sugere que o ponto de quebra ocorreu aproximadamente no centro do clone.



FIGURA 17. t(10;21)(p13;q22) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 10: (A) A hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-275E20 e RP11-2K17 revelou sinais de hibridação, respectivamente, no cromossomo der(21) e no cromossomo der(10). O ponto de quebra ocorreu, portanto, no segmento de 440 kb delimitado pelos dois clones. (B) Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 10, delimitado pelo retângulo pontilhado; estão indicados os genes localizados nesse segmento e os clones que delimitam o ponto de quebra; em verde, o clone distal com sinal de hibridação no cromossomo der(21) e em vermelho, o clone proximal, com sinal de hibridação no cromossomo der(21). Adaptado de *UCSC, hg 18*.



FIGURA 18. t(10;21)(p13;q22) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 21: (A) A hibridação *in situ* fluorescente do clone RP11-397E9 revelou sinais de hibridação nos cromossomos der(21) e der(10). Esse clone contém, portanto, o ponto de quebra. Um sinal de menor intensidade de hibridação cruzada foi observado nos cromossomos do par 1. (B) Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 10, delimitado pelo retângulo de linha interrompida; estão indicados os genes mapeados nesse segmento e o clone RP11-397E9, que contém o ponto de quebra. Adaptado de *UCSC, hg 18*.

#### • Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH

A análise por meio de a-CGH detectou quatro deleções no cromossomo 10 (Figura 19A), duas delas próximas ao ponto de quebra: uma deleção de 973 kb em 10p14 (chr10: 10,261,548-11,234,887; Figura 20) e uma deleção de 1,15 Mb em 10p13 (chr10: 13147148-14297942; Figura 21). Outras duas deleções no cromossomo 10 localizam-se distantes do ponto de quebra, no braço longo: uma deleção de 700 kb em 10q26.13 (chr10: 125057141-125757517; Figura 22) e uma deleção de 1,66 Mb em 10q26.2-q26.3 (chr10: 129631193-131289681; Figura 23). A Figura 19B mostra a distância entre essas alterações e o segmento delimitado para o ponto de quebra da translocação no cromossomo 10. A análise por a-CGH não revelou alterações nos pais da paciente.
A hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC do braço curto do cromossomo 10 (Tabela 7, Figuras 20C e 21C) mostrou que as perdas submicroscópicas ocorreram no braço curto do cromossomo participante da translocação, já que não foram identificados sinais de hibridação desses clones no der(21), que contém o segmento 10p13-pter. A hibridação *in situ* fluorescente do clone RP11-264E18, mapeado em 10q26.2-26.3 não produziu sinal no cromossomo der(10) (Tabela 7, Figura 23B). Não nos foi possível investigar se a perda no segmento 10q26.13 também ocorreu no cromossomo der(10), porque não dispúnhamos mais de preparações cromossômicas da paciente. A hibridação *in situ* fluorescente dos clones mapeados nos segmentos das deleções em metáfases dos pais revelou sinais de hibridação nos dois cromossomos 10.



FIGURA 19. Deleções no cromossomo 10 e sua posição em relação ao segmento que contém o ponto de quebra da translocação t(10;21): (A) Identificação das deleções no cromossomo 10 por a-CGH (plataforma 105A, *Agilent Technologies*): o perfil do cromossomo 10 evidencia quatro segmentos deletados, apontados pelas setas verdes: duas deleções no braço curto e duas, no braço longo. (B) As barras azuis indicam as distâncias entre os segmentos deletados em 10p14, 10p13, 10q26.13 e 10q26.2-26.3 (retângulos vermelhos) e o segmento que contém o ponto de quebra da translocação (barras verdes).



C.

RP11-556K11



**FIGURA 20. Deleção em 10p14:** (A) Identificação da deleção por a-CGH (Plataforma 105A, *Agilent Technologies*): o perfil da região 10p13-14 evidencia dois segmentos deletados separados por um segmento não deletado. As variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região estão indicadas em vermelho e os genes, em azul. (B) A deleção em 10p14 está destacada. O mapa do segmento de 973kb que corresponde à deleção mostra o gene *CUGBP2* e o clone RP11-556K11 (em verde) (Adaptado de *UCSC, hg 18*). (C) FISH: o sinal de hibridação do clone RP11-566K1 (em vermelho) está presente apenas no cromossomo 10 normal, indicando a presença da deleção no segmento do cromossomo 10 translocado para o cromossomo 21 [no der(21)].

65



C.

**RP11-264E18** 



**FIGURA 21. Deleção em 10p13:** (**A**) a-CGH (Plataforma 105A, *Agilent Technologies*): o perfil da região 10p13-14 evidencia dois segmentos deletados separados por um segmento não deletado. As variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região estão indicadas em vermelho e os genes, em azul. (**B**) O segmento deletado em 10p13 está destacado. O mapa do segmento de 1,15 Mb, que corresponde à região da deleção, mostra os genes *OPTN, MCM10, C10orf49, PHYH, SEPHS1, BEND7, PRPF18 e FMRD4A* e o clone RP11-730A19 (em verde). (Adaptado de *UCSC, hg 18*). (**C**) FISH: o sinal de hibridação do clone RP11-730A19 (em verde) está presente apenas no cromossomo 10 normal, indicando a localização da deleção no segmento translocado para o cromossomo 21 [no der(21)].



**FIGURA 22. Deleção em 10q26.13:** (**A**) a-CGH (Plataforma 105A, *Agilent Technologies*): o perfil da região 10q26.13-q26.3 evidencia dois segmentos deletados separados por um segmento não deletado. As variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região estão indicadas em vermelho. (**B**) O segmento deletado em 10q26.13 está destacado. O mapa do segmento de 700kb que corresponde à região da deleção mostra os genes *GPR26* e *CPXM2* (Adaptado de *UCSC, hg 18*).



C.

RP11-730A19



**FIGURA 23. Deleção em 10q26.2 - 26.3:** (**A**) a-CGH (plataforma 105A, *Agilent Technologies*): o perfil da região 10q26.13-q26.3 evidencia dois segmentos deletados separados por um segmento não deletado. As variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região estão indicadas em vermelho e os genes, em azul. (**B**) O segmento deletado em 10q26.2 - 26.3 está destacado. O mapa do segmento de 1,66 Mb que corresponde à região da deleção mostra os genes *PTPRE, MKI67* e *MGMT* e o clone RP11-264E18 (em verde). (Adaptado de *UCSC, hg 18*). (**C**) FISH: O sinal de hibridação do clone RP11-264E18 (em vermelho) está presente apenas no cromossomo 10 normal, indicando a localização da deleção no cromossomo der(10).

## • Genes mapeados no segmento dos pontos de quebra

No cromossomo 10, três genes estão mapeados no segmento delimitado para o ponto de quebra (Tabela 9). No cromossomo 21, 10 genes estão mapeados no clone que contém o ponto de quebra (Tabela 10).

Tabela 9: Genes que podem ter sido interrompidos pelo ponto de quebra no cromossomo 10, no segmento delimitado pelos clones RP11-275E20 (chr10:14,321,741-14,514,319) e RP11-2K17 (chr10:14,952,610-15,140,768).

Gene	Proteína
<b>FAM107B</b> (family with sequence similarity 107, member B)	Sem função conhecida
<b>HSPA14</b> (heat shock 70kDa protein 14)	HSP7014 é ubiquamente expressa; tem expressão elevada em baço e timo, sugerindo ser molécula relacionada ao sistema imune (Wan et al., 2004).
<b>CDNF</b> (conserved dopamine neurotrophic factor)	CDNF é um fator trófico, presente em várias regiões do cérebro, que influencia sobrevivência, crescimento e função dos neurônios dopaminérgicos.

Tabela 10: Genes que podem ter sido interrompidos pelo ponto de quebra no cromossomo 21, localizado no clone RP11-397E9 (chr21:44,672,693-44,846,917).

Gene	Proteína
<i>LRRC3</i> (leucine rich repeat containing 3) <i>C21orf90</i> (chromosome 21 open reading frame 90)	Todos codificadores de proteínas, sem função conhecida
<i>KRTAP</i> (keratin associated proteins 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6, 10-7 e 10-8)	Família de proteínas associadas à queratina. Formam uma matriz de filamentos intermediários de queratina que contribuem para a estrutura das fibras do cabelo. Os genes localizam-se em um <i>cluster</i> em 21q22.3, mapeado nos íntrons do gene <i>C21orf29</i>

## • Genes mapeados nos segmentos das deleções do cromossomo 10

Quatorze genes estão mapeados nas regiões das microdeleções (Tabela 11): um gene em 10p14 (*CUGBP2*), oito genes em 10p13 (*OPTN*, *MCM10*, *C10orf49*, *PHYH*, *SEPHS1*, *BEND7*, *PRPF18* e *FMRD4A*), dois genes em 10q26.13 (*GPR26* e *CPXM2*) e três genes em 10q26.2-q26.3 (*PTPRE*, *MKI67* e *MGMT*).

Gene	Proteína
<b>CUGBP2</b> (CUG triplet repeat RNA-binding protein 2) <b>OPTN</b> (optineurin)	Proteína membro de família de proteínas que se ligam ao RNA, regulando eventos de <i>splicing</i> , em cérebro e músculo. Proteína ubiquamente expressa que atua na via do fator nuclear kappa (NF-kB), além de interagir com outras proteínas, o que sugere múltiplas funções celulares. Mutações foram identificadas em associação com glaucoma primário de ângulo aberto e com esclerose lateral amiotrófica
<b>MCM10</b> (mini-chromosome maintenance protein 10)	Proteína é membro da família, altamente conservada, de <i>mini-chromosome</i> <i>maintenance proteins</i> (MCM), que participam da iniciação da duplicação do DNA.
PHYH (phytanoyl-CoA 2- hydroxylase) SEPHS1 (selenophosphate	Proteína peroxissomal que cataliza o primeiro passo da oxidação-alfa do ácido fitânico. Mutações em homozigose foram identificadas em associação com a doença de Refsum. A doença inata do metabolismo esta relacionada ao acúmulo do ácido fitânico no plasma e nos tecidos; caracteriza-se por retinite pigmentosa, neuropatia periférica e ataxia cerebelar; os níveis da proteína aparecem elevados no fluído cerebroespinhal. Enzima que sintetiza selenofosfato a partir de seleneto e ATP.
synthetase 1) <b>PRPF18</b> (PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog (S. cerevisiae)	Fator necessário para o segundo passo catalítico do <i>splicing</i> (Horowitz e Krainer, 1997).
<b>FRMD4A</b> (FERM domain containing 4A)	A proteína FRMD4A forma um complexo junto com Par-3 e citoesina-1, que promove a ativação de Arf6, elemento central na dinâmica do citoesqueleto de actina e transporte de membrana, durante a remodelação das junções e a polarização epitelial.
<i>GPR26</i> ( <i>G</i> protein-coupled receptor 26) <i>PTPRE</i> (protein tyrosine phosphatase, receptor type, E)	Proteína altamente expressa em cérebro fetal e adulto. Pode ser supressora de desenvolvimento de gliobastoma primário (Boulay, 2009). As fosfateses de tirosina (PTPs) são componentes essenciais das vias de transdução de sinalização celular; o gene é altamente expresso no sistema nervoso. Camundongos nocaute apresentam hipomielinização dos axônios dos nervos ciáticos, logo após o nascimento. Os autores propõem que essa proteína faça parte do mecanismo molecular que controla a atividade de canais de potássio durante período crítico do desenvolvimento das células de Schwann e da mielinização dos nervos periféricos (Peretz et al. 2000)
MKI67 (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67) MGMT (O(6)-methylguanine- DNA methyltransferase) BEND7 (BEN domain containing 7); CPXM2 (carboxypeptidase X (M14 family), member 2); C10orf49(open reading frame 49)	Proteína nuclear ubiquamente expressa, que esta associada à proliferação celular. Enzima de reparo que remove a ligação da O(6)-alquilguanina com a timina, lesão do DNA induzida por agentes alquilantes. Todos codificadores de proteínas, sem função conhecida.

## Tabela 11: Genes mapeados nos segmentos das microdeleções no cromossomo 10.

#### • Genes candidatos

Há um número relativamente grande de genes nos segmentos que contêm os pontos de quebra e incluídos nas microdeleções, tornando a correlação genótipofenótipo complexa. Apesar de não ser possível individualizar candidatos funcionais entre os genes deletados ou que possam ter sido interrompidos pelos pontos de quebra, genes altamente expressos no sistema nervoso são os principais candidatos a contribuir para o quadro clínico da paciente. Localizados nos segmentos das microdeleções, cinco genes são altamente expressos no sistema nervoso (*GPR26, OPTN, CUGBP2, PHYH e PTPRE*). Assim como *CDNF*, mapeado na região do ponto de quebra do cromossomo 10, podem ser considerados candidatos a contribuir para o quadro clínico.

De acordo com o *Database of Genomic Variants*, as regiões nas quais as alterações foram mapeadas contêm poucas variações de números de cópias. No entanto, apenas os genes *OPTN*, *GPR26* e *CDNF* estão mapeados em segmentos em que não há CNV descritas. Para o gene *CUGBP2*, há apenas um relato de deleção intrônica, não havendo evidência de que essa deleção altere o *splicing*. Já nos genes *PHYH* e *PTPRE*, ocorrem CNV em regiões exônicas. Mutações em homozigose no gene *PHYH* foram identificadas em associação com a doença de Refsum, que é um erro inato do metabolismo (Tabela 11). Os dados disponíveis permitem, assim, concluir que, entre os genes expressos no sistema nervoso, a perda de uma das cópias dos genes *PHYH* e *PTPRE* não seja patogênica.

Comparamos o quadro clínico da paciente com os de portadores de deleções semelhantes descritos no DECIPHER. As sobreposições das deleções são, entretanto parciais, dificultando as comparações fenotípicas. Microcefalia e retardo do desenvolvimento neuropsicomotor estão presentes na maioria dos pacientes com deleções no cromossomo 10, no entanto, essas são manifestações frequentes em portadores de desequilíbrios cromossômicos. O quadro de espasticidade nos quatro membros e hiperreflexia osteotendinosa é mais específico e sugere degeneração de neurônios motores superiores. Na literatura identificamos um paciente, descrito por Emberger et al. (2000), portador de rearranjo cromossômico complexo *de novo* dos cromossomos 2, 3 e 10, cujo quadro clínico incluía microcefalia e quadriplegia espástica além de dismorfimos faciais e retardo de desenvolvimento neuropsicomotor. No entanto o ponto de quebra desse rearranjo ocorreu em 10q24.3, distante das alterações no cromossomo 10, em nossa paciente. A espasticidade não é uma característica associada a grandes deleções do cromossomo 10 com pontos de quebra em 10q26. Os portadores

dessas deleções apresentam retardo de crescimento presente ao nascimento, microcefalia, assimetria facial, ponte nasal larga, estrabismo, lábio superior fino, clinodactilia de quintos dedos e distúrbios de comportamento (Courtens et al., 2006).

O gene OPTN: O gene OPTN é expresso principalmente no cérebro, retina e musculatura esquelética. Codifica uma proteína com 577 aminoácidos, altamente conservada em vertebrados. A proteína OPTN interage com várias outras, o que sugere múltiplas funções celulares (Swarup e Nagabhushana, 2010). Atua como regulador negativo da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB), induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) (Zhu et al., 2007). A inibição ocorre por meio da competição entre OPTN e a proteína NEMO (NF-kappaB Essential Modulator), pela ligação a proteínas que interagem com receptores (RIP, Receptor-Interacting Protein) (Zhu et al., 2007). A proteína NF-kB, que atua na apoptose, induzindo vários genes antiapoptóticos (Wajant et al., 2003), regula positivamente a OPTN, criando *feedback* negativo (Mrowka et al., 2008). A perda da regulação do NF-kB foi relacionada à patogênese de doenças neurodegenerativas, devidas tanto à hiperativação quanto à inibição de NF-kB (Mattson e Meffert, 2006). Por meio de sua interação com a miosina V e Rab8, a OPTN tem papel importante também na manutenção do complexo de Golgi, no transporte entre membranas e na exocitose (Sahlender et al., 2005). Já foram identificadas mutações em homozigose e heterozigose no gene OPTN em pacientes com o tipo mais frequente de glaucoma, o glaucoma primário de ângulo aberto, POAG (Rezaie et al., 2002). Essa doença é caracterizada por lesão progressiva do disco óptico, que pode levar a cegueira irreversível.

É interessante que recentemente mutações no gene *OPTN* foram descritas como causa da forma adulta de esclerose lateral amiotrófica (ALS, MIM: 105400; Maruyama et al., 2010). ALS é uma doença neurodegenerativa, de aparecimento normalmente tardio, caracterizada pela morte de neurônios motores do córtex, tronco cerebral e medula espinhal. As alterações dos neurônios motores superiores levam a espasticidade, clônus e hiperreflexia, enquanto as alterações dos neurônios motores inferiores resultam em fasciculação, atrofia, fraqueza e hiporreflexia. Somam-se os sinais bulbares, incluindo disartria, disfagia, e labilidade emocional. Mutações relacionadas à doença já foram identificadas em outros cinco genes (*SOD1, ANG, TARDBP, FUS* e *VAPB*) (Dion et al., 2009), mas em 70-80% dos casos a causa genética permanece desconhecida. Cerca 95% das ocorrências são esporádicas. A perda de uma das cópias do *OPTN* na paciente portadora da t(10;21) pode estar contribuindo para seu quadro neurológico, que

pode refletir a perda de neurônios motores superiores. Esta seria, entretanto uma manifestação muito precoce, ao contrário do que geralmente ocorre na ALS, cujos sintomas geralmente aparecem entre 30 e 60 anos de idade. No entanto, existem relatos de formas juvenis de ALS. Mutações no gene ALS2, mapeado em 2q33-35, foram identificadas nas formas juvenis da doença e também em formas juvenis da esclerose lateral primária (PLS, Primary Lateral Sclerosis, MIM 611637), que faz parte do espectro clínico da esclerose lateral amiotrófica (Eymard-Pierre et al., 2002; Panzeri et al., 2006; Shirakawa et al., 2009). Propõe-se que mutações no ALS2 seriam responsáveis por degeneração primitiva dos neurônios motores superiores, resultando em espetro clínico que varia de paraglegia espástica hereditária ascendente (IAHSP) até formas juvenis, com comprometimento de neurônios motores inferiores (JALS, Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis) ou sem comprometimento de neurônios motores inferiores (JPLS, Juvenile Primary Lateral Sclerosis,) (Eymard-Pierre et al., 2002). Existem relatos na literatura de pacientes com essas doenças motoras com manifestações de sinais antes dos dois anos de idade (Grunnet et al., 1989; Bertini et al., 2011).

Maruyama et al. (2010) estudaram 76 casos familiais e 597 casos esporádicos de ALS. Três mutações diferentes no gene OPTN foram detectadas: uma mutação nonsense (Q398X) e uma deleção do exon 5, ambas em homozigose, e uma mutação missense em heterozigose (E478G). Os autores propõem que o ganho ou a perda de função do OPTN possa contribuir para o fenótipo. No caso de mutação missense, o fenótipo seria resultado de ganho de função da proteína mutada e, consequentemente, o portador heterozigótico da mutação seria afetado. No entanto, na família em que foi identificada essa mutação, a presença de indivíduo heterozigótico normal sugere penetrância incompleta. Nas duas famílias, nas quais foram identificadas mutações em homozigose, os genitores dos afetados eram heterozigóticos e não manifestavam sinais da doença, indicando mecanismo de perda de função, com herança recessiva. Análises funcionais revelaram que as mutações abolem a capacidade da proteína de inibir o fator nuclear kappa B (NF-kB). Um estudo anterior (Jiang et al., 2005) mostrou que, em casos isolados de ALS, o NF-kB está ativado em neurônios motores. Maruyama et al. (2010) propõem que mutações associadas ao fenótipo de ALS levam à perda da capacidade de competir com a proteína NEMO, resultando em hiperativação da proteína NF-kB. Ainda não foi esclarecido o mecanismo pelo qual a ativação NF-kB induziria a neurodegeneração. A proteína mutada E478G também apresentou distribuição citoplasmática diferente daquela da proteína selvagem e de uma proteína resultante de mutação associada a POAG. Estudos com células *knockdown* mostraram que o silenciamento do gene afeta também a estrutura do complexo Golgi e reduz o transporte entre o complexo de Golgi e a membrana plasmática (Sahlender et al., 2005). Assim, tanto a ativação da NF-kB quanto a perturbação do transporte celular podem estar contribuindo para o fenótipo de ALS. Como referido anteriormente, mutações no *OPTN* também foram detectadas em pacientes com glaucoma primário de ângulo aberto (POAG). Diferentes impactos na via de sinalização NF-kB e diferentes localizações das proteínas mutadas podem explicar os diferentes fenótipos (Maruyama et al., 2010).

Outros trabalhos recentes estudaram casos familiais e esporádicos de ALS em busca de mutações no gene OPTN (Belzil et al., 2011; Del Bo et al., 2011; Iida et al., 2011; Millecamps et al., 2011; Sugihara et al., 2011; van Blitterswijk et al., 2011). Os dados indicam que mutações no OPTN são responsáveis por pequena parcela dos pacientes com ALS, presentes em 0,29% a 1,2% dos casos isolados da doença e em 1,5% a 3,8% dos casos familiais. No entanto, esses estudos não utilizaram técnicas que identifiquem grandes deleções ou outras variações estruturais. Foram detectadas oito mutações missense (p.A93P, p.R271C, p.R96L,p.A481V, p.T282P, p.Q314L, p.K557T e p.Q454E), duas mutações nonsense (p.G23X e p.Q165X) e três mutações intrônicas (c.1242+1G/A\_insA, c.552+1delG, c.1401 +4A/G), todas em heterozigose. As mutações missense ocorreram em regiões altamente conservadas da proteína. A mutação missense p.E478G, anteriormente descrita por Maruyama et al. (2010) foi detectada em um caso isolado e em outro familial (Iida et al., 2011). As variantes raras, identificadas tanto em pacientes de ALS da população japonesa (Iida et al., 2011; Sugihara et al., 2011) quanto em pacientes de ascendência europeia (Belzil et al., 2010; Del Bo et al., 2011; Millecamps et al., 2011; van Blitterswijk et al., 2011), não foram encontradas em controles clinicamente normais ou em pacientes com diagnóstico de POAG. Apesar da clara associação entre o OPTN e ALS, estudos funcionais e screening de novos pacientes deverão contribuir para ampliar o espetro de mutações no gene e identificar o possível papel patológico das mutações em OPTN em doenças de neurônios motores.

Nossa paciente é portadora de apenas uma cópia do gene *OPTN*. Maruyama et al. (2010) sugerem que a haploinsuficiencia de *OPTN* não seja patogênica e, que em afetados heterozigotos, o fenótipo decorreria do ganho de função da OPTN. No entanto, a descrição de dois afetados por ALS portadores de mutações *nonsense* p.G23X e p. p.Q165X que introduzem códons de parada prematuros, sugere que, dependendo do

*background* genético, mutações de perda de função em heterozigose também possam causar a doença (Del Bo et al., 2011; van Blitterswijk et al., 2011). No entanto, não pode ser descartada a presença de alteração no outro alelo ou ainda um efeito tóxico da proteína truncada.

O gene CUGBP2: O gene CUGBP2 é expresso principalmente no coração, músculo e córtex cerebral. CUGBP2 faz parte de família de proteínas que se ligam a RNA e foi caracterizada por seu papel na regulação de eventos de splicing tecidoespecífico durante o desenvolvimento, no cérebro e no músculo. CUGBP2 liga-se a sequências ricas em GU para silenciar ou ativar a seleção de exons de vários genes, no processo de splicing, incluindo o gene MAPT, que codifica a proteína associada a microtúbulo, tau. O CUGBP2 regula o splicing alternativo dos exons 2/3 desse gene (Leroy et al., 2006). O MAPT é expresso principalmente em neurônios (Weingarten et al., 1975). A proteína tau atua na polimerização e na regulação da estabilidade de microtúbulos, no transporte axoplasmático e na diferenciação axonal. Mutações em MAPT foram associadas a uma série de doenças neurológicas, como Alzheimer e demência frontotemporal. Como o transporte axoplasmático pode estar associado a degeneração de neurônios motores, Usarek et al. (2006) estudaram o splicing alternativo dos exons 2, 3 e 10 do gene MAPT em camundongos modelo de ALS, portadores de mutação no gene SOD1. Apesar de mutações no gene SOD1 serem detectadas em 20% dos casos familiais de ALS, ainda não se conhece o mecanismo pelo qual mutações nesse gene estão associadas com a doença. No sistema nervoso central, tau sofre splicing alternativo dos exons 2, 3 e 10 dando origem a seis isoformas, que divergem quanto à presença dos exons 2 e 3, na extremidade N terminal, e do exon 10, na extremidade C terminal. A expressão da isoforma 2N (que contém os exons 2 e 3) foi significativamente inferior no córtex frontal de animais sintomáticos comparados a animais controle de mesma idade e animais transgênicos em estágio pré-clinico da doença. Essa queda resultou em diminuição nos níveis totais de RNA mensageiro e da proteína tau. Na medula espinhal dos animais não foram observadas alterações na expressão da isoforma 2. Também não foram detectadas alterações no splicing do exon 10 em camundongos transgênicos. Esses dados sugerem que mutações no gene SOD1 influenciam o *splicing* alternativo dos exons 2-3 do *MAPT*, no córtex frontal de animais em estágio sintomático (Usarek et al., 2006). No entanto, os autores ressaltam que mais estudos são necessários para determinar se mudanças nos níveis das isoformas da tau, que diferem quanto à presença dos exons 2 e 3, contribuem para a patogênese da ALS.

De forma análoga, o CUGBP2 atua regulando o splicing dos exons 2 e 3 do MAPT e sua haploinsuficiência poderia resultar em alteração nos níveis das diferentes isoformas da tau. Além de regular o splicing, CUGBP2 também atua na estabilização de RNA mensageiros e em sua própria tradução (Timchenko et al., 2001). CUGBP2 inibe a tradução do RNA mensageiro do gene COX2 (Sureban et al., 2007), que codifica uma enzima crucial na conversão do ácido aracnóico em prostaglandina E2 (PGE2). A indução da expressão ou aumento da atividade de COX-2 promove a destruição de neurônios, em modelos animais de várias doenças neurológicas (Liang et al., 2007). A inibição farmacológica ou genética da atividade de COX2 protege contra a degeneração de neurônios, em animais modelos da doença de Parkinson, de ALS e de isquemia (Drachma e Rothstein, 2000; Liang et al., 2007). Supõe-se que a perda de neurônios mediada pelo COX2 seja resultado de efeitos downstream de um ou mais produtos da prostaglandina (Consilvio et al., 2004; Liang et al., 2007; Andreasson et al., 2010). Como o CUGBP2 inibe a tradução do RNA mensageiro do gene COX2, a haploinsuficiência do gene CUGBP2 aumentaria os níveis de COX2, o que, por sua vez, induziria a degeneração de neurônios motores. Assim a haploinsuficiência do gene CUGBP2, por meio da regulação do splicing dos exons 2 e 3 do gene MAPT ou da inibição da tradução do RNA mensageiro do gene COX2, pode contribuir para o fenótipo da paciente.

**O gene** *CDNF*: Em camundongos, o gene *cdnf* é expresso no cérebro durante os estágios embrionário, pós-natal e na fase adulta; em cérebro humano de adultos também foi detectada a expressão do *CDNF*. O CDNF é um fator trófico, altamente conservado que atua na sobrevivência e funcionamento dos neurônios dopaminérgicos. Em ratos modelo da doença de Parkinson, a administração *in vivo* do CNDF preveniu a degeneração de neurônios dopaminérgicos. Em camundongos e humanos o gene também é altamente expresso em tecidos não neurais como o coração, músculo esquelético e testículos. No entanto a função da proteína nesses tecidos ainda não foi elucidada (Lindholm et al., 2007).

**O gene** *GPR26*: O gene é altamente expresso em cérebro adulto de camundongos e humanos (Boulay et al., 2009). A proteína pertence à família de receptores de proteína G (*G protein coupled receptors, GPCR*), que transduzem sinais extracelulares por meio de proteínas G heterotriméricas. O *GPR26* pode atuar como supressor do desenvolvimento de glioblastomas primários, já que em amostras do tumor, a proteína GPR26 está ausente ou reduzida devido a metilação *de novo* de ilhas

5' CpG do gene (Carter et al., 2008). A haploinsuficiência quanto a supressores de tumor traz um problema adicional no monitoramento de pacientes com deleções cromossômicas, como salientado por Krepischi-Santos et al. (2009).

## • Mecanismo de formação da t(10;21)

A t(10;21) que estudamos é um exemplo de rearranjo aparentemente equilibrado cuja caracterização molecular permitiu revelar a complexidade. A análise por meio de a-CGH detectou quatro deleções não herdadas no cromossomo 10. Duas deleções foram identificadas no braço curto: uma de 973 kb e outra de 1,15 Mb, mapeadas respectivamente a 3,27 Mb e 210 kb do ponto de quebra; duas outras deleções, no braço longo: de 700 kb em 10q26.13 e de 1,66 Mb em 10q26.2-q26, mapeadas, respectivamente, a 110,10 Mb e 114,68 Mb do ponto de quebra. Em cerca de 9% dos rearranjos equilibrados associados a alterações fenotípicas são detectadas deleções distantes aos pontos de quebra. As deleções nos pontos de quebras podem ocorrer durante a formação dos rearranjos, talvez associadas a mecanismo de reparo de extremidades quebradas. No entanto deleções distantes aos pontos de quebra podem não estar associadas aos rearranjos ou refletir um mecanismo mais complexo em sua formação (Higgins et al., 2008). Recentemente, o uso do sequenciamento de última geração no estudo de rearranjos equilibrados constitutivos e somáticos (Kloosterman et al., 2011; Talkowski et al., 2011) forneceu evidências a respeito dos mecanismos de formação de rearranjos complexos. Kloosterman et al. (2011) estudaram uma translocação constitucional complexa t(1;10;4)(p32.2;q21.1;q23) de novo, detectada em uma paciente portadora de malformações congênitas múltiplas. O sequenciamento dos pontos de quebra revelou uma série complexa de rearranjos equilibrados intra e intercromossômicos, com 12 pontos de quebra nos cromossomos 1, 4 e 10. A ausência de homologia e a presença de inserções ou microdeleções de poucos pares de base nos pontos de quebra indicou o mecanismo de NHEJ no reparo das extremidades quebradas. Esses resultados sugerem que a translocação t(1;10;4)(p32.2;q21.1;q23) se formou a partir de uma série de quebras na dupla fita do DNA, seguidas de ligação aleatória dos fragmentos resultantes. Esse padrão fora anteriormente observado em rearranjos somáticos identificados em células tumorais. Stephens et al. (2011) analisaram múltiplas linhagens celulares de diferentes tipos de câncer e identificaram, em 2 a 3% dos casos, dezenas a centenas de rearranjos cromossômicos. O clustering de pontos de quebras sugeriu que os rearranjos não poderiam ter-se formado por eventos múltiplos e independentes, em subclones diferentes, hipótese apoiada pela análise estatística. Os autores propõem que os rearranjos teriam ocorrido em um único evento catastrófico, que denominaram de chromothripsis (chromos, cromossomo; thripsis, fragmentação). Baseando-se semelhança rearranjos na desses com a translocação t(1;10;4)(p32.2;q21.1;q23) que estudaram, Kloosterman et al. (2011) propõem que um mecanismo similiar a "chromothripsis" também pode levar à formação de rearranjos cromossômicos de novo na linhagem germinativa. Inicialmente agentes endógenos ou exógenos induziriam a quebra na dupla fita do DNA, resultando em fragmentação cromossômica. As quebras na dupla fita seriam reparadas por NHEJ. A união dos fragmentos seria feita por micro-homologias ou ocorreria aleatoriamente dependendo da proximidade física. Os autores consideram improvável que os 12 rearranjos de novo detectados na t(1;10;4)(p32.2;q21.1;q23) sejam resultados de eventos independentes durante divisões celulares consecutivas devido ao *clustering* de pontos de quebras nos cromossomos 1, 4 e 10 e ao padrão de ligação dos fragmentos nos cromossomos derivativos. Além disso, todos os eventos tiveram origem paterna.

O estudo de outros rearranjos aparentemente equilibrados por sequenciamento de última geração é necessário para que se avalie a contribuição da "chromothripsis" na formação de rearranjos cromossômicos constitucionais. Ressalta-se que o rearranjo t(1;10;4)(p32.2;q21.1;q23), apesar de complexo, era equilibrado. No entanto, as técnicas de a-CGH e FISH têm revelado a complexidade de uma proporção significativa dos rearranjos aparentemente equilibrados com a identificação de desequilíbrios submicroscópicos em cis aos pontos de quebra que originaram esses rearranjos. O modelo de "chromothripsis" pode explicar deleções nos pontos de quebra e distantes aos pontos de quebra desses rearranjos cromossômicos. Em ambos os casos, as perdas de segmentos de DNA podem resultar de fragmentos cromossômicos que não foram unidos aos outros fragmentos, tendo assim sido perdidos.

De acordo com o modelo proposto por Stephens et al. (2011) e adaptado por Kloosterman et al. (2011), sugerimos, para a translocação t(10;21) que descrevemos, que 10 quebras ocorreram nos cromossomos 10 e 21, resultando em 12 fragmentos cromossômicos (Figura 24). As quebras teriam ocorrido simultaneamente na linhagem germinativa, materna ou paterna, já que não determinamos a origem parental do rearranjo e das deleções. Possivelmente, os fragmentos seriam reparados por NHEJ, já que não detectamos homologias nos pontos de quebra do rearranjo. Posteriormente, os fragmentos teriam sido reunidos aleatoriamente, por proximidade física, ou ainda por micro-homologias originando os cromossomos derivativos 10 e 21. Os fragmentos correspondentes aos segmentos deletados no cromossomo 10 teriam sido perdidos. Além dos múltiplos pontos de quebras e da presença de deleções em cis ao rearranjo, outra evidência a favor do mecanismo de "*chromothripsis*" para a formação da t(10;21)(p13;q22) é o *clustering* de pontos de quebras no cromossomo 10: cinco quebras em uma região de 4,2 Mb no braço curto (chr10:10,261,548-14,514,319) e quatro quebras em uma de região 6,2 Mb no braço longo (chr10:125,057,141-131,289,681). Deve ser ressaltado que a interpretação do mecanismo de formação da t(10;21)(p13;q22) baseou-se nos resultados obtidos pela associação de a-CGH (plataforma 105A, Agilent) e FISH. É possível que o estudo do rearranjo por sequenciamento ou mesmo a utilização de plataforma de a-CGH de resolução superior possa identificar pontos de quebras adicionais.



FIGURA 24. Chromothripsis como modelo de formação para a t(10;21)(p13;q22): (A) Em uma primeira etapa, quebras na dupla fita do DNA nos cromossomos 10 (azul) e 21 (amarelo) são induzidas por agentes endógenos ou exógenos à célula. A localização das quebras está indicada pelas setas. As linhas pontilhadas nos cromossomos 10 e 21 representam os pontos de quebra que originaram a translocação, mapeados por FISH. Os blocos vermelhos representam as deleções do cromossomo 10, identificadas por a-CGH. No cromossomo 10, as nove quebras estão restritas a duas regiões, uma de 4,2 Mb no braço curto e outra de 6,2 Mb no braço longo. (B) As múltiplas quebras provocam fragmentação cromossômica. (C) As extremidades quebradas do DNA seriam reparadas por NHEJ. A união dos fragmentos seria feita com base em micro-homologias ou ocorreria aleatoriamente dependendo da proximidade dos fragmentos. (D) Os vários fragmentos são unidos entre si, originando os cromossomos der(10) e der(21); alguns fragmentos do cromossomo 10 são perdidos.

## IV.3 Translocação t(X;22)(q22;q13) associada a duplicação do gene *PLP1* e doença de *Pelizaeus-Merzbacher* em menina

#### • Aspectos Clínicos

A paciente nasceu de parto cesariana, a termo, com peso de 2.500 g ( $<3^{\circ}$ percentil), comprimento de 44 cm ( $<3^{\circ}$  percentil) e perímetro cefálico de 35 cm ( $50^{\circ}$ percentil). O atraso do desenvolvimento neuropsicomotor ficou evidente para seus genitores, quando, aos sete meses, ainda não conseguia sentar. Falou as primeiras palavras após os dois anos de idade. Foi encaminhada ao LGH-USP aos oito anos de idade, porque seu exame cromossômico, revelara uma translocação aparentemente equilibrada entre os cromossomos X e 22, t(X;22)(q22;q13) (Figura 25); foi-nos solicitado investigar a possível relação dessa alteração cromossômica com o quadro clínico; o exame cromossômico dos pais não revelara alterações. Sentava-se sem apoio; era capaz de movimentar-se, arrastando o corpo, mas não conseguia engatinhar. Era hipotônica; apresentava coreoatetose, movimentos rotatórios de cabeça e nistagmo pendular. Alimentava-se bem e tinha comunicação oral razoável, mas, segundo sua genitora, a fala regredira, após o primeiro episódio convulsivo, aos cinco anos de idade. Sua estatura era de 100 cm ( $<3^{\circ}$  percentil), o peso, de 15 kg ( $<3^{\circ}$  percentil) e o perímetro cefálico, de 48 cm ( $2^{\circ}$  percentil). Após os resultados dos exames genéticos que realizamos e que sugeriram o diagnóstico de doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), a paciente foi reavaliada, em nosso Serviço de Aconselhamento Genético, pelo neurologista Dr. Fernando Kok. O conjunto de sinais e sintomas neurológicos indicou o diagnóstico de PMD, que foi validado pela ressonância magnética, mostrando quadro de hipomielinização.



**FIGURA 25.** t(X;22)(q22;q13): Ideograma (ISCN 2009; cariótipo com 550 banda G) dos cromossomos X e 22 e dos derivativos der(X) e der(22) e de seus homólogos normais. As setas indicam os pontos de quebra mapeados após bandamento G.

### • Mapeamento dos pontos de quebra da translocação por FISH

Para o mapeamento dos pontos de quebra, realizamos hibridação *in situ* fluorescente de clones de BAC mapeados nas regiões dos pontos de quebra, determinados pela análise após bandamento G (Tabelas 12 e 13).

No cromossomo 22, os clones RP5-925J7 (chr22: 47740384-47838754, Human GRCh36 Assembly, hg18) e CTA-722E9 (chr22:48181791-48314060) hibridaram no cromossomo 22 e nos cromossomos derivativos der(X) e der(22) (Figura 26). A presença dos sinais do clone CTA-722E9 nos cromossomos derivativos der(X) e der(22), este com sinal de intensidade menor, mostrou que esse clone contém o ponto de quebra. Por outro lado, os sinais do clone RP5-925J7 apresentaram a mesma intensidade nos cromossomos 22, der(22) e der(X), sugerindo a duplicação desse segmento do cromossomo 22 no cromossomo derivativo der(X).

No cromossomo X, a hibridação *in situ* dos clones RP11 265115 (chrX:102,270,516-102,453,744), RP3 421120 (chrX:102,569,986-102,622,582), RP11 142J15 (chrX:102,785,715-102,935,799) e RP4 540A13 (chrX:102,953,929-103,039,303) revelaram sinais de hibridação no cromossomo X e nos cromossomos derivativos der(X) e der (22) (Figura 27). A semelhança da intensidade do sinal dos clones RP3 421120 e RP11 142J15 no cromossomo X normal e nos cromossomos derivativos sugeriu a presença de uma duplicação do segmento do cromossomo X, presente no der(X) e no der(22). Já os sinais de intensidades diferentes dos clones RP11 265115 e RP4 540A13, nos cromossomos der(22) e der(X), mostrou que esses clones contêm os pontos de quebra no cromossomo X.

Clone	Posição (hg 18; Build 36)	Sinais de hibridação
RP11-12M9	chr22:39,701,569-39,877,855	der(22)
RP3-388M5	chr22:42,473,589-42,651,043	der(22)
СТА-299D3	chr22:47,248,304-47,338,939	der(22)
RP5-925J7	chr22:47,740,384-47,838,754	der(22); der(X)
СТА-722Е9	chr22:48,181,791-48,314,060	der(22); der(X)
CTA-799F10	chr22:49,425,750-49,449,200	der(X)

Tabela 12: Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo 22.

Tabela 13: Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do cromossomo X.

Clone	Posição (hg 18; Build 36)	Sinais de hibridação
RP11-151N12	chrX:98,412,392-98,497,852	der(X)
RP11-265I15	chrX:102,270,516-102,453,744	der(X); der(22)
RP3-421120	chrX:102,569,986-102,622,582	der(X); der(22)
RP11-142J15	chrX:102,785,715-102,935,799	der(X); der(22)
RP4-540A13	chrX:102,953,929-103,039,303	der(X); der(22)
RP11-230E14	chrX:103,498,150-103,656,697	der(22)
RP11-539A6	chrX:104,392,277-104,584,586	der(22)
RP5-820B18	chrX:106,921,602-107,049,634	der(22)
RP1-31B8	chrX:108,414,862-108,517,413	der(22)



FIGURA 26. t(X,22)(q22;q13) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 22: (A) A hibridação *in situ* fluorescente do clone RP5-925J7 revelou sinais de hibridação, de intensidades semelhantes, nos cromossomos 22, der(22) e der(X). Esses resultados sugeriram a presença de duplicação de segmento do cromossomo 22 no cromossomo der(X). (B) A hibridação *in situ* fluorescente do clone CTA-722E9 revelou sinais de hibridação nos dois cromossomos derivativos, com menor intensidade no cromossomo der(22), indicando que o clone contém o ponto de quebra do cromossomo 22.

#### A. RP11-142J15













FIGURA 27. t(X,22)(q22;q13) - Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo X: A hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-142J15 (A) e RP3-421I20 (B) revelou sinais de hibridação, de intensidades semelhantes, nos cromossomos X, der(X) e der(22). Esses resultados sugeriram a presença de duplicação de segmento do cromossomo X no cromossomo der(22). (C) e (D), A hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP4-540A13 (C) e RP11-265I15 (D) revelou sinais de hibridação de intensidades diferentes nos cromossomos der(X) e der(22) e, portanto esses clones contêm o ponto de quebra no cromossomo X.

#### • Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH

As duplicações indicadas na análise por FISH foram confirmadas por a-CGH (*Human Genome CGH Microarray Kit 2x105A*, *Agilent*). Essa análise identificou um ganho de número de cópia de um segmento de aproximadamente 490 kb em 22q13.32-33 (Chr22:47,732,501-48,219,751) (Figura 28).

No cromossomo X, a análise, utilizando a mesma plataforma, identificou uma duplicação em Xq22.1-22.2 (Figura 29A). Para refinar os pontos de quebra dessa duplicação, analisamos o rearranjo utilizando uma plataforma dedicada ao cromossomo X (*Custom Microarray 2x105A*, *Agilent Technologies*). A análise identificou um ganho

de um segmento de aproximadamente 570 kb, em Xq22.1-22.2 (chrX:102,416,033-102,973,44) (Figura 29B).

A análise por a-CGH dos genitores da paciente não revelou alterações nos cromossomos X e 22.



FIGURA 28. Duplicação em 22q13.32-33: A duplicação no cromossomo 22 foi confirmada por a-CGH (Plataforma *105A*, *Agilent*): (A) O perfil do cromossomo 22 evidencia a duplicação de segmento em 22q13.32-33. (B) O segmento duplicado está representado pela linha azul. Variações no número de cópias (CNV) em vermelho. (C) O mapa do segmento de 490kb (Chr22:47,732,501-48,219,75), que corresponde à região da duplicação, mostra os clones RP5-925J7 (em verde), que foi identificado como duplicado após FISH, e o CTA-722E9, em vermelho, que contém o ponto de quebra, estando mapeado na porção distal da duplicação. Não há genes mapeados nessa região. (Adaptado do *UCSC*, *hg 18*).



FIGURA 29. Duplicação em Xq22.1-22.2: A duplicação no cromossomo X foi confirmada por a-CGH. (A) O perfil do cromossomo X (Plataforma *Human Genome CGH Microarray Kit 2x105A, Agilent technologies*) evidencia a duplicação em Xq22.1-22.2. (B) Em Xq22.1-22.2, a extensão da duplicação está representada (B1) pela linha bege (*Human Genome CGH Microarray Kit 2x105A, Agilent*; e (B2) pela linha azul (X chromosome *custom microarray 2x105A, Agilent*). Não há variações no número de cópias (CNV) mapeadas na região. (C) O segmento duplicado em Xq22.1-22.2 está destacado no retângulo de linha interrompida. O mapa do segmento de 557 kb (chrX:102,416,033-102,973,440), que corresponde à região da duplicação, mostra 14 genes, incluindo o *PLP1* (indicado pela seta), e os clones utilizados nos experimentos de FISH - RP3-421120 e RP11-142J15 (duplicados), RP11 265115 e RP4 540A13, que contêm, respectivamente, os pontos de quebra proximal e distal da duplicação. (Adaptado do *UCSC, hg 18*).

#### • Genes mapeados nos segmentos das duplicações

Não há genes mapeados no segmento duplicado do cromossomo 22 (Figura 28). Quatorze genes estão mapeados no segmento duplicado do cromossomo X: *TCEAL5*, *BEX2M*, *TCEAL7*, *WEBP5*, *NGFRAP1*, *RAB40A*, *TCEAL4*, *TCLEA3*, *TCLEA1*, *MORF4L2*, *TMEM31*, *GLRA4*, *PLP1 e RAB9B*) (Figura 28, Tabela 14). Os genes *TCEAL5* e *RAB9B* estão localizados, respectivamente, nos pontos de quebra proximal e distal da duplicação no cromossomo X e foram, portanto, interrompidos pelo rearranjo (Figura 29).

#### • Padrão de inativação do cromossomo X

Determinamos o padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico da paciente, com base na metilação do gene *AR* e também citologicamente em metáfases, após incorporação de 5-BrdU, nas últimas seis horas de cultura e coloração por acridina laranja. A análise de 60 metáfases mostrou que o cromossomo X normal era sempre o cromossomo X de duplicação tardia, mostrando o padrão típico de incorporação de 5-BrdU (Figura 30). Assim, pudemos concluir que, em linfócitos, o cromossomo X normal está inativo e o der(X) ativo. Esse padrão de inativação torna as células funcionalmente equilibradas quanto aos segmentos translocados e é o que se observa na maioria das portadoras de translocações equilibradas entre o cromossomo X e um autossomo (Schmidt e Du Sart, 1992).

A análise do padrão de metilação do gene *AR* revelou desvio de inativação, com o mesmo cromossomo inativo em 82% das células (Figura 31). O alelo materno estava no cromossomo X predominantemente inativo, que a análise citogenética mostrou ser o X estruturalmente normal. Portanto, podemos concluir que o cromossomo X participante da translocação é o paterno.

## Tabela 14: Genes mapeados no segmento duplicado do cromossomo X.

Gene	Proteína
<b>TCEAL 1, 3-5 e 7</b> (transcription elongation factor A (SII)-like)	Membros da família TCEAL podem atuar como uma fosfoproteínas que modulam a transcrição gênica.
<b>BEX2</b> (brain expressed X- linked 2)	Esse gene tem atividade de supressor de tumor e está silenciado em gliomas humanos (Foltz et al., 2006). Em células de câncer de mama, o produto gênico modula a apoptose, em resposta ao estrógeno e ao tamoxifeno e aumenta o efeito anti-proliferativo do tamoxifeno (Naderi et al., 2007).
<i>MORF4L2</i> (mortality factor 4 like 2)	A proteína atua como regulador transcricional e, de acordo com o tipo celular, atua como ativador ou repressor do promotor B-myb (Tominaga et al., 2003).
<b>PLP1</b> (proteolipid protein 1)	Esse gene codifica o principal componente da mielina no sistema nervoso central. Mutações no <i>PLP1</i> causam a doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD), caracterizada pela desmielinização do sistema nervoso central. (Inoue et al., 2005).
<b>RAB9B</b> (RAB9B, member RAS oncogene family)	Membros da família de proteínas RAB atuam no transporte vesicular e localizam-se em compartimentos intercelulares específicos (Seki et al., 2000). RAB9B pode atuar no transporte endossomo-Golgi.
NGFRAP (nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1); RAB40A (RAB40A, member RAS oncogene family); GLRA4 (glycine receptor, alpha 4); WBP5(WW domain binding protein 5); TMEM31(transmembrane protein 31)	Todos codificadores de proteínas, sem função conhecida.



FIGURA 30. Padrão de inativação do cromossomo X, após incorporação de 5-BrdU e coloração por acridina laranja: O cromossomo X normal apresentou o padrão de incorporação de 5-BrdU, típico do cromossomo X de duplicação tardia, nas 60 metáfases analisadas.



**FIGURA 31. Padrão de inativação do cromossomo X, determinado com base na metilação do gene** *AR***:** Os alelos foram amplificados a partir do DNA genômico, não digerido (gráficos A,C, E) e digerido pela enzima *Hpa*II, sensível à metilação (gráficos B, D, F). Após digestão, apenas os alelos metilados, no X inativo, são amplificados. A razão de inativação (18:82) mostra que o mesmo alelo está inativo em 82% das células. A comparação dos alelos da paciente com os de seus genitores mostra que o alelo preponderantemente inativo na paciente é o materno.

#### • Genes candidatos

A análise da translocação aparentemente equilibrada t(X;22)(q22;q13), por FISH e a-CGH, revelou a complexidade do rearranjo: uma cópia adicional de segmento do cromossomo 22 localiza-se no ponto de quebra do cromossomo X e uma cópia adicional de segmento do cromossomo X está localizada no ponto de quebra do cromossomo 22. As duplicações foram claramente evidenciadas por a-CGH, que permitiu delimitar sua extensão, mas foi a técnica de FISH que permitiu localizar as sequências duplicadas nos pontos de quebra da translocação.

Não há genes mapeados no segmento duplicado do cromossomo 22 (Figura 28). Existem algumas variações no número de cópias (CNV) na região. No banco de dados DECIPHER, há três pacientes (1874, 248402 e 248912), que apresentam duplicações comparáveis às de nossa paciente, tendo sido herdadas de genitores normais.

Quatorze genes estão mapeados no segmento duplicado do cromossomo X. A manutenção do cromossomo der(X) como o ativo na totalidade ou na maioria das células de portadoras de translocações equilibradas t(X;A) pode ser responsável pela manifestação de quadros clínicos resultantes da interrupção de genes no cromossomo X, permitindo, inclusive, a identificação dos genes relacionados a esses fenótipos (ver, por exemplo, Zatz et al., 1981). O interessante no caso de nossa paciente é que suas células terão sempre duas cópias ativas do segmento duplicado do cromossomo X, independentemente de o cromossomo normal ou o translocado ser o inativo, pois há cópias desse segmento presentes no cromossomo X, no der(X) e também no cromossomo 22, esta sempre ativa.

Um dos genes duplicados no cromossomo X é *PLP1 (proteolipid protein 1)* (Figura 29), que codifica o principal componente da mielina no sistema nervoso central (Garbern et al., 2007). Mutações intragênicas ou alterações no número de cópias do *PLP1* causam a doença de Pelizaeus-Merzbacher (PMD, MIM 312080), caracterizada por hipomielinização do sistema nervoso central. Afeta principalmente homens, com herança recessiva ligada ao X. Existem duas formas principais da doença, os tipos congênito e clássico (Inoue et al., 2005). No tipo clássico, as manifestações iniciais incluem hipotonia, nistagmo e atraso do desenvolvimento motor, notados no primeiro ano de vida. Mais tarde, o nistagmo pode desaparecer, mas surgem outros sinais, como espasticidade, ataxia e movimentos coreoatetóicos. A evolução do quadro clínico é lenta na primeira década de vida, mas posteriormente a deterioração é mais rápida, a morte ocorrendo geralmente no início da idade adulta. Já a forma congênita é menos frequente

e geralmente tem curso mais grave. Os pacientes mostram atraso do desenvolvimento psicomotor e graves sintomas neurológicos. Têm dificuldade para alimentar-se, estridor e contratura progressiva das extremidades devido à espasticidade. Podem apresentar convulsões. Na maioria das vezes a morte ocorre na primeira década de vida. Alterações no gene *PLP1* também resultam em paraplegia espástica tipo 2 (SPG2), em que os afetados apresentam fraqueza progressiva e espasticidade das extremidades inferiores (Saugier-Veber et al., 1994).

Nossa paciente foi encaminhada para avaliação genética, sem hipótese diagnóstica. Foi reavaliada, pelo neurologista, Dr. Fernando Kok, em nosso Serviço de Aconselhamento Genético. Esse exame apontou o diagnóstico de PMD. A ressonância magnética, mostrando quadro de hipomielinização, veio apoiar esse diagnóstico. A paciente não apresentava sinais que pudessem ser considerados como atípicos da doença e não há evidência na literatura de que outros genes mapeados próximos ao *PLP1*, incluídos do segmento duplicado do cromossomo X, possam estar contribuindo para seu quadro clínico.

#### • O gene PLP1

A expressão do gene *PLP1* é predominante em oligodendrócitos e correlacionase com o início da mielinização no terceiro trimestre da vida intrauterina. A proteína PLP1 constitui até 50% das proteínas da mielina. Camundongos nocaute quanto ao *Plp1* se desenvolvem normalmente e são capazes de produzir quantidades normais de mielina, que, no entanto, parece ser menos estável e menos densa que a mielina de camundongos selvagens, sugerindo que a função do gene esteja relacionada à estabilização e à manutenção da mielina (Jurevics et al., 2003). O *PLP1* também é expresso em células de Schwann, neurônios motores, neurônios corticais e do tronco cerebral, cardiomiócitos, timo e baço.

#### a) O gene PLP1 e a doença de Pelizaeus-Merzbacher

A maioria dos casos de PMD (60 a 70%,) estão associados a duplicações do gene *PLP1* (Mimault et al., 1999), mas mutações na região codificadora do gene e deleções do *PLP1* já foram associados ao espectro fenotípico da doença. Parece haver correlação entre o tipo de mutação e a gravidade do quadro clínico (Woodward, 2008). Portadores de duplicações, que em geral variam quanto ao tamanho, têm predominantemente o fenótipo clássico da doença. A ausência da proteína PLP1, devido a deleções do gene ou a mutações nulas, causa uma forma mais branda de PMD ou o

fenótipo de SPG2. A forma congênita está frequentemente associada a mutações *nonsense*. Mas, em cerca de 10 a 20% dos casos de PMD, a base molecular permanece desconhecida. Alterações na regulação do *PLP1* pode ser o mecanismo responsável nesses casos. Por exemplo, Muncke et al. (2004) descreveram um paciente com diagnóstico de PMD portador de inversão no cromossomo X. O ponto de quebra em Xq22 foi mapeado 70 kb *upstream* ao gene *PLP1*, em um intron do gene *GLRA4*. Como esse gene foi descartado como candidato devido a sua função, um efeito de posição foi proposto como principal causa da doença, determinando aumento da expressão do gene *PLP1*, similar ao que ocorre nos quadros associados à duplicação do gene. Em outro estudo, Lee et al. (2006) detectaram uma duplicação de 150 kb mapeada 136 kb *downstream* ao *PLP1* em um paciente com SPG2. Como o fenótipo do paciente estava mais próximo ao de portadores de mutações nulas no *PLP1*, os autores sugerem que as manifestações clínicas do paciente resultaram do silenciamento do gene, por efeito de posição (Lee et al., 2006).

A maioria dos afetados pela PMD são homens e as mulheres heterozigotas são, em geral, assintomáticas. No entanto, em famílias de portadores de mutações nonsense, associadas a um fenótipo mais brando da doença, podem ocorrer mulheres afetadas. Essas mulheres têm um quadro mais leve da doença, com aparecimento mais tardio, em comparação aos homens afetados da família (Bond et al., 1997; Sivakumar et al., 1999). Esse padrão pode ser explicado pela inativação do X (Woodward et al., 2000). Nos casos de mutações associadas a fenótipo mais brando nos homens, a inativação seria casual, permitindo a manifestação nas mulheres; já nos casos de mutações com manifestações graves nos homens, o desvio de inativação com o cromossomo normal predominantemente ativo levaria à ausência ou abrandamento do quadro clínico. Em geral, em mulheres portadoras de mutações *missense* ou duplicações do *PLP1*, o cromossomo X portador da alteração é preferencialmente inativo. Já em mulheres portadoras de mutações nulas, não ocorrem desvios importantes do padrão de inativação do cromossomo X. Inoue et al. (2001) propuseram que oligodendrócitos que super expressam o PLP1 ou portadores de mutações missense seriam eliminados por apoptose, mas oligodendrócitos portadores de mutações nulas sobreviveriam.

Apesar de a maioria das duplicações do gene *PLP1* ter uma orientação *head to tail* em Xq22, já foram descritos pacientes portadores de rearranjos complexos, incluindo casos em que ocorrem três ou quatro cópias do gene (Wolf et al., 2005). A cópia adicional do segmento que inclui o *PLP1* pode estar inserida em outras regiões do cromossomo X (Hodes et al., 2000; Woodward et al., 2003) ou, mais raramente, em um autossomo (Inoue et al., 2002; Yiu et al., 2009). a)

## b) Mulheres sintomáticas portadoras de duplicações que incluem o gene PLP1

As heterozigotas quanto a duplicações no gene *PLP1* não apresentam manifestações clínicas, com raras exceções (Carrozzo et al., 1997; Inoue et al., 2001; Yiu et al., 2009; Carvalho et al., 2011). Inoue et al. (2001) descreveram duas mulheres portadoras de duplicações em *tandem* que incluíam o *PLP1*, uma delas com quadro moderado de PMD e a outra, apresentando paraplegia espástica. Nos dois casos, não havia desvio no padrão de inativação do cromossomo X. Recentemente, Carvalho et al. (2011) identificaram uma duplicação complexa familial de 11 Mb que incluía o gene *PLP1*. Nessa família, além de um menino afetado, três mulheres, mãe e duas filhas, apresentaram alguns sinais de PMD, incluindo leve atraso de desenvolvimento psicomotor e atraso de crescimento nos primeiros anos de vida. O padrão de inativação do cromossomo X em sangue periférico não mostrou desvio nas filhas e havia um desvio moderado favorável ao alelo normal, na mãe.

Além da nossa paciente, existem apenas duas descrições de meninas portadoras de duplicações do *PLP1* com sinais típicos da doença, incluindo grave atraso de desenvolvimentos neuropsicomotor, presença de nistagmo e evidencia de hipomielinização. Carrozzo et al. (1997) descreveram uma menina com quadro de PMD portadora de duplicação direta do segmento Xq21.32-q24, cujo tamanho foi estimado em 23-29 Mb. O padrão de inativação do cromossomo X, em linfócitos e fibroblastos, não mostrou desvio. A outra menina foi descrita por Yiu et al. (2009); era portadora de rearranjo complexo, em que o segmento duplicado do cromossomo X, que incluía o *PLP1*, estava inserido no braço curto do cromossomo 1. O segmento 1p36 também estava duplicado. Nesse caso, como em nossa paciente, a presença de duas cópias funcionais do *PLP1*, independe do padrão de inativação do cromossomo X, pois o segmento duplicado está em um autossomo.

As duplicações descritas por Carrozzo et al. (1997), Inoue et al. (2001) e Carvalho et al. (2011) ocorreram no próprio cromossomo X. Nesses casos seria esperado um desvio do padrão de inativação, com a inativação, na maioria das células, do cromossomo X portador da duplicação. No entanto, a análise no sangue periférico dessas mulheres não revelou desvios significativos de inativação. Não há informação do tamanho das duplicações descritas por Inoue et al. (2001), mas as outras duas duplicações são as maiores já associadas ao fenótipo de PMD. Carvalho et al. (2011) propõem que o tamanho da duplicação contribui para a penetrância da doença em mulheres afetadas. Uma das hipóteses é que no cérebro o desvio do cromossomo X seja diferente daquele detectado em linfócitos do sangue periférico. Alternativamente, outros genes ou elementos funcionais incluídos na duplicação poderiam alterar os padrões de expressão temporal ou tecido-específico do *PLP1*. Outra hipótese é que genes sensíveis a dosagem no segmento duplicado escapem à inativação do cromossomo X e contribuam para o fenótipo. No caso da paciente portadora da duplicação de 23-29 Mb (Carrozzo et al., 1997), a presença de sinais não típicos da PMD, como alterações esqueléticas e albinismo, é indicativa de que outros genes mapeados no segmento duplicado para o fenótipo.

Em nossa paciente, a duplicação tem apenas 570 kb e, portanto, sua extensão não parece ser o fator importante para sua manifestação. Assim como no caso do rearranjo descrito por Yiu et al. (2009), a manifestação clínica deve decorrer basicamente de o segmento extra do cromossomo X, que inclui o *PLP1*, localizar-se em um autossomo. Consequentemente, independente do padrão de inativação do cromossomo X existem, em todas as células, duas cópias funcionais do *PLP1*.

Dois estudos sugerem que nem sempre a cópia adicional inserida num autossomo estaria ativa. Ida et al. (2003) descreveram uma portadora de inserção do segmento Xq22-q23 no braço longo do cromossomo 3 (3q25.3). Em 92% dos linfócitos analisados, o cromossomo X portador da deleção estava inativo. A paciente possuía, portanto, duas cópias potencialmente funcionais do PLP1, mas não apresentava sintomas de PMD, aos cinco anos de idade. Entretanto, nesse caso, o fenótipo poderia ser explicado, se o cromossomo X com a deleção estivesse preferencialmente ativo em oligodendrócitos, o que determinaria uma única cópia funcional do PLP1, a do autossomo Em outro estudo, Inoue et al. (2002) identificaram duas cópias do PLP1, uma delas inserida no telômero do cromossomo 19, em um menino fenotipicamente normal. Os autores sugerem que o gene, no cromossomo derivativo 19, foi silenciado devido à proximidade a regiões de sequências repetitivas do telômero. Portanto, a expressão do PLP1 em um autossomo pode depender da estrutura da cromatina próxima ao gene. Outra questão refere-se à própria região reguladora do gene. Rearranjos com pontos de quebra 70 kb upstream e 136 kb downstream ao gene estão associados à expressão alterada do PLP1, indicando que elementos reguladores localizados distantes do gene devem ser translocados ou inseridos junto com o PLP1 para que ocorra expressão adequada do gene. Podemos, assim, admitir que, na t(X;22)(q22;q13) que descrevemos, a cópia extra do *PLP1* foi translocada para uma região de cromatina favorável à expressão .do gene no cromossomo 22 e que elementos reguladores próprios do *PLP1* também devem ter sido translocados Esses fatores permitiriam que nos oligodendrócitos, os níveis de expressão do *PLP1* no cromossomo 22, aliado à expressão do gene no cromossomo X ativo, levassem a manifestação da doença.

Na maioria das mulheres portadoras de translocações X;autossomo observa-se inativação preferencial do cromossomo X normal. Esse padrão seria consequência da seleção de células em que está mantida a dose dos genes ativos no cromossomo X. As exceções ocorrem para pontos de quebras próximos às extremidades do cromossomo, levando a dissomia funcional de pequenos segmentos (Schmidt e Du Sart, 1992). Na translocação t(X;22)(q22;q13) aqui descrita, espera-se que ocorra seleção contrária a células com o cromossomo normal ativo devido à dissomia funcional do segmento Xq22-Xqter. Nas 60 metáfases de linfócitos analisadas o cromossomo X normal teve replicação tardia e, portanto, estava inativo. Por outro lado, a inativação do cromossomo X, com base na análise da metilação do gene *AR*, revelou razão de inativação 82:18, observada em sangue periférico de cerca de 10% das mulheres adultas da população (Amos-Landgraf et al., 2006). Essa análise abrange os leucócitos em geral, enquanto a análise citológica restringe-se às metáfases de linfócitos T, aqueles estimulados pela fitohemaglutinina para se multiplicarem. A seleção contrária à dissomia do cromossomo X poderia ser mais efetiva nessas células.

#### • Mecanismo de formação da translocação t(X;22)

Na maioria das doenças genômicas associadas a duplicações, como a doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 (CMT1A), observa-se recorrência na localização dos pontos de quebra dos rearranjos. As duplicações se originariam por recombinação homóloga não alélica (NAHR) mediada por *Low-Copy Repeats* (LCR) localizadas próximas aos genes causadores das doenças. Entretanto, o tamanho das duplicações associadas à PMD é variável, indicando que NAHR não é o mecanismo responsável, ou, pelo menos, o principal. No entanto, mesmo havendo aleatoriedade na distribuição dos pontos de quebra proximal e distal na geração da duplicação na PMD, a grande concentração de LCR próximas ao *PLP1* sugere que a arquitetura genômica pode atuar em sua formação. Woodward et al. (2005) sugerem que essas LCR geram instabilidade genômica, que pode induzir quebra na dupla fita do DNA próxima ao *PLP1*. As duplicações em *tandem* que incluem o *PLP1* seriam iniciadas por uma quebra na dupla fita do DNA, na espermatogênese. Para o reparo, a cromátide na qual ocorreu a quebra invade a cromátide irmã, utilizando-a como molde. Após essa etapa inicial de recombinação homóloga, a reparação das extremidades quebradas seria feita por NHEJ. Esse mecanismo pode explicar não só duplicações em *tandem*, mas também inserções da cópia extra do gene em outras regiões do genoma, dependendo do molde utilizado para o reparo da quebra.

Lee et al. (2007) aplicaram sequenciamento e análise por *oligoarrays* de pontos de quebra na investigação das duplicações não recorrentes de *PLP1*. Apesar de terem identificado duplicações em *tandem*, em 65% dos casos os rearranjos eram mais complexos com segmentos duplicados interrompidos por segmentos intactos, triplicados ou deletados. O mecanismo de *Fork Stalling and Template Switching* (FOSTES) foi proposto para explicar a complexidade desses rearranjos. Esse mecanismo baseia-se na correção da duplicação do DNA, interrompida por lesões ou formação de estruturas secundárias. Diante da interrupção da forquilha de duplicação, a fita *lagging* invade outras forquilhas próximas, até completar a duplicação da fita original.

A grande maioria dos desequilíbrios submicroscópicos, detectados em cis aos rearranjos aparentemente equilibrados, são deleções (Higgs et al., 2008, Sismani et al., 2008; Schluth-Bolard et al., 2009). Na literatura, há apenas um exemplo de translocação recíproca constitucional com duplicação de centenas de quilobases no ponto de quebra (Cox et al., 2003). O estudo da t(X;8)(q28;q12) identificou a duplicação de um segmento de 650 kb do cromossomo X, que estava presente nos pontos de quebra dos cromossomos derivativos der(X) e der(8). Já no rearranjo t(X;22)(q22;q13), que estudamos, foram detectadas duplicações de sequências de ambos os cromossomos participantes da translocação e as cópias adicionais estavam presente nos dois cromossomos derivativos.

Recentemente, ao estudar linhagens de células de câncer de mama, Howarth et al. (2011) identificaram duplicações de segmentos de dezenas ou centenas de quilobases nas junções dos pontos de quebras de translocações recíprocas somáticas, estando a mesma sequência presente nos dois produtos da translocação. Esses rearranjos somáticos são similares ao rearranjo complexo constitutivo descrito por Cox et al. (2003). Howarth et al. (2011) propuseram um modelo para explicar a formação desses rearranjos, em que as duplicações são produzidas a partir de uma bolha de replicação do DNA, formada por duas forquilhas de replicação, com as sequências duplicadas no

centro (Figura 32). Quebras na dupla fita do DNA ou trocas de forquilhas em regiões específicas, seguidas de quebras no outro cromossomo levariam à formação da translocação. Apesar da semelhança com outros modelos baseados na duplicação do DNA, o modelo proposto por Howarth et al. (2011) baseia-se em bolhas de replicação formadas por pares de forquilhas de replicação, e não forquilhas individuais, como o modelo FoSTeS. Os rearranjos podem ocorrer simultaneamente nas duas forquilhas ou sequencialmente, mas as duas forquilhas, que têm início em uma mesma origem de replicação, podem estar juntas, tornando mais provável que ambas as forquilhas sejam afetadas ao mesmo tempo. O modelo não especifica como um par de forquilhas de replicação de um cromossomo pode aproximar-se de um par de forquilhas de outro cromossomo ou se ocorrem simples quebras entre os cromossomos. Como microhomologias foram detectadas nos pontos de quebras das translocações recíprocas estudadas, os autores, baseando-se no modelo FoSTeS, afirmam que, havendo paralização da replicação de uma fita de DNA em uma forquilha, em virtude de lesões de fita única no DNA ou da presença de estruturas secundárias, o restabelecimento da replicação pode ocorrer em outra forquilha de replicação com micro-homologia de apenas alguns pares de bases, que, nesse caso, estão localizadas em outro cromossomo. Como resultado a alça que está sendo sintetizada é ligada a sequências do outro cromossomo. O mecanismo baseado em bolhas de replicação explicaria a formação da t(X;22)(q22;q13) que descrevemos. Como nesse rearranjo foram identificadas sequências duplicadas de segmentos de ambos os cromossomos, com tamanhos aproximados (490-570kb), sugerimos que as bolhas de replicação nos cromossomos X e 22 tenham completado estágio similar da síntese quando o rearranjo ocorreu. Esse modelo também pode explicar translocações com deleções de segmentos localizados nos pontos de quebra (Figura 32D).

É intrigante a diversidade de rearranjos associados ao *PLP1*. Uma hipótese é que as LCR localizadas próximas ao gene tornem a região suscetível à formação de diferentes tipos de rearranjos. Esses rearranjos se formariam por um único mecanismo ou cada tipo de rearranjo teria um mecanismo particular. Duplicações em *tandem* e inserções podem-se formar a partir de quebra na dupla fita do DNA. No entanto, rearranjos complexos parecem formar-se a partir de mecanismos baseados em erros na replicação do DNA, tal como o *FoSTeS* e o modelo de bolha de replicação, proposto por Howarth et al. (2011). A translocação t(X;22)(q22;q13), que descrevemos, incluindo a duplicação de *PLP1*, constitui exemplo da complexidade desses eventos.



FIGURA 32. Bolhas de replicação como mecanismo para a formação da translocação t(X;22)(q22;q13): (A) Cromossomos X e 22: cada fita do DNA do cromossomo X é representada por uma linha marrom e outra verde, e do cromossomo 22 por uma linha preta e outra azul; o circulo cinza representa o centrômero. (B) A replicação do DNA se inicia nas bolhas de replicação. O complexo da polimerase é representado por círculos cinza claro. Quebras ou trocas de fita molde (linhas interrompidas roxas) originam a translocação entre os cromossomos X e 22. A replicação procede e as cromátides irmãs separam-se nas células filhas. (C) Uma das células filhas herda os cromossomos X e 22. (D) A outra célula filhas herda a translocação com perda dos segmentos localizados entre os pontos de quebra dos cromossomos X e 22. (Adaptada de Howarth et al., 2011).

# IV.4 Translocação cromossômica familial associada a duplicação e deleções submicroscópicas

#### • Aspectos Clínicos

O probando (Figura 33, III-4), filho de pais não consanguíneos, nasceu por operação cesareana, com peso de 2.640 g ( $5^{\circ}$  percentil). Nos primeiros cinco meses de idade, teve problemas para alimentar-se, com regurgitações frequentes. Sentou sem apoio aos oito meses e andou com um ano e quatro meses de idade. Teve atraso na aquisição da fala, falando apenas palavras isoladas até quatro anos de idade. Examinado no Serviço de Aconselhamento Genético LGH-USP, aos seis anos de idade, sua estatura era de 117 cm (entre os percentis 50° e 75°) e seu peso era de 22 kg (entre 50° e 75°) percentis). Apresentava turricefalia, fácies achatada, testa curta; sinófris, esboço de epicanto, distância intercantal interna de 28,4 mm (entre 50º e 75º percentil), distância intercantal externa de 80 mm (entre  $50^{\circ}$  e  $75^{\circ}$  percentil), cílios longos, ponte nasal baixa, palato alto e estreito; orelhas pequenas e de implantação baixa e hipoplasia da cartilagem auricular. As mãos apresentavam braquidactilia, sindactilia e clinodactilia de  $5^{\circ}$  dedo; havia prega palmar única na mão esquerda. A distância entre os  $1^{\circ}$  e  $2^{\circ}$  artelhos estava aumentada, em ambos os pés. Tinha dificuldade de aprendizado. Reexaminado aos 15 anos de idade, sua estatura era de 164 cm ( $25^{\circ}$  percentil), peso de 62,9 kg ( $75^{\circ}$ percentil) e perímetro cefálico de 55 cm ( $50^{\circ}$  percentil). Continuava com dificuldades escolares e fora encaminhado para avaliação fonoaudiológica.

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

O irmão mais velho do probando (III-3) nasceu por operação cesareana, a termo, pesando 3.250 g ( $25^{\circ}$  percentil). Andou com um ano e dois meses de idade. O exame clínico, aos oito anos, revelou estatura de 135 cm (percentil 90°) e peso de 33 kg (entre os percentis 90° e 97°). Apresentava turricefalia, fácies achatada, testa alta, esboço de sinófris, epicanto, distância intercantal interna de 30 mm (entre  $50^{\circ}$  e  $75^{\circ}$  percentil) e externa de 82 mm (entre os percentis  $75^{\circ}$  e  $97^{\circ}$ ), ponte nasal baixa, palato alto e estreito e orelhas de implantação baixa. As mãos apresentavam braquidactilia, além de clinodactilia de  $5^{\circ}$  dedos. Tinha dificuldade de aprendizado grave. Reexaminado aos 17 anos de idade, sua estatura era de 174 cm (< $50^{\circ}$  percentil), peso de 71,2 kg (< $75^{\circ}$  percentil) e perímetro cefálico de 57,5 cm (+2SD). O paciente tinha graves dificuldades escolares.
Aos 32 anos, a mãe do probando (II-4) tinha estatura de 155 cm (entre o  $10^{\circ}$  e  $25^{\circ}$  percentis) e peso de 73 kg (entre os percentis  $90^{\circ}$  e  $97^{\circ}$ ). Apresentava turricefalia, hipoplasia da porção média da face, orelhas de implantação baixa com lobo hipoplásico, ligado e com fissuras, ponte nasal baixa, boca com cantos voltados para baixo, braquidactilia e clinodactilia de  $5^{\circ}$  dedos, bilateralmente. Teve dificuldade de aprendizado, cursando até a  $8^{\circ}$  série do ensino fundamental.

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

O exame cromossômico realizado em linfócitos de sangue periférico após bandamento G identificou em todos os membros afetados da família uma translocação recíproca entre o braço curto do cromossomo 2 e o braço longo do cromossomo 22 t(2;22)(p14;q12) (Figuras 33 e 34). A translocação não estava presente no irmão fenotipicamente normal do probando.



**FIGURA 33. Segregação da translocação:** Os indivíduos afetados da família (símbolos preenchidos), incluindo o probando (seta) são portadores da translocação (I-2, II-3,4,6, III-3, 4). O pai (II-5) e um dos irmãos do probando (III-5) são fenotipicamente normais e não portadores da translocação. Os demais indivíduos, todos clinicamente normais, não foram examinados.



**FIGURA 34.** t(2;22)(p14;q12): Ideograma (ISCN 2009; cariótipo com 550 bandas G) )dos cromossomos 2, 22 e dos derivativos der(2) e der(22). As setas representam os pontos de quebra da translocação.

## • Mapeamento dos pontos de quebra da translocação por FISH

Em estudo anterior do laboratório, os pontos de quebra da translocação foram mapeados utilizando FISH (Fonseca, 2005). O ponto de quebra do cromossomo 2 foi localizado em 2p14, no BAC RP11-926D3 (chr2:64,982,251-65,158,975, CRCh36 Assembly, hg18), em um segmento de cerca de 42 Kb (chr2:65,062,508-65,104,920), delimitado pelos BAC RP11-953F8 (chr2:64,882,058-65,062,508) e RP11-350H15 (chr2:65,104,920-65,270,305). O gene *SLC1A4* está contido nesse segmento [*solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4]* que, portanto, foi interrompido pela quebra no cromossomo 2. O gene *SLC1A4* codifica um transportador de aminoácido dependente de sódio.

No cromossomo 22, o ponto de quebra foi mapeado no BAC RP11-872124 (chr22:26,966,358-27,123,851), em 22q12.2, num segmento de aproximadamente 22 kb (chr22:26,984,643-27,006,853), delimitado pelos BAC RP11-335E3 (chr22:27,006,853-27,055,142) e RP11-100614 (chr22:26,826,160-26,984,643). Nenhum gene está mapeado nesse intervalo.

# • Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH e validação por FISH

Prosseguimos a análise da translocação, com a busca de duplicações e deleções submicroscópicas, por meio de a-CGH. Na investigação dos pacientes II-3, II-4 e III-4 (Figura 33), utilizamos a plataforma *Human Genome CGH Microarray 105A* (Agilent Technologies, Califórnia), e para os indivíduos III-3 e III-5, a plataforma *SurePrint G3 Human CGH Microarray 60K* (Agilent Technologies, Califórnia). Como não

dispúnhamos de DNA dos pacientes I-2 e II-6, a presença das alterações, nesses casos, foi investigada apenas por FISH.

No probando (III-4) foram detectadas duas alterações no cromossomo 5 (Figura 35A): uma deleção de 1,4 Mb em 5p15.1 (chr5:15,150,402-16,604,445; Human GRCh36 Assembly, hg18) (Figura 35 B) e uma duplicação de 6,6 Mb em 5q23.2–q23.3 (chr5:123,826,017-130,460,873) (Figura 37). A deleção no braço curto de um dos cromossomos 5 foi confirmada por FISH (Figura 35D). A hibridação de sondas mapeadas no segmento duplicado do braço longo do cromossomo 5 mostrou que a sequência adicional estava inserida no ponto de quebra ou próxima ao ponto de quebra do cromossomo derivativo 22, der(22) (Figuras 37C e 39).

A investigação dessas alterações do cromossomo 5 foi realizada em outros membros da família por a-CGH ou FISH. A deleção no cromossomo 5 foi detectada na avó (I-2), na mãe (II-4) e na tia (II-3) do probando, todas afetadas, mas também em seu irmão clinicamente normal (III-5); não estava, entretanto, presente em dois indivíduos afetados, o tio (II-6) e o irmão (III-3) do probando (Figura 36). Portanto, a deleção em 5p15.1 não segregava com o quadro clínico na família.

Por outro lado, a duplicação no braço longo do cromossomo 5 estava segregando com o quadro clínico, juntamente com a translocação: estava presente em todos os afetados, mas não no irmão clinicamente normal do probando (Figura 38).

A análise por a-CGH revelou que o irmão afetado (III-3) do probando possui, além da duplicação em 5q23.2-q23.3, uma deleção de um segmento de 1,2 Mb, em 2p14 (chr2:65,091,268-66,337,825); essa deleção foi confirmada por FISH (Figura 40). Na família, somente o tio (II-6) do probando também era portador dessa deleção (Figura 40C). Entretanto, uma duplicação desse segmento do cromossomo 2 foi detectada por a-CGH no irmão fenotipicamente normal (III-5) do probando (Figura 41). FISH da sonda RP11-263L17 (chr2:65,420,105-65,745,898), mapeada na região duplicada, revelou, além dos sinais nos braços curtos dos cromossomos 2, um sinal adicional no braço curto do cromossomo 5. Portanto, o segmento de 2p14 adicional inseriu-se no cromossomo 5 (Figura 41C).

A localização do segmento duplicado/deletado em 2p14 foi investigada por FISH do clone RP11-263L17 (chr2:65,420,105-65,745,898), em outros membros da família, nos quais não foram detectadas alterações de número de cópias desse segmento por a-CGH. No probando e em sua mãe, tia e avó, o segmento de 2p14 também estava inserido em um dos cromossomos 5 (Figura 42). Denominamos de der(5) esse cromossomo 5 com a inserção.

A presença de um cromossomo 5 rearranjado, contendo uma inserção de segmento do cromossomo 2, revelou a necessidade de reavaliação dos resultados do trabalho anterior (Fonseca, 2005): a análise *in silico* mostrou que as sondas identificadas como localizadas no cromossomo derivativo der(2), na verdade, deveriam estar na região do cromossomo 2 inserida no cromossomo 5. Assim, para redefinir os pontos de quebra do cromossomo 2, foram utilizados os clones de BAC do estudo anterior (Tabela 15).

Clones Posição (hg 18; Build 36) Sinais de hibridação RP11-1151A12 chr2:64,882,042-65,022,734 der(22) **RP11-953F8** chr2:64,882,058-65,062,508 der(22) **RP11-926D3** chr2:64,982,251-65,158,975 der(22);der(5) RP11-350H15 chr2:65,104,920-65,270,305 der(5)RP11-263L17 chr2:65,420,105-65,745,898 der(5)RP11-554F14 chr2:66,394,108-66,576,569 der(5); der(2)**RP11-547F18** chr2:66,977,870-67,154,190 der(2)

Tabela 15: Clones utilizados no mapeamento do ponto de quebra do segmento do cromossomo 2inserido no cromossomo 5.

Em metáfases do probando, a hibridação *in situ* do clone RP11 926D3 produziu sinais de hibridação nos cromossomos 2, der(22) e em um dos cromossomos 5, o der(5) (Figura 43A). O clone RP11-554F14 hibridou nos cromossomos 2, der(2) e no der(5). Esses resultados indicam que os clones RP11-926D3 e RP11-554F14 contêm, respectivamente, os pontos de quebra distal e proximal do segmento do cromossomo 2 inserido no cromossomo 5 (Figura 43B). Os clones RP11-1115A12 e RP11-953F8, que se superpõem parcialmente ao clone RP11-926D3, produziram sinais de hibridação nos cromossomos 2 e der(22); assim, o ponto de quebra distal do segmento do cromossomo 2 inserido no cromossomo 5 situa-se no segmento de 96 kb (chr2:65,062,508-65,158,975), flanqueado por esses clones; este é o ponto de quebra do cromossomo 2, identificado por Fonseca (2005). No entanto, é importante ressaltar que o segmento do

cromossomo 2 inserido no cromossomo 5 no probando corresponde ao segmento deletado em 2p14 identificado por a-CGH em seu irmão (chr2:65,091,268-66,337,825) e, assim, o ponto de quebra distal da inserção mapeado por FISH (limitado a região chr2:65,062,508-65,158,975) contém o ponto de quebra distal da deleção mapeado por a-CGH em chr2:65,091,268. O gene SLC1A4 (chr2:65,069,999-65,104,503) está contido nesse segmento e foi, portanto, interrompido pelo ponto de quebra distal da inserção. O ponto de quebra proximal do segmento do cromossomo 2 inserido no cromossomo 5 está contido no clone RP11 554F14, que mostrou sinais de hibridação nos cromossomo der(2) e der(5). Na porção proximal desse segmento de 182 kb (chr2: 66,394,108-66,576,569) está mapeado o gene MEIS1 (Meis homeobox 1); esse gene, entretanto, não deve ter sido interrompido pela quebra, pois o sinal de hibridação, mais fraco no cromossomo 5, indica que o ponto de quebra ocorreu mais perto da extremidade distal do clone. O ponto de quebra proximal da inserção do cromossomo 2 inserido no cromossomo 5 mapeado por FISH (limitado a região chr2: 66,394,108-66,576,56) não inclui a extremidade proximal da deleção (em chr2: 66,337,825), mapeado por a-CGH. Como foram observados sinais de hibridação do clone RP11 554F14 (chr2: 66,394,108-66,576,569) no der(2) e no der(22), o ponto de quebra proximal da inserção do cromossomo 2 no cromossomo 5 deve estar localizado na extremidade distal do clone RP11 554F14.

Os mesmos resultados foram obtidos com a hibridação desses clones do cromossomo 2 em metáfases da mãe (II-4), da tia (II-3) e da avó (I-2) do probando. Em metáfases do irmão afetado (III-3) e do tio (II-6) do probando, a hibridação *in situ* dos clones RP11 926D3 e RP11 554F14 revelaram sinais de hibridação, respectivamente, nos cromossomos der(22) e der(2), mas não no cromossomo 5, confirmando a ausência do cromossomo der(5) nessas pessoas (Figura 43C). Já a análise em metáfases do irmão fenotipicamente normal (III-5) do probando identificou três sinais de hibridação dos clones RP11 926D3 e RP11 554F14: um em cada cromossomo 2 e o terceiro em um dos cromossomos 5, confirmando a presença nele do cromossomo der(5) (Figura 43D).

O estudo da translocação por meio de a-CGH e FISH revelou que o rearranjo identificado inicialmente como uma translocação recíproca entre os cromossomos 2 e 22 é, na verdade, um rearranjo complexo entre três cromossomos: t(2;5;22). Na Figura 44 estão esquematizados os cromossomos derivativos e sua transmissão na família.

## • Mecanismo de formação da t(2;5;22)

O mecanismo de "chromothripsis" (Stephens et al., 2011; Kloosterman et al., 2011), proposto para a formação da t(10;21)(p13;q22), também podem ser responsável pela formação da t(2;5;22). A translocação pode ter-se originado a partir de duas quebras no braço curto do cromossomo 2, duas no braço curto e duas outras no braço longo do cromossomo 5 e uma quebra no braço longo do cromossomo 22. As quebras teriam ocorrido simultaneamente. Após reunião de extremidades quebradas, formaram-se os cromossomos derivativos esquematizados na Figura 45. Não foi observado na família o der(5) que deve ter sido originalmente formado, com a deleção do fragmento inserido no cromossomo 22. Isso indica que o rearranjo estava presente na meiose de um dos ancestrais da avó do probando. Uma permuta entre o cromossomo 5 normal e o der(5) original, teria dado origem ao der(5) que tem o braço longo normal e o braço curto com a inserção do segmento de 2p14.

# • A importância da combinação de a-CGH e de FISH na caracterização do rearranjo cromossômico

A análise inicial por bandamento G identificou a translocação equilibrada entre o braço curto do cromossomo 2 e braço longo do cromossomo 22 t(2;22)(p14;q12), em todos os membros afetados da família. A caracterização da t(2;22) por a-CGH e FISH revelou a complexidade do rearranjo, ressaltando a importância das duas ferramentas no estudo de rearranjos equilibrados. Inicialmente, Fonseca (2005) mapeou os pontos de quebra dos cromossomos derivativos 2 e 22 por FISH. O gene SLC1A4 estava mapeado no segmento delimitado para o ponto de quebra no cromossomo 2 e foi considerado como principal candidato ao quadro clínico. Prosseguimos a análise, buscando microdeleções/microduplicações, por meio de a-CGH. A abordagem de análise global do genoma permitiu a detecção no probando de duas alterações no cromossomo 5: uma deleção de 1,4 Mb em 5p15.1 e uma duplicação de 6,6 Mb em 5q23.2-q23.3. A avó, a mãe e a tia do probando também eram portadoras dessas alterações no cromossomo 5. No irmão fenotipicamente normal e não portador da t(2;22), foi detectada a deleção no braço curto do cromossomo 5. No tio e no irmão afetado do probando foi identificada apenas a duplicação de 6,6 Mb em 5q23.2-q23.3. Inicialmente esses dados sugeriam que os desequilíbrios submicroscópicos no cromossomo 5 não estavam relacionados com a t(2;22). Como não foram detectadas outras alterações no probando, em sua avó, sua mãe e sua tia, os dados indicavam que a t(2;22) presentes neles era um rearranjo equilibrado.

No entanto, a análise por a-CGH revelou uma deleção em 2p14 no irmão do probando e em seu tio, ambos portadores da translocação. Uma duplicação de segmento correspondente a essa deleção em 2p14 estava presente no irmão fenotipicamente normal do probando. Coincidentemente, o ponto de quebra do cromossomo 2 da t(2;22)foi mapeado por Fonseca (2005) em 2p14, usando FISH em metáfases do probando. Portanto, o segmento 2p14 que continha o ponto de quebra da t(2;22) (no probando, em sua avó, mãe e tia), tinha uma deleção em dois portadores da t(2;22) (o irmão afetado e o tio do probando) e havia a duplicação correspondente no irmão do probando, não portador da t(2;22). Outro achado que chamou atenção foi que os únicos portadores da translocação nos quais não foi detectada a deleção em 5p15.1 eram aqueles portadores da deleção em 2p14. Já o irmão do probando era portador da deleção em 5p15.1 e de duplicação em 2p14. A análise por FISH, que realizamos em seguida, permitiu relacionar os diferentes desequilíbrios submicroscópicos, identificados por a-CGH com a t(2;22). O segmento duplicado do cromossomo 5 estava inserido no ponto de quebra do der(22). No irmão fenotipicamente normal do probando, o segmento duplicado em 2p14 estava inserido no braço curto do cromossomo 5; seu cromossomo 5 tinha a deleção no braço curto. Nos outros portadores da deleção no cromossomo 5 (o probando, sua avó, mãe e tia), o segmento de 2p14 também estava inserido no cromossomo 5, que tinha a deleção. Já no irmão afetado do probando e em seu tio, a deleção do segmento de 2p14 estava explicada, porque eles não possuíam o der(5).



**FIGURA 35. Deleção no cromossomo 5 (5p15.1) no probando: (A)** O perfil do cromossomo 5 mostra as duas alterações detectadas por a-CGH (Plataforma *105A*, *Agilent*): uma deleção em 5p15.1 (seta verde) e uma duplicação em 5q23.2-23.3 (seta vermelha). **(B)** A deleção em 5p15.1 está destacada. O segmento deletado está representado pela linha azul. As variações no número de cópias (CNV) estão representadas pelos blocos vermelhos. **(C)** O mapa do segmento de 1,4 Mb (chr5:15,150,402-16,604,445), que corresponde à deleção, mostra os quatro genes ai localizados e os clones, mapeados nas extremidades do segmento deletado, RP1-137K24, em vermelho (chr5:15,191,420-15,315,309) e RP1-167G20, em verde (chr5:16,354,099-16,529,256). (Adaptado do UCSC, hg 18). **(D)** A hibridação *in situ* fluorescente revelou sinais de hibridação dos clones RP1-137K24 (sinal vermelho) e RP1-167G20 (sinal verde) em apenas um dos cromossomos do par 5.

# RP1-137K24/ RP1-167G20



**FIGURA 36. Investigação da deleção em 5p15.1 na família:** Hibridação *in situ* fluorescente do clone RP1-137K24 (sinal vermelho) e/ou do clone RP1-167G20 (sinal verde), mapeados no segmento deletado: a presença de sinal(is) de hibridação em apenas um dos cromossomos do par 5 mostrou que a avó (I-2), a mãe (II-4), a tia materna (II-3), todas afetadas, e o irmão clinicamente normal (III-5) do probando são portadores da deleção; a presença de sinais de hibridação nos dois cromossomos 5 do irmão (III-3) e do tio (II-6) do probando, ambos afetados, indicam que eles não são portadores da deleção. Assim, a deleção não segrega com o quadro clínico na família.



**FIGURA 37. Duplicação do cromossomo 5 (5q23.2-q23.3) no probando:** (A) a-CGH (Plataforma 105A, *Agilent Technologies*): A linha azul representa o segmento duplicado. Os blocos vermelhos, as variações no número de cópias (CNV). (B) O mapa do segmento de 6,6 Mb (chr5:123,826,017-130,460,873), que corresponde à duplicação, mostra os 17 genes ai localizados e os clones RP11-48C14, em vermelho (chr5:124,179,295-124,350,969) e RP1-236L2, em verde (chr5:129,549,259-129,624,330), contidos no segmento duplicado (adaptado do UCSC, hg 18). (C) Hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-48C14 (sinal vermelho) e RP1-236L2 (sinal verde): os sinais de hibridação estão presentes nos dois cromossomos 5 e também no cromossomo derivativo 22, der(22).

## RP11-48C14/ RP1-236L2



**FIGURA 38.** Investigação da duplicação em 5q23.2-q23.3 na família: Hibridação *in situ* fluorescente dos clones RP11-48C14 (sinal vermelho) e RP1-236L2 (sinal verde), mapeados no segmento duplicado: os sinais de hibridação são visualizados nos dois cromossomos 5 e no derivativo der(22), em metáfases da avó (I-2), da mãe(II-4), da tia(II-3), do tio(II-6) e do irmão (III-3) do probando, todos afetados e portadores da translocação. No irmão clinicamente normal e não portador da translocação (III-5), os sinais de hibridação estão presentes apenas nos cromossomos do par 5. Portanto, a duplicação segrega com o quadro clínico e a translocação na família.



FIGURA 39. Análise da inserção do segmento duplicado de 5q23.2-q23.3, no cromossomo derivativo der(22): (A e B) Hibridação *in situ* fluorescente, em metáfases do probando, do clone RP11-48C14 (sinal verde), mapeado no segmento duplicado do cromossomo 5 juntamente com (A) o clone RP3-353E16 (sinal vermelho), mapeado a cerca de 500 kb do ponto de quebra do cromossomo 22, ou (B) o clone RP11-568N6 (sinal vermelho), mapeado a aproximadamente 500 kb do ponto de quebra do cromossomo 2. Nos dois casos, os sinais do clone RP11-48C14 estão presentes nos dois cromossomos 5 e também no der(22). (A1) No der (22) observa-se que o sinal do clone RP11-48C14 está distal ao sinal do clone RP3-353E16, mas (B1) proximal ao sinal do clone RP11-568N6, indicando que o segmento do cromossomo 5 inseriu-se no ponto de quebra ou próximo ao ponto de quebra no der(22). (C) Esquema da inserção: os clones RP11-48C14 (vermelho), RP3-353E16 (verde) e RP11-568N6 (verde), de acordo com sua posição no der(22); retângulo azul, segmento próximo ao ponto de quebra do der (22); retângulo vermelho, segmento 5q23.2 –q23.3, inserido no cromossomo der(22); retângulo roxo, segmento do cromossomo 2 translocado para o der(22)



C. RP11-263L17/ RP11- 325M20 (chr2)

D. RP11-263L17/ RP11-554F14 (chr2)



FIGURA 40. Deleção em 2p14 no irmão (III-3) e no tio (II-6) afetados do probando: (A) a-CGH (Plataforma 60K, *Agilent Technologies*) em III-3:O segmento deletado está representado pela linha ocre. Variações no número de cópias (CNV) estão indicadas pelos blocos vermelhos. (B) O mapa do segmento de 1,2 Mb, correspondente à deleção, mostra os cinco genes e o clone RP11-263L17, em vermelho (chr2:65,420,105-65,745,898). (Adaptado do UCSC, hg 18). (C) Hibridação *in situ* fluorescente do clone RP11-263L17 (sinal vermelho): o sinal de hibridação está presente apenas no cromossomo 2 normal, em III-3 e II-6. Observam-se os sinais verdes dos clones RP11-325M20 e RP11-554F14, mapeados, respectivamente no braço longo e no braço curto do cromossomo 2, usados como controles.



С.

#### RP11-263L17/ RP11-281O15 (chr5)



**FIGURA 41. Duplicação em 2p14 no irmão normal (III-5) do probando: (A)** a-CGH (Plataforma 60K, *Agilent Technologies*): o segmento duplicado está representado pela linha ocre. O mapa do segmento de 1,2 Mb, que corresponde à duplicação, mostra os cinco genes e o clone RP11-263L17, em vermelho (chr2:65,420,105-65,745,898) localizados nesse segmento (Adaptado do UCSC, hg 18). (**B**) Hibridação *in situ* fluorescente da sonda RP11-263L17 (sinal vermelho) e da sonda controle RP11 281015, mapeada no braço longo do cromossomo 5 (sinal verde): os sinais de hibridação estão presentes nos dois cromossomos 2 e também no braço curto de um dos cromossomos do par 5. Portanto o segmento adicional de 2p14 está inserido no braço curto do cromossomo 5.

# A. RP11-263L17/ RP11-281O15 (chr5)



B. RP11-263L17/ RP11-325M10 (chr2)



C. RP11-263L17/ RP11-281O15 (chr5)



D. RP11-263L17/ RP11-281O15 (chr5)



FIGURA 42. Investigação por FISH da presença de inserção do segmento de 2p14 no cromossomo 5, na família: A hibridação da sonda RP11-263L17 (sinal vermelho) mostrou a inserção de segmento de 2p14 no braço curto de um dos cromossomos 5, (A) na avó (I-2), (B) na tia (II-3), (C) na mãe (II-4) do probando e (D) no probando (III-4). O sinal verde é o de sonda controle, RP11 281015 (A, C e D) e RP11 325M10 (B), mapeadas, respectivamente, nos braços longos dos cromossomos 5 e 2.

## A. RP11-926D3/RP11-281O15 (chr5)

#### RP11-554F14/ RP11-281O15 (chr5)



**FIGURA 43. Delimitação dos pontos de quebra do segmento de 2p14 inserido no cromossomo 5:** (A) FISH do clone RP11-926D3 (sinal vermelho) e do clone RP11-554F14 (sinal vermelho) em metáfases do probando (III-4), junto com a sonda controle RP11-281O15, mapeada no braço longo do cromossomo 5 (sinal verde). Os dois clones hibridaram no cromossomo 2 normal e no der(5). Um terceiro sinal dos clones RP11-926D3 e RP11-554F14 foram identificados, respectivamente, no der(22) e no der(2). Esses resultados indicam que os clones RP11-926D3 e RP11-554F14 contêm, respectivamente, os pontos de quebra proximal e distal do segmento de 2p14 inserido no cromossomo 5 (**B**) O mapa do segmento do braço curto do cromossomo 2 inserido no cromossomo 5 (delimitado pelo retângulo pontilhado) mostra os cinco genes aí localizados e a posição dos clones RP11-1115A12, RP11-953F8, RP11-926D3, RP1-236L2 e RP11-554F14 (Adaptado do UCSC, hg 18). (**C**) No irmão afetado (III-3) do probando, os clones RP11-926D3 (vermelho) e RP11-554F14 (verde) revelaram sinais de hibridação, respectivamente, nos cromossomos der(22) e der(2). (**D**) No irmão fenotipicamente normal (III-5) do probando, foram observados três sinais de hibridação dos clones RP11-926D3 (vermelho) e RP11-554F14 (verde): um em cada cromossomo 2 e outro no cromossomo der(5).



**FIGURA 44. t(2;5;22) - Segregação dos cromossomos derivativos na família: (A)** Esquema dos cromossomos derivativos observados na família e de seus homólogos normais. **(B)** A avó do probando (I-2) era portadora dos cromossomos derivativos der(2), der(5) e der(22). O probando (III-4), sua mãe (II-4) e sua tia (II-3) herdaram os cromossomos der(2), der(5) e der(22). O irmão (III-3) e o tio (II-6) afetados do probando herdaram apenas o der(2) e der(22). O irmão fenotipicamente normal (III-5) é portador do cromossomo der(5). Os cromossomos der(2) e der(22) segregam com o quadro clínico na família.

**B.** 

A.



Figura 45. Mecanismo de múltiplas quebras simultâneas para a formação da translocação t(2;5;22): (A) Em uma primeira etapa, quebras na dupla fita do DNA nos cromossomos 2 (roxo) e 5 (verde) e 22 (vermelho) são induzidas por agentes endógenos ou exógenos à célula. Os centrômeros são representados em cinza. A localização das quebras está indicada pelas setas. Ocorrem duas quebras no cromossomo 2, quatro quebras no cromossomo 5 e uma, no cromossomo 22. (B) As múltiplas quebras provocam fragmentação cromossômica. (C) Os vários fragmentos são unidos entre si, originando os cromossomos derivativos. Um fragmento do braço curto do cromossomo 5 foi perdido. O segmento intersticial resultante das duas quebras no cromossomo 2 inseriu-se entre dois fragmentos do braço curto do cromossomo 5. O segmento intersticial do braço longo do cromossomo 5 uniu-se à extremidade quebrada do braco longo do cromossomo 22; a esse segmento do cromossomo 5, uniu-se o segmento distal do braço curto do cromossomo 2. O segmento distal do cromossomo 22 translocou-se para a extremidade quebrada do braço curto do cromossomo 2. (D) O cromossomo der(5)' originalmente formado, com uma deleção no braço longo e outra no braço curto, não foi observado na família (Figura 44); o der(5) observado possui apenas a deleção no braço curto e resultaria de permuta entre o der(5) original e um cromossomo 5 normal, na meiose de um ancestral da avó do propósito. (E) Os cromossomos derivativos que formam a t(2;5;22) e os cromossomos homólogos normais detectados na avó, mãe, tia e probando são representados na figura.

### • O efeito clínico do rearranjo cromossômico

A duplicação de 6,6 Mb do braço longo do cromossomo 5 está presente em todos os indivíduos afetados da família, mas não no irmão fenotipicamente normal do probando. A outra alteração exclusiva aos afetados é a interrupção do gene *SLC1A4*, por uma das quebras no cromossomo 2, levando a haploinsuficiência. Dois dos afetados possuem ainda uma deleção de 1,2 Mb no braço curto do cromossomo 2, em 2p14; o irmão normal do probando possui a duplicação correspondente. Já a deleção em 5p15.1 além de não estar presente em todos os afetados, foi detectada no irmão normal do probando. Assim, a duplicação do braço longo do cromossomo 5 e a interrupção do gene *SLC1A4* aparecem como as principais alterações candidatas a contribuir para o quadro clínico na família.

#### a) A duplicação do braço longo do cromossomo 5

Todos os afetados da família são portadores da duplicação de 6,6 Mb do braço longo do cromossomo 5 (5q23.2-23.3). Apesar de a duplicação incluir um segmento de 6,6 Mb, nele há poucas variações no número de cópias (CNV), que ocorrem principalmente em segmentos em que não há genes (Figura 37B). A exceção é o gene *ADAMTS19* que apresenta variação no número de cópias na população geral.

A busca no DECIPHER não identificou pacientes com duplicações nessa região. Há na literatura alguns relatos de duplicações parciais puras do cromossomo 5, que incluem o segmento 5q23.2-23.3 (Osztovics e Kiss, 1982; Evans et al., 1984, Martin et al., 1985; Li et al., 1998, Arens et al., 2004, Giardino et al., 2004, Douyard et al., 2006). Todas elas, entretanto, são duplicações extensas detectadas por bandamento G, não permitindo a comparação dos quadros clínicos com aquele da família aqui relatada.

Dezessete genes estão mapeados em 5q23.2-23.3, candidatos, assim, a contribuir para o quadro clínico, por aumento de dosagem de seus produtos (Tabela 16; Figura 37). Seis desses genes têm função desconhecida. Tabela 16: Genes mapeados na duplicação de 6,6 Mb do cromossomo 5 (5q23.2-23.3).

Gene	Informações				
ALDH7A1 (aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1)	Codifica uma alfa amino-adipato semi-aldeído desidrogenase do catabolismo da lisina. Mutações em homozigose, na maioria dos casos, ou em heterozigose são responsáveis pelo quadro neonatal de convulsões dependentes de piridoxina (PDS) e por parte dos casos de aparecimento posterior (Salomons et al., 2007).				
<b>PHAX</b> (phosphorylated adaptor for RNA export)	A proteína PHAX é necessária para a exportação nuclear dos snRNAs e metazoários (Mourão et al., 2010).				
MARCH3 (membrane- associated ring finger)	As proteínas MARCH adicionam ubiquitina a lisinas em substratos protéicos sinalizando para seu transporte vesicular entre os compartimentos membranosos MARCH3 parece atuar na via de reciclagem endossomal (Fukuda et al., 2006).				
LMNB1 (Lamin B1)	Pertence à família de genes que codificam filamentos intermediários tipo V da lâmina nuclear. As lamininas atuam na manutenção da forma e da integridade do núcleo. Duplicações nesse gene foram encontradas em pacientes com leucodistrofia autossômica dominante do adulto (Padiath et al., 2006).				
FBN2 (fibrillin 2)	As fibrilinas se aglomeram em microfibrilinas, formando redes que fornecem apoio estrutural para a formação das fibras elásticas (Miller et al., 2010). Mutações nesse gene são responsáveis por casos de aracnodactilia contratural congênita (ACC).				
<b>SLC12A2</b> (solute carrier family 12)	SLC12A2 é co-transportador de Na-K-Cl, auxiliando o movimento transcelular de cloreto (Payne et al., 1995).				
<b>SLC27A6</b> [solute carrier family 27(fatty acid transporter), member 6]	Expresso principalmente no coração. Codifica membro da família de proteínas que transportam ácido graxo (FATP) (Gimeno et al., 2003).				
ADAMTS19(ADAMmetallopeptidasewiththrombospondintype1motif)	As ADMATS constituem uma família de proteases dependentes de zinco que atuam em diversos processos biológicos, tais como controle de migração celular, diferenciação de células osteoblásticas e estímulo de propriedades adesivas de células tumorais (Cal et al., 2002).				
CTXN3 (cortexin 3)	Expresso em cérebro e rim. Análise de ortólogos indica é altamente conservado entre vertebrados. Baseado na estrutura da proteína Wang et al. (2007) sugerem que ela seja uma proteína de membrana, atuando na sinalização intracelular ou extracelular.				
CHSY3 (chondroitin sulfate synthase 3)	CSS3 é uma glicosiltransferase com atividade tanto de glucoronil-transferase quanto de N-acetilgalactosamina transferase (Yada et al., 2003).				
<b>MEGF10</b> (multiple EGF- like-domains 10)	Expresso principalmente no cérebro. MEG10 atua na absorção do peptídeo amyloid-β no cérebro (Singh et al., 2010).				
ZNF608 (zinc finger protein 60); GRAMD3 (GRAM domain containing 3); C5orf48 (chromosome 5 open reading frame 48); PRRC1 (proline-rich coiled-coil 1); ISOC1 (isochorismatase domain containing 1); AX748201	Sem função conhecida.				

Dentre os genes mapeados em 5q23.2-23.3, conhecem-se apenas duplicações patogênicas do gene *LMNB1*, descritas na leucodistrofia autossômica dominante do adulto (ADLD; MIM 169500). A ADLD é uma doença neurológica de progressão lenta, caracterizada por desmielinização. As manifestações iniciais são autonômicas, seguindo-se sinais piramidais e ataxia (Schuster et al., 2011). Os afetados têm uma cópia extra do gene *LMNB1*, resultando em aumento dos níveis do mRNA (Meijer et al., 2006; Padiath et al., 2006; Brussino et al., 2009; Schuster et al., 2011) e da proteína do LMNB1, detectado no cérebro e em leucócitos do sangue periférico (Schuster et al., 2011). Em virtude da manifestação tardia da doença, com início entre a quarta e a sexta década de vida, investigamos se algum dos portadores da translocação t(2;5;22) apresentava sintomas. Nenhum dos adultos (mãe, tia e tio do probando), todos na quinta década de vida apresentou queixa que levasse a suspeita da doença. A avó do probando, falecida aos 70 anos em virtude de problemas cardíacos, de acordo com a família, também não manifestou sinais da doença.

É interessante que, em uma família com afetados por ADLD, em que não foi detectada duplicação do gene *LMNB1*, os afetados apresentaram níveis aumentados do mRNAm do *LMNB1*, indicando alteração em sequências reguladoras do gene (Brussino et al., 2010). A ausência da doença na família que estudamos pode decorrer do silenciamento ou diminuição da expressão da cópia do gene *LMNB1*, localizada no cromossomo der(22), em consequência de efeito de posição. Sequências do cromossomo 22 podem influenciar a expressão do gene ou, alternativamente, a expressão foi alterada devido à separação de elementos reguladores. A avaliação clínica dos outros pacientes da literatura portadores de grandes duplicações que incluem o segmento 5q23.2-23.3 foi realizada antes da idade da manifestação de sinais de ADLD; assim a família descrita neste estudo é a primeira na qual a duplicação do *LMNB1* não está associada ao fenótipo do *ADLD* em adultos. Estudos posteriores nessa família poderão contribuir para compreender o mecanismo de regulação da expressão do *LMNB1*.

Mutações de ponto em dois outros genes mapeados em 5q23.2-23.3 foram relacionadas a doenças: *ALDH7A1* (convulsões neonatais dependentes de piridoxina), e *FBN2* (aracnodactilia contratural congênita). Não há dados que permitam avaliar possíveis efeitos clínicos que esses ou outros genes mapeados em 5q23.2-23.3 possam ter, quando duplicados. São, portanto, candidatos posicionais.

## b) A interrupção do gene SLC1A4 e a deleção em 2p14

Cinco genes estão mapeados no segmento de 2p14 que está deletado em dois portadores da translocação (Tabela 17; Figura 41B).

Gene	Informações		
<b>SLC1A4</b> [solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4]	Codifica uma proteína de membrana que atua como transportador de aminoácidos neutros, com maior expressão no cérebro (lobo occipital e córtex pré-frontal, amígdala e hipotálamo), músculo e pâncreas, mas presente em todos os tecidos.		
<b>CEP68</b> (centrosomal protein 68kDa)	A CEP68 atua, junto com outras proteínas, na coesão do centrossomo durante a interfase (Graser et al., 2007). Também atua na via de sinalização do fator de crescimento epidérmico (EGF) (Chen et al., 2007).		
<b>RAB1A</b> , (member RAS oncogene family)	Membro da família de oncogenes RAS. A proteína codificada parece ser necessária para o trânsito de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi.		
ACTR2 ARP2 (actin-related protein 2 homolog (yeast)	ARP2 é constituinte do complexo ARP2/3, localizado na superfície celular e essencial para a morfologia e a motilidade da célula.		
SPRED2	As proteínas SPRED são supressores de uma variedade de estimulos extracelulares mitogênicos, como fatores de crescimento e citocinas, através da inibição da via de sinalização MAP quinase, que é um importante regulador da proliferação e diferenciação celular (Nonami et al., 2004). O <i>SPRED2</i> parece atuar no desenvolvimento dos ossos (Bundschu et al., 2005) e na regulação da haematopoiese (Nobuhisa et al., 2004).		

O gene *SLC1A4* localiza-se no ponto de quebra distal que originou o segmento do cromossomo 2 inserido no cromossomo 5. Foi, portanto interrompido, parte dele ficando no der(2) e parte, no segmento inserido no der(5). Todos os portadores da translocação possuem, portanto um único gene *SLC1A4* íntegro. O gene codifica um transportador de aminoácido neutro, que é expresso principalmente no músculo, pâncreas e cérebro. A expressão do gene em neurônios primários está associada à absorção de L-serina. Sua haploinsuficiência pode estar contribuindo para o quadro clínico.

Entre os portadores da translocação, o irmão afetado e o tio do probando não possuem o cromossomo der(5) e portanto possuem deleção do segmento de 2p14 inserido nesse cromossomo. É interessante que justamente esses sejam os portadores da translocação que apresentam maior comprometimento cognitivo, sugerindo que a haploinsuficiência de gene(s) localizado(s) no segmento de 1,2 Mb em 2p14 esteja contribuindo para o fenótipo. Recentemente foram identificados dois portadores de microdeleções em 2p14-p15 (Wohlleber et al., 2011). Um deles possuía uma deleção de 2,23 Mb, que incluía 11 genes. A deleção de 2,84 Mb no outro paciente incluía 15 genes. Ambos apresentavam deficiência mental moderada, com atraso principalmente na aquisição de fala, além de dismorfismos faciais leves. Na região comum às duas microdeleções descritas por Wohlleber et al. (2011) e a deleção em 2p14 no irmão e tio afetados estão mapeados quatro genes: SLC1A4, CEP68, RAB1A e ACTR2. Como o gene SLC1A4 está interrompido em todos os nossos pacientes, a dificuldade de aprendizado mais grave no tio e no irmão do probando pode decorrer da haploinsuficiência de um ou mais dos outros três genes (CEP68, RAB1A, ACTR2). O gene CEP68 é necessário para coesão do centrossomo. Estudos recentes mostram que alterações no centrossomo podem interferir na proliferação de células progenitoras neurais. Mutações no gene Cdk5rap2, que também atua na coesão do centrossomo, causa microcefalia. Lizarraga et al. (2010) sugerem que a diminuição no tamanho do cérebro em humanos portadores de mutações no gene, está associada a erros na função do centrossomo e mudanças na orientação do fuso durante a proliferação de células progenitoras neurais. O RABIA codifica uma GTPase que controla o transporte de proteínas do reticulo endoplasmático para o complexo de Golgi. O ACTR2 codifica um importante constituinte do complexo ARP2/3. Esse complexo está localizado na superfície celular e é importante para a manutenção do formato da célula e de sua mobilidade. Os genes RAB1A e ACTR2 também são candidatos já que atuam na diferenciação neuronal e direcionamento dos axônios (Wohlleber et al., 2011). Vale salientar que a duplicação correspondente do segmento de 2p14 não esta associada a alterações do desenvolvimento, já que foi detectada no irmão normal do probando. Não foi descrita antes. Existem poucas CNV no segmento em 2p14, localizadas principalmente nas regiões não gênicas. No Decipher há um único paciente portador de duplicação que inclui o segmento 2p14, que abrange 25 Mb e inclui outros genes. Apesar de não podemos descartar a possibilidade de manifestação tardia, a presença de uma duplicação em 2p14 em individuo fenotipicamente normal, alerta para a complexidade da interpretação de desequilíbrios submicroscópicos, já que a deleção do mesmo segmento está associada a deficiência mental moderada.

## c) A deleção em 5p15.1

Quatro genes estão mapeados no segmento de 5p15.1 que está deletado em quatro portadores da translocação e no irmão fenotipicamente normal do probando (Tabela 18; Figura 36). A deleção de 1,4 Mb em 5p15.1 pode constituir uma variante rara, sem significado para o desenvolvimento, uma vez que foi detectada no irmão fenotipicamente normal do probando. De acordo com o DGV, 5p15.1 contém poucas CNV, localizadas principalmente na região do gene *FBXL7* (Figura 35A). No DECIPHER há cinco deleções bem mais extensas, que incluem esse segmento, associadas a quadros clínicos [Pacientes 253159 (95243-18909607), 254052 (95243-16154654), 249117 (13104963-18719297),255498 (14171628-23920903), 256304 (130931 36780974]. Tratando-se de variante única, não é possível concluir sobre sua natureza quanto a efeitos fenotípicos de manifestação tardia.

Gene	Informações		
<b>FBXL7</b> (F-box and leucine- rich repeat protein 7)	As proteínas F-box fazem parte do complexo de ligases chamado SCF, que atua na fosforilação dependente de ubiquitinação. As proteínas F-box contêm domínios que interagem com a proteína Skp1, que também faz parte da SCF, assim como as proteínas Cdc53/Cul1, Rbx1 e a enzima Cdc34 (Winston et al., 1999). O gene <i>FBXL7</i> é altamente expresso em todos os tecidos, principalmente no coração, fígado, rim e pulmão.		
MARCH11 (membrane- associated ring finger (C3HC4) 11)	A proteína é um membro da família MARCH de ligases de ubiquitina associadas à membrana. Essas enzimas adicionam ubiquitina a lisinas de substratos protéicos, assim como sinalizam para seu transporte intracelular. MARCH 11 parece ter papel na seleção protéica mediada por ubiquitina, na via de transporte da rede trans-Golgi (Morokuma et al., 2007).		
<b>ZNF622</b> (zinc finger protein 622)	A ZNF622 aumenta a atividade transcricional da MYB, um fator de transcrição ubiquamente expresso que atua no controle da proliferação celular e da diferenciação (Seong et al., 2002).		
<b>FAM134B</b> (family with sequence similarity 134, member B)	O silenciamento do gene <i>FAM134B</i> resulta em alterações estruturais no compartimento cis-Golgi e induz apoptose em gânglios neurais primários e em gânglios neurais da raiz dorsal, sugerindo que a proteína atue na sobrevivência de gânglios neurais autônomos nociceptivos. Já foram detectadas mutações em homozigose nesse gene em pacientes com neuropatia hereditária sensorial e autônoma tipo II B, que apresentam graves mutilações (Kurth et al., 2009)		

Tabela 18: Genes mapea	dos na região	da deleção no	cromossomo	5 (	5p15	).
------------------------	---------------	---------------	------------	-----	------	----

#### Aconselhamento Genético

Quanto aos riscos para a prole, os três irmãos da família que estudamos são portadores de diferentes desequilíbrios cromossômicos e, portanto, estão sujeitos a diferentes riscos. O irmão fenotipicamente normal é portador do cromossomo der(5). A deleção em 5p15 e a duplicação do segmento 2p14 não estão aparentemente associadas a alterações fenotípicas. Quanto ao probando e seu irmão afetado, no caso de transmitirem os cromossomos derivativos, as crianças terão os mesmos desequilíbrios cromossômicos de seus genitores e os fenótipos devem ser semelhantes aos deles. No entanto, a segregação dos cromossomos derivativos e de seus homólogos normais pode levar à formação de gametas com desequilíbrios cromossômicos que causem abortamentos espontâneos ou quadros clínicos mais graves que o de seus genitores, em recém-nascidos. Além disso, a complexidade da t(2;5;22) com vários pontos de quebra aumenta a probabilidade da ocorrência de permutas desiguais entre os derivativos e seu homólogos normais na meiose.

No entanto, é importante ressaltar que rearranjos cromossômicos complexos (CCR) como a t(2;5;22), são transmitidos preferencialmente por mulheres portadores (revisão em Pellestor et al., 2011). Há poucos relatos de transmissões paternas de CCR (Schwanitz et al., 1978; Meer et al., 1981; Grasshoff et al., 2003; Rothlisberger et al., 1999; Gruchy et al., 2009). Uma das hipóteses é que a meiose materna tenha *checkpoints* menos rigorosos (LeMaire-Adkins et al., 1997) e, portanto, seja menos sensível à presença de rearranjos cromossômicos (Pellestor et al., 2011). Portanto, existe a possibilidade, de que os portadores do sexo masculino da t(2;5;22) sejam estéreis.

# IV.5 Translocação cromossômica que provavelmente afeta a expressão do gene IHH: t(2;16)(q35;q24.1)

## • Aspectos Clínicos

A paciente, filha de pais não consanguíneos e clinicamente normais, nasceu de operação cesareana, com peso de 2.640 g ( $<5^{\circ}$  percentil) e comprimento de 51 cm ( $75^{\circ}$  percentil). A triagem de erros inatos do metabolismo em sangue e urina detectou hipotireoidismo. Aos três meses de idade ainda não sustentava a cabeça. Sentou aos nove meses e andou com um ano e meio. Foi encaminhada ao Serviço de Aconselhamento Genético LGH-USP por apresentar alterações nos pés e mãos. No exame clínico, aos oito anos de idade, tinha 139 cm de comprimento ( $97^{\circ}$  percentil), peso de 39 kg ( $97^{\circ}$  percentil) e perímetro cefálico de 50 cm (percentil  $50^{\circ}$ ). As mãos tinham quatro dígitos com ausência aparente do indicador. Apresentava também pé torto congênito com hexadactilia. Tinha testa curta, baixa implantação de cabelos, filtro curto, retrognatia e orelhas em abano. O desenvolvimento neuropsicomotor era normal para a idade.

A análise cromossômica após bandamento G revelou uma translocação recíproca aparentemente equilibrada entre o braço longo do cromossomo 2 e o braço longo do cromossomo 16: t(2;16)(q35;q24.1) (Figura 46).



FIGURA 46. t(2;16)(q35;q24.1): Ideograma (ISCN 2009; cariótipo com 550 bandas G) dos cromossomos derivativos 2 e 16 e seus homólogos normais.

## • Mapeamento dos pontos de quebra da translocação por FISH

Em um estudo anterior do laboratório (Antonini, 2005), os pontos de quebra foram mapeados utilizando FISH. O ponto de quebra do cromossomo 2 foi mapeado na sequência contida no clone RP11-558I16 (chr2:220,650,531-220,748,042, CRCh36 Assembly, hg18) um segmento de 97kb (Figura 47). No cromossomo 16 o ponto de quebra do cromossomo foi mapeado na sequência contida no clone RP11-805I24 (chr16: 84,615,669-84,812,495) um segmento de 197 kb. Para refinar o ponto de quebra no cromossomo 16, utilizamos o clone RP11-514D23 (chr16:84,749,036-84,922,020), que se sobrepõe mais distalmente ao clone RP11-805I24 (Figura 48A). Os sinais de hibridação do clone RP11-514D23 no cromossomo 16 normal e der(2) permite delimitar o ponto de quebra em um segmento de 133 kb (chr16:84,615,669-84,749,036) (Figura 48B). A análise *in silico* das regiões em que estão mapeados os pontos de quebra dos cromossomos 2 e 16 não identificou nesses segmentos a presença de genes conhecidos e que pudessem ser a causa do quadro clínico da paciente.

# • Investigação de perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos por a-CGH e validação por FISH

Prosseguimos a análise da translocação, com a busca de duplicações e deleções submicroscópicas, por meio de a-CGH, usando a plataforma 105A (*Agilent*). A análise não detectou desequilíbrios submicroscópicos associados ou não ao ponto de quebra.

### • Genes mapeados nos segmentos dos pontos de quebra

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



**FIGURA 47. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 2:** Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 2, delimitado pelo clone RP11-558116 (em vermelho). Adaptado de *UCSC*, *hg* 18.



**FIGURA 48.** Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 16: (A) Hibridação *in situ* fluorescente dos clones do cromossomo 16, RP11-805I24 e RP11-514D23. O sinal de hibridação do clone RP11-805I24 foi visualizado nos cromossomos der(16) e der(2), indicando que esse clone contem o ponto de quebra. O sinal de hibridação do clone RP11-514D23 foi visualizado no cromossomo der(2). (B) Mapa mostrando a localização do segmento que contém o ponto de quebra no cromossomo 16, delimitado pelo retângulo de linhas interrompidas; em verde, clone com sinal de hibridação nos cromossomos der(2) e der(16) e em vermelho, clone com sinal de hibridação no cromossomo der(2). O ponto de quebra situa-se no segmento de 133 kb que contem o clone RP11-805I24, delimitado pela porção do clone RP11-514D23 que não se sobrepõe ao clone RP11- 805I24. Adaptada de *UCSC*, *hg 18*.

## • Genes candidatos

Não foram identificados genes nos segmentos que delimitam os pontos de quebra dos cromossomos 2 e 16. A análise por a-CGH também não detectou desequilíbrios submicroscópicos associados ou não ao ponto de quebra. Como a caracterização do rearranjo não revelou genes candidatos, é possível que a associação entre a t(2;16) e o fenótipo seja ao acaso. Entretanto é importante ressaltar que microdeleções ou microduplicações menores que 60-90 kb não teriam sido detectadas pela plataforma de 105A (Agilent). Outra hipótese é que o rearranjo cromossômico possa ter alterado a expressão de genes próximos ao ponto de quebra por efeito de posição. Analisamos a região 1,2 Mb proximal e 1,2 Mb distal aos pontos de quebra dos cromossomos 2 e 16 para identificar genes cuja expressão pudesse ter sido alterada pelo rearranjo. No cromossomo 2, ao redor do ponto de quebra estão mapeados 28 genes, um único distal ao ponto de quebra, o gene EPHA4 (EPH receptor A4) (Figura 49). Quatro genes nessa região já foram associados a quadros clínicos (IHH, NHEJ, DES e OBSL1). Mutações no gene IHH (Indian hedgehog) causam braquidactilia tipo A1 (MIM, 112500) (Gao et al., 2001). A doença, com padrão de herança dominante, é caracterizada pelo encurtamento ou ausência das falanges dos dígitos. Já foram identificadas mutações missense e nonsense no gene (Lodder et al., 2008). A paciente portadora da t(2;16) tem alterações de mãos e pés. O IHH é, portanto, um bom candidato ao quadro clínico. Mutações em homozigose no gene NHEJ (nonhomologous end-joining factor 1) causam imunodeficiência grave com microcefalia, retardo de crescimento e sensibilidade a radiação ionizante. O gene DES (desmin) codifica a proteína desmin, que atua especificamente no músculo. Mutações no gene causam miopatia cardioesquelética (MIM, 604765). Alterações nesse mesmo gene são responsáveis pela síndrome de *KAESER* ou síndrome escapuloperoneal (MIM, 181400) (Walter et al., 2007). De manifestação tardia, a doença é caracterizada pela fraqueza e atrofia dos músculos com distribuição escapuloperoneal. O padrão de herança das duas doenças é dominante. Mutações no gene OBSL1 (Obscurin-Like 1) causam a síndrome 3M (MIM, 612921), que é caracterizada por grave restrição de crescimento intra-uterino e pós-natal (Hanson et al., 2009). A doença tem padrão de herança recessivo. O fenótipo da portadora da t(2;16) não está relacionado ao quadro clínico dessas doenças e, portanto, os genes NHEJ, DES e OBSL1 não parecem contribuir ao fenótipo. Não há dados na literatura que indiquem que a alteração na expressão dos outros genes mapeados próximos ao ponto de quebra do cromossomo 2 possam ser patogênicas. No

cromossomo 16, oito e quatro genes estão mapeados, respectivamente, nas regiões 1,2 Mb proximal e distal ao ponto de quebra (Figura 50). Alterações no gene *FOXF1* (*forkhead box F1*) estão associados a displasia capilar alveolar (MIM, 265380). Mutações no gene *FOXC2* (*forkhead box C2*) causam a síndrome de distiquíaselinfedema (MIM, 153400), caracterizada pelo acúmulo de líquidos nos membros, principalmente pernas e braços. O fenótipo da portadora da t(2;16) não se enquadra no quadro clínico dessas doenças e, portanto, os genes *FOXF1* e *FOXC21* não parecem contribuir para o fenótipo. Não há dados na literatura que indiquem que a alterações na expressão dos outros genes mapeados próximos ao ponto de quebra do der(16) possam ser patogênicas. Concluímos que, apesar do gene *IHH* estar mapeado a mais de 1 Mb de distância do ponto de quebra do cromossomo 2, a alteração na expressão do gene *IHH* é o principal mecanismo candidato ao quadro clínico da paciente.



**FIGURA 49. Região próxima ao ponto de quebra do cromossomo 2 da t(2;16):** Mapa do segmento 1,2 Mb distal e 1,2 Mb proximal ao ponto de quebra do cromossomo 2, delimitado pelas linhas pontilhadas. Na região proximal ao ponto de quebra estão mapeados 28 genes, incluindo o gene *IHH* (seta). O gene *EPHA4* é o único gene mapeado na região distal ao ponto de quebra. Ressalta-se que o segmento de 97kb que contem o ponto de quebra está incluído em uma região de 1,7 Mb entre o *SLC4A3* e *EPHA4*, no qual não há genes mapeados (*Adaptado de UCSC, hg 18*).



**FIGURA 50. Região próxima ao ponto de quebra do cromossomo 16 da t(2;16):** Mapa do segmento 1,2 Mb proximal e 1,2 Mb distal ao ponto de quebra do cromossomo 16, delimitado pelas linhas pontilhadas. Na região proximal e distal ao ponto de quebra estão mapeados, respectivamente oito e quatro genes (*Adaptado de UCSC, hg 18*).

## • O gene IHH

O gene *IHH* codifica uma molécula sinalizadora da família *hedgehog* que atua na diferenciação dos condrócitos e na formação óssea cortical. A molécula tem papel fundamental na formação óssea endocondral através da regulação e diferenciação dos condrócitos via controle de *feedback* negativo com o peptídio relacionado ao hormônio paratireoideo (*parathyroid hormone-related peptide*, PTHrP) (Vortkamp et al., 1996). O *IHH* também promove a formação dos ossos corticais por meio da sinalização via receptores Ptch1 em osteoblastos. Ma et al. (2011) sugerem que diferentes mutações no *IHH* afetam a sinalização da proteína em múltiplos níveis, causando desenvolvimento anormal de ossos e formação anormal de dígitos.

## a) O gene IHH e os rearranjos cromossômicos

A portadora da t(2;16) tem quatro dígitos nas duas mãos, com aparente ausência do indicador e nos pés tem hexadactilia. O IHH é, portanto, bom candidato ao quadro clínico. O gene localiza-se entre 1,0-1,1 Mb upstream ao ponto de quebra do cromossomo 2 e poderia afetar a expressão do gene, por efeito de posição. Há evidências na literatura indicativas de que alterações em possíveis regiões reguladoras do gene resultam em malformações de membros. O camundongo mutante doublefoot (Dbf) tem polidactilia pré-axial nos quatros membros e neles foi detectada expressão exacerbada do gene *ihh* (Babbs et al., 2008). O sequenciamento do gene não revelou mutações. No entanto, foi detectada uma deleção de aproximadamente 600 kb a 50 kb distal ao *ihh*. A deleção incluía parte da sequência do gene *Nhej1* e de outros 22 genes (Figura 51). Os autores sugerem que o mecanismo responsável pelo fenótipo seria um aumento da expressão do *ihh* devida à alteração de um elemento regulador distante em cis ao gene ihh: um repressor na região deletada ou um enhancer localizado além da deleção. Evidências em humanos também indicam que a expressão alterada do IHH pode estar associada a alteração no desenvolvimentos dos membros (Figura 51). Sindactilia dos dedos dos pés e das mãos foi observada em um portador da translocação t(2;7)(q35;p22), que interrompe o gene NHEJ1 no intron 5 (Cantagrel et al., 2007). A consequência desse rearranjo seria isolar o gene IHH de possíveis elementos reguladores localizados downstream ao gene (Babbs et al., 2008). No entanto, como o paciente não tinha polidactilia, Babbs et al. (2008) sugerem que o fenótipo do portador da t(2;7) está relacionado à diminuição da expressão do IHH e não ao aumento da expressão do gene, como no camundongo Dbf. Recentemente, alterações na expressão

do *IHH* foram associadas a ganhos de número de cópias em pacientes com sindactilia e craniossinostose (Klopocki et al., 2011). Nesse trabalho foram identificadas três famílias portadoras de microduplicações de 38-48 kb que segregavam com o quadro clínico. Uma das duplicações inclui o *IHH*, mas as outras duas estão distais ao gene, em regiões intrônicas do gene *NHEJ1*. Todos os portadores das microduplicações tinham sindactilia de partes moles nos dedos das mãos e sindactilia nos dedos dos pés (exceto nos dígitos 2 e 3). Na família em que os afetados tinham a duplicação mais distal, observou-se também polidactilia pré-axial dos dedos dos pés. Nas duas regiões de superposição das duplicações foram identificados elementos conservados não codificadores. Estudos com genes repórteres revelaram que esses elementos têm atividade de *enhancers* que atuam nos membros em desenvolvimento e no crânio. Os autores propõem que as duplicações diminuem ou aumentam a expressão do *IHH* e, consequentemente, afetam a complexa rede reguladora de sinalização durante a formação dos dígitos e do crânio.



**FIGURA 51. Rearranjos cromossômicos associados a desregulação do gene** *IHH*: Mapa do segmento entre o gene *IHH* (seta escura) e o ponto de quebra do cromossomo 2 da t(2;16) (delimitado pela linha pontilhada). Os genes mapeados na região são representados. Foram descritas três duplicações (retângulos azuis) em pacientes com sindactilia dos dedos dos pés e mãos (Klopocki et al., 2011): uma das duplicações inclui o *IHH*, mas as outras duas estão distais ao gene, em regiões intrônicas do *NHEJ1*. O ponto de quebra do cromossomo 2 de uma translocação t(2;7)(q35;p22) (seta vermelha) associada a sindactilia dos dedos dos pés e mãos também ocorreu no intron do *NHEJ1* (Cantagrel et al., 2007). O camundongo mutante *doublefoot* (Dbf) tem polidactilia pré-axial nos quatros membros. A análise molecular revelou a presença uma deleção de aproximadamente 600kb localizada a 50 kb *downstream* ao *ihh* (retângulo escuro). A deleção incluía parte da sequência do gene *Nhej1* e de outros 22 genes. O ponto de quebra do cromossomo 2 da t (2;16) localiza-se a cerca de 300 kb da extremidade distal da deleção Dbf. (Adaptado de UCSC, hg 18).

Esses estudos (Cantagrel et al., 2007; Babbs et al., 2008; Klopocki et al., 2011) indicam que a expressão do gene IHH seria regulada por elementos localizados distais ao gene. No entanto, se o fenótipo da portadora da t(2,16) for resultado da desregulação do gene *IHH*, o rearranjo teria afastado o gene de elementos reguladores localizados em segmento a mais de 1 Mb distal ao gene. No caso do camundongo mutante Dbf uma das hipóteses é que a deleção de 600kb tenha aproximado o Ihh de um elemento regulador distante. A deleção detectada no camundongo (chr1:75,098,488-75,694,480, mm9) corresponde a um segmento de 625 kb do genoma humano (chr2:219,727,736-220,351,470, hg 18). A região da deleção no camundongo está localizada cerca de 300 kb do ponto de quebra da t(2,16) (chr2:220,650,531-220,748,042). O(s) mesmo(s) elemento(s) regulador(es) aproximado(s) ao ihh pela deleção no camundongo mutante Dbf, poderia(m) ter sido interrompido(s) ou separado(s) do IHH pelo rearranjo cromossômico na portadora da t(2;16). Além do gene SOX9, outros genes que atuam no desenvolvimento tem a sua expressão controlada por elementos reguladores localizados a grandes distâncias. Um deles é o Sonic hedgehog (SHH), que também atua no desenvolvimento dos membros. Lettice et al. (2002) mostraram que a interrupção de um elemento regulador localizado a cerca de 1 Mb do SHH, altera a expressão do gene resultando em polidactilia pré-axial (Lettice et al., 2002). Os autores estudaram um portador de translocação t(5,7)(q11,q36) com ponto de quebra localizado no intron 5 do gene LMBR1. No mesmo estudo, uma inserção no intron correspondente do gene Lmbr1 foi identificada no camundongo mutante Ssq que também tinha polidactilia. Nesses animais a expressão do shh estava alterada. No paciente portador da translocação e no camundongo mutante Ssq, o mesmo elemento conservado não codificador foi interrompido, indicando que esse elemento atua como regulador da expressão do Shh, mesmo a 1 Mb de distância do gene. Um estudo posterior (Sagai et al., 2005) revelou que a deleção desse mesmo elemento em camundongos resulta na ausência da expressão do *shh* nos membros em desenvolvimento e em degeneração de elementos esqueléticos distais a junção estilopódio/zigopódio. Esses dados indicam que a sequência conservada é necessária para o desenvolvimento correto dos membros. A análise comparativa genômica revelou que uma sequência correspondente estava próxima ao gene shh no genoma de um peixe teleósteo. Os autores sugerem que sequências intrônicas conservadas evoluíram de um ancestral comum a peixes e tetrápodas para controlar o desenvolvimento dos membros.

## b) Busca de elementos conservados não codificadores candidatos a serem reguladores do gene IHH na região próximo ao ponto de quebra do cromossomo 2 da t(2;16)

Entre os genes SLC4A3 e o EPHA4 há um segmento de 1,7 Mb (chr2:220,214,946-221,990,991) no qual não há genes mapeados (Figura 49). Essa é uma região candidata a conter sequências conservadas que atuem na regulação do IHH. Nessa região localiza-se o ponto de quebra do cromossomo 2 da t(2;16) (chr2:220,650,531-220,748,042). Assim, nossa hipótese é que o fenótipo da portadora da t(2;16) resultaria da interrupção de elemento regulador ou do afastamento de elemento regulador mapeado a mais de 1 Mb upstream ao IHH. Na busca desses elementos reguladores, buscamos por regiões evolutivamente conservadas com auxílio do programa ECR Browser, que permite alinhar sequências de várias linhagens de vertebrados e a análise comparativa do segmento alvo (Ovcharenko et al., 2004). Foram consideradas sequências com mais de 75% de identidade com no mínimo 350 pares de bases (Benko et al., 2009). No segmento de 1,3 Mb (chr2:220,650,531-221,990,991), correspondente à extremidade proximal do clone RP11-558I16, que contém o ponto de quebra do cromossomo 2, até o inicio do gene EPHA4 (Figura 52A), foram identificados 11 elementos conservados não codificadores (CNE) no genoma de humanos, chimpanzé, macaco rhesus, cão, bovino, camundongo, rato e galinha. Um desses CNE, uma sequência de 450 pares de base (chr2:220,741,697-220,742,145), com identidade de 75% entre vertebrados, localiza-se na extremidade distal no clone RP11-558I16 e pode ter sido interrompido pelo rearranjo ou translocado para o der(16) (Figura 52B). Se atuar como elemento regulador do gene, sua interrupção ou perda de comunicação com o *IHH* pode ter alterado a expressão do gene.



FIGURA 52. Análise genômica comparativa da região 1,3 Mb downstream ao ponto de quebra do cromossomo 2: (A) Esquema da região genômica proximal e distal ao ponto de quebra do cromossomo 2, contido no clone RP11-558116 (em vermelho) (*Adaptado de UCSC, hg 18*). As linhas pontilhadas delimitam a região de 1,3 Mb analisada em busca de elementos conservados não codificadores (CNE) com auxílio do programa *ECR Browser*. Foram identificados nessa região 11 elementos conservados não codificadores (CNE) no genoma de humanos, chimpanzé, macaco *rhesus*, cão, bovino, camundongo, rato e galinha. Um desses elementos localiza-se na região do clone RP11-558116 (**B**) Sequência genômica correspondentes ao segmento do clone RP11-558116 que contem o ponto de quebra do cromossomo 2: foi identificado um elemento conservado de 450 pb (chr2:220,741,697-220,742,145) (seta azul), localizado na extremidade distal do clone, que pode ter sido interrompido pelo ponto de quebra ou translocado para o der(16). A sequência de 450 pb está conservada em todos os grupos de vertebrados estudados, excetuando bovino, em que a sequência foi perdida. Em rosa, elementos conservados; em azul, transposons e elementos repetitivos simples; em vermelho, regiões intergênicas. O eixo horizontal corresponde ao alinhamento da sequência referência. O eixo vertical, que varia de 50 a 100%, corresponde ao nível de identidade do nucleotídeo nesse alinhamento. (Retirado do *ECR browser*).

V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES
## **V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES**

Este estudo teve como objetivo identificar mecanismos pelos quais rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados possam estar associados de maneira causal a determinados quadros clínicos. Para isso estudamos seis translocações cromossômicas aparentemente equilibradas, detectadas em pacientes com malformações congênitas, comprometimento neuropsicomotor ou déficit intelectual. Os pontos de quebra desses rearranjos foram mapeados por hibridação in *situ* fluorescente (FISH). A busca por microdeleções e duplicações genômicas foi realizada por a-CGH.

Estudamos duas translocações esporádicas, t(7;17)(p.13;q24) e t(17;20)(q24.3;q11.2), nas quais os pontos de quebra no cromossomo 17 foram localizados, respectivamente, a 917-855 kb e 624-585 kb upstream ao gene SOX9, em segmentos sem genes mapeados. Ambos os portadores apresentavam alterações esqueléticas que indicaram o diagnóstico de displasia campomélica acampomélica. Não foram detectados desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos por a-CGH. Essas translocações podem levar à expressão alterada do gene SOX9, ao afetar a região reguladora desse gene. Sequências dos outros cromossomos participantes da translocação, que foram aproximadas ao gene pelo rearranjo, também podem ter afetado sua expressão. O estudo dos rearranjos t(7;17) e t(17;20) forneceu informação para o entendimento da região reguladora do gene. As manifestações clínicas associadas à t(17;20) permitiram redefinir o limite distal do *cluster* distal de rearranjos do cromossomo 17 associados ao espectro de manifestações clínicas do SOX9. A presença de testículo no portador dessa translocação indicou um elemento conservado candidato a atuar como enhancer do SOX9, para o desenvolvimento do testículo.

Duas outras translocações equilibradas estavam associadas a desequilíbrios submicroscópicos em cis aos pontos de quebra. Caracterizamos uma t(10;21)(p13;q22) esporádica associada a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, microcefalia e espasticidade generaliza. Os pontos de quebra dos cromossomos 10 e 21, foram mapeados, respectivamente, em segmentos de 440 kb e 172 kb. Três genes estão mapeados no segmento que contém o ponto de quebra do cromossomo 10 e três outros, no intervalo delimitado para o ponto de quebra no cromossomo 21. O gene *CDNF*, que pode ter sido interrompido pelo ponto de quebra do cromossomo 10, é altamente expresso no sistema nervoso. A análise por meio de a-CGH detectou quatro deleções no

cromossomo 10 todas *de novo*, indicando a complexidade do rearranjo. Duas deleções estavam próximas ao ponto de quebra: uma deleção de 973 kb em 10p14 e uma outra de 1,15 Mb em 10p13, mapeadas a 3,27 Mb e 210 kb do ponto de quebra da translocação, respectivamente. Outras duas deleções no cromossomo 10 ocorreram no braço longo: uma deleção de 700 kb em 10q26.13 estaria a 110,10 Mb do ponto de quebra da translocação, mas não conseguimos mapeá-la por FISH; uma outra deleção de 1,66 Mb em 10q26.2-q26.3 foi mapeada a 114,68 Mb do ponto de quebra da translocação. Quatorze genes estão localizados nas regiões das microdeleções. Os genes *GPR26, OPTN*, CUGBP2 são altamente expressos no sistema nervoso e, assim como o *CNDF*, podem ser considerados candidatos ao efeito fenotípico. O modelo de *chromothripsis*, em que o rearranjo resulta de uma série de quebras na dupla fita do DNA, seguida de ligação aleatória dos fragmentos resultantes, pode explicar a formação da translocação t(10;21).

Aplicando a-CGH no estudo de uma translocação t(X;22)(q22;q13) esporádica, detectamos duplicações de 490 kb e 570 kb, respectivamente, em 22q13 e Xq22. A análise por FISH revelou que as cópias adicionais desses segmentos estavam localizadas nos pontos de quebra dos cromossomos derivativos X (segmento duplicado de 22q13) e 22 (segmento duplicado de Xq22). Não há genes mapeados no segmento duplicado do cromossomo 22. Um dos 14 genes duplicados no cromossomo X é o PLP1 (proteolipid protein 1), cujas mutações de ponto e duplicações causam a doença de Pelizaeus-Merzbacher, caracterizada pela hipomielinização do sistema nervoso central e afetando quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino. O exame neurológico, incluindo ressonância magnética, mostrou que o quadro clínico da paciente é compatível com o da doença de Pelizaeus-Merzbacher. A análise do padrão de inativação do cromossomo X em linfócitos de sangue periférico da paciente, com base na metilação do gene AR e também citologicamente em metáfases, após incorporação de 5-BrdU, revelou que, na maioria das células, o cromossomo X normal está inativo. Esse padrão de inativação torna as células funcionalmente equilibradas quanto aos segmentos translocados. O PLP1, entretanto, tem uma cópia adicional no cromossomo 22, além das cópias localizadas nos cromossomos X e der(X). Portanto, duas cópias ativas do gene estão presentes nas células da portadora da t(X;22). O mecanismo de formação de rearranjos cromossômicos baseado em bolhas de replicação explicaria a formação de

translocações com duplicação em ambos os pontos de quebra, como ocorreu nessa t(X;22).

Estudamos também uma aparente t(2;22)(p14;q12) familial que cossegregava com quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldade de aprendizado associados a dismorfismos craniofaciais e alterações de mãos. A identificação de duplicações e deleções submicroscópicas, por meio de a-CGH e sua validação por FISH revelaram que se tratava, na verdade, de rearranjo, complexo entre três cromossomos 2, 5 e 22: um segmento de 1,2 Mb de 2p14 inseriu-se no braço curto do cromossomo 5, um evento que pode ter causado a deleção de um segmento de 1,4 Mb em 5p15.1; no cromossomo derivativo der(22) um segmento adicional de 5q23.2-23.3 inseriu-se no ponto de quebra. Todos os afetados da família eram portadores do der(2) e do der(22). No entanto, o der(5) não segregava com o quadro clínico e foi detectado em um individuo fenotipicamente normal da família. Todos os afetados eram portadores da duplicação de 6,6 Mb do braço longo do cromossomo 5 (5q23.2-23.3). Os 17 genes duplicados são candidatos para o quadro clínico, por aumento da dosagem de seus produtos. Outra alteração comum a todos os afetados foi a haploinsuficiência do gene SLC1A4 mapeado em 2p14 e altamente expresso no sistema nervoso. É interessante que a deleção em 2p14, consequente à ausência do der(5), está restrita aos dois afetados que aparentam tem maior déficit cognitivo. Além do SLC1A4, quatro genes mapeados nesse segmento CEP68, RAB1A, ACTR2 e SPRED2 podem contribuir para a variabilidade clínica dos afetados. A translocação t(2;5;22) pode ter-se originado a partir de duas quebras no braço curto do cromossomo 2, duas no braço curto e duas outras no braço longo do cromossomo 5 e uma quebra no braço longo do cromossomo 22. As quebras teriam ocorrido simultaneamente em um único evento. Após reunião de extremidades quebradas, formaram-se os cromossomos derivativos.

Investigamos por a-CGH uma t(2;16)(q35;q24.1) esporádica cujos pontos de quebra foram mapeados anteriormente por FISH; nenhum gene estava mapeado nos segmentos que continham esses pontos de quebra. Não detectamos desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos. A paciente portadora da translocação t(2;16) tinha quatro dígitos nas duas mãos e hexadactilia nos pés. A cerca de 1 Mb do ponto de quebra do cromossomo 2 está mapeado o gene *IHH*, que atua no desenvolvimento dos membros. A translocação pode ter interrompido elemento regulador do *IHH* ou

separado o gene de elemento(s) regulador(es), levando à alteração de sua expressão e ao fenótipo.

Este estudo fornece evidência adicional da importância da busca de desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos em associação com rearranjos aparentemente equilibrados. Em três das seis translocações estudadas - t(10;21), t(2;22), t(X;22) - foram detectados desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos em cis aos pontos de quebra, que podem ser responsáveis pelas manifestações clínicas dos portadores. Este estudo ressalta ainda a importância da técnica de FISH na análise dos desequilíbrios cromossômicos detectados por *array*, permitindo determinar a relação entre as perdas ou ganhos de segmentos submicroscópicos e os rearranjos equilibrados. A caracterização de rearranjos equilibrados neste estudo também contribuiu para sugerir mecanismos para sua formação.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

### VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study aimed at identifying mechanisms that lead to phenotypic abnormalities in carriers of balanced chromosomal rearrangements. We studied six apparently balanced chromosomal translocations detected in patients with congenital malformations, intellectual impairment or neuropsychomotor delay. Breakpoint mapping of apparently balanced chromosomal rearrangements was performed by fluorescence in situ hybridization (FISH), and cryptic genomic imbalances were investigated by array comparative genomic hybridization (a-CGH).

We studied two sporadic translocations, t(7;17) (p13;q24) and t(17;20) (q24.3,q11.2). The breakpoints were located on chromosome 17, respectively, 917-855 kb and 624-585 kb upstream the *SOX9* gene. There are no genes mapped to these segments. Patients had skeletal abnormalities that led to the diagnosis of acampomelic campomelic dysplasia. No submicroscopic chromosomal imbalances were detected by a-CGH. These translocations can alter gene expression by directly disrupting regulatory elements or by a position effect. The translocation t(7;17) and (17;20) provided additional information regarding the regulatory region of SOX9. The clinical manifestations associated with the translocation t(17;20) allowed the redefining of the limits of the distal breakpoint cluster of rearrangements on chromosome 17, which are associated with *SOX9*-related disorders. A conserved element was identified as a candidate *SOX9* enhancer for testis development.

Two additional sporadic translocations were associated with submicroscopic imbalances in cis to the breakpoints: t(10;21) and t(X;22). The translocation t(10;21)(p13;q22) was present in a girl with delayed motor development, microcephaly and generalized spasticity. The breakpoints on chromosomes 10 and 21 were mapped to 440 kb and 172 kb segments, respectively. Among the genes mapped to these breakpoint regions, only *CDNF* on chromosome 10, is highly expressed in the nervous system. Four *de novo* deletions on chromosome 10 were identified by a-CGH, revealing the complexity of the rearrangement. Two deletions were located at the vicinity of the translocation breakpoint: a 973 kb deletion on 10p14 and a 1.15 Mb deletion on 10p13 located, respectively, 3.27 Mb and 210 kb distal to the translocation breakpoint. Two other deletions were detected on the long arm of chromosome 10: a 700 kb deletion on 10q26.13, located 110.10 Mb distal to the translocation breakpoint, which we could not

mapped by FISH; and a 1.66 Mb deletion on 10q26.2-q26.3, located 114.68 Mb distal to the translocation breakpoint. Fourteen genes are mapped to the microdeletion regions. Among these genes, *GPR26, OPTN, CUGBP2* are highly expressed in the nervous system and, together with *CNDF*, are candidates for having clinical effects. The *chromothripsis* model, in which rearrangements result from a series of simultaneous double-stranded breaks followed by random joining of chromosomal fragments, might explain the formation of this t(10,21) translocation.

Applying a-CGH to the apparently balanced translocation t(X;22)(q22;q13)carried by a girl, we detected duplicated segments on 22q13 and Xq22, encompassing 490 kb and 570 kb, respectively. FISH analysis revealed that the additional copies were located to the breakpoints of the derivative X chromosome (22q13 duplicated segment) and of the derivative 22 chromosome (Xq22 duplicated segment). No genes are mapped to the duplicated segment of chromosome 22. One of the 14 duplicated genes on the X chromosome is PLP1 (proteolipid protein 1). PLP1 point mutations and duplications cause Pelizaeus-Merzbacher disease, characterized by hypomyelination of the central nervous system, and affecting almost exclusively males. Neurological examination of the patient, including MRI showed that her clinical manifestations were compatible with Pelizaeus-Merzbacher disease. The pattern of X chromosome inactivation was determined in peripheral blood lymphocytes, based on the AR gene methylation, and cytologically, in metaphases spreads, after 5-BrdU incorporation, and showed that the normal X chromosome was the inactive one in the majority of cells. This pattern of X inactivation makes cells functionally balanced for the translocated segments. A copy of the *PLP1* gene, however, is present on chromosome 22, in addition to the copies located on the chromosomes X and der(X). Thus, two active copies of the gene are present in the cells, irrespective of the X-inactivation pattern. A mechanism based on replication bubbles can explain the formation of translocations with duplication at the breakpoints, such as this t(X;22).

An apparently balanced familial translocation t(2;22)(p13;q12.2) was detected in association with learning disability and craniofacial and hand dysmorphisms. The combination of a-CGH and FISH revealed that the rearrangement, identified by G-banding as a two-break balanced translocation, was a more complex three-chromosome rearrangement: a segment from chromosome 2 was inserted into chromosome 5 short arm, an event that probably caused a 5p15.1 deletion; on chromosome 22 a segment

from 5q23.2-23.3 was inserted into the breakpoint. Chromosomes der(2) and der(22) were present in all affected individuals. However, the der(5) did not segregate with the clinical phenotype, and was detected in a phenotypically normal individual. The 6.6 Mb duplication of the long arm of chromosome 5 was the imbalance common to all affected individuals. The 17 genes in this region are candidates for the clinical phenotypes through dosage effect. In addition, common to all affected individuals is the haploinsufficiency of SLC1A4, a gene highly expressed in the nervous system, which is encompassed by the deletion on chromosome 2. Interestingly, learning disabilities were more pronounced in those patients who also carried chromosome 2 deletion. *CEP68, RAB1A, ACTR2* and *SPRED2*, mapped to this deleted segment, might contribute to the variability of the clinical phenotype in the family. The translocation t(2;5;22) might have originated from a series of simultaneously occurring brakes, two on the short arm of chromosome 2, four breaks on the short arm and two on the long arm of chromosome 5, and one break on the long arm of chromosome 22.

We also investigated by a-CGH a sporadic translocation t(2;16)(q35;q24.1) whose carrier had hand and feet defects. Submicroscopic imbalances were not detected. Previously performed FISH delimited the breakpoints segments on chromosomes 2 and 16, which encompassed no genes. The *IHH* gene, which is involved in limb development, is located approximately 1 Mb upstream chromosome 2 breakpoint. Therefore, the translocation might have disrupted a regulatory element of IHH or, alternatively, separated the gene from a regulatory region, thus altering IHH expression.

This study provides further evidence for the occurrence of submicroscopic chromosomal imbalances in association with apparently balanced rearrangements. In three out of six translocations - t(10,21), t(2;5;22), t(X;22) - cryptic duplications/deletions in cis to the breakpoints were detected, which might account for the clinical manifestations of the patients. This study also highlights the importance of FISH in the analysis of genomic imbalances detected by array in determining how losses and gains of submicroscopic segments relate to the rearranged chromosomes. The characterization of the balanced translocations in this study also contributed to suggest mechanisms for their formation.

# VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abidi FE, Holinski-Feder E, Rittinger O, Kooy F, Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE. A novel 2 bp deletion in the TM4SF2 gene is associated with MRX58. J Med Genet 39:430-433, 2002.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugghe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev 16:2813–2828, 2002.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgenreceptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet 51:1229-1239, 1992.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. Am J Hum Genet 79:493-499, 2006.
- Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. Prostaglandins Other Lipid Mediat 91:104-112, 2010.
- Antonini S. Mapeamento de pontos de quebra em rearranjos cromossômicos. Pós-Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2005.
- Arens YH, Engelen JJ, Govaerts LC, van Ravenswaay CM, Loneus WH, van Lent-Albrechts JC, van der Blij-Philipsen M, Hamers AJ, Schrander-Stumpel CT. Familial insertion (3;5)(q25.3;q22.1q31.3) with deletion or duplication of chromosome region 5q22.1-5q31.3 in ten unbalanced carriers. Am J Med Genet A 130A:128-133, 2004.
- Babbs C, Furniss D, Morriss-Kay GM, Wilkie AO. Polydactyly in the mouse mutant Doublefoot involves altered Gli3 processing and is caused by a large deletion in cis to Indian hedgehog, **Mech Dev 125**:517-526, 2008.
- Bache I, Hjorth M, Bugge M, Holstebroe S, Hilden J, Schmidt L, Brondum-Nielsen K, Bruun-Petersen G, Jensen PK, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen K, Tommerup N. Systematic re-examination of carriers of balanced reciprocal translocations: a strategy to search for candidate regions for common and complex diseases. Eur J Hum Genet 14:410-417, 2006.
- Backx L, Seuntjens E, Devriendt K, Vermeesch J, Van Esch H. A balanced translocation t(6;14)(q25.3;q13.2) leading to reciprocal fusion transcripts in a patient with intellectual disability and agenesis of corpus callosum. Cytogenet Genome Res 132:135-143, 2011.
- Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Gunther T, Schule R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G. Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern. Dev Biol 291:382-397, 2006.
- Bailey JA, Eichler EE. Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. **Nat Rev Genet 7**:552-564, 2006.

- Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. Am J Hum Genet 82:927-936, 2008.
- Barna M, Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. **Dev Cell 12**:931-941, 2007
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. Nat Genet 16:174-178, 1997.
- Belzil VV, Daoud H, Desjarlais A, Bouchard JP, Dupré N, Camu W, Dion PA, Rouleau GA. Analysis of OPTN as a causative gene for amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiol Aging 32**:555.e13-4, 2011.
- Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, Vazquez MP, Vekemans M, Roest Crollius H, Hastie ND, Munnich A, Etchevers HC, Pelet A, Farlie PG, Fitzpatrick DR, Lyonnet S. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. Nat Genet 41:359-64, 2009.
- Bertini ES, Eymard-Pierre E, Boespflug-Tanguy O, Cleveland DW, Yamanaka K. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington, Seattle (versão online), 1993-.2005 (atualizado em 2011).
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. J Med Genet 45: 309-313, 2008.
- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O. Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. **Am J Hum Genet 69**:261-268, 2001.
- Bond C, Si X, Crisp M, Wong P, Paulson GW, Boesel CP, Dlouhy SR, Hodes ME. Family with Pelizaeus-Merzbacher disease/X-linked spastic paraplegia and a nonsense mutation in exon 6 of the proteolipid protein gene. Am J Med Genet 71:357-360, 1997.
- Boulay JL, Ionescu MC, Sivasankaran B, Labuhn M, Dolder-Schlienger B, Taylor E, Morin P Jr, Hemmings BA, Lino MM, Jones G, Maier D, Merlo A. The 10q25.3-26.1 G protein-coupled receptor gene GPR26 is epigenetically silenced in human gliomas. Int J Oncol 35:1123-1131, 2009.
- Boyd Y, Buckle V, Holt S, Munro E, Hunter D, Craig I. Muscular dystrophy in girls with X;autosome translocations. J Med Genet 23:484-490, 1986.
- Brussino A, Vaula G, Cagnoli C, Mauro A, Pradotto L, Daniele D, Di Gregorio E, Barberis M, Arduino C, Squadrone S, Abete MC, Migone N, Calabrese O, Brusco A. A novel family with Lamin B1 duplication associated with adult-onset leucoencephalopathy.J Neurol Neurosurg Psychiatry 80:237-240, 2009.

- Brussino A, Vaula G, Cagnoli C, Panza E, Seri M, Di Gregorio E, Scappaticci S, Camanini S, Daniele D, Bradac GB, Pinessi L, Cavalieri S, Grosso E, Migone N, Brusco A. A family with autosomal dominant leukodystrophy linked to 5q23.2– q23.3 without lamin B1 mutations. Eur J Neurol. 17:541–549, 2010.
- Bundschu K, Knobeloch KP, Ullrich M, Schinke T, Amling M, Engelhardt CM, Renné T, Walter U, Schuh K.Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism. J Biol Chem. 280:28572-28580, 2005.
- Cacciagli P, Haddad MR, Mignon-Ravix C, El-Waly B, Moncla A, Missirian C, Chabrol B, Villard L. Disruption of the ATP8A2 gene in a patient with a t(10;13) de novo balanced translocation and a severe neurological phenotype. **Eur J Hum** Genet 18:1360-1363, 2010.
- Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, López-Otín C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. Gene 283:49-62, 2002.
- Cantagrel V, Lossi AM, Lisgo S, Missirian C, Borges A, Philip N, Fernandez C, Cardoso C, Figarella-Branger D, Moncla A, Lindsay S, Dobyns WB, Villard L. Truncation of NHEJ1 in a patient with polymicrogyria.**Hum Mutat 28**:356-364, 2007.
- Carrozzo R, Arrigo G, Rossi E, Bardoni B, Cammarata M, Gandullia P, Gatti R, Zuffardi O. Multiple congenital anomalies, brain hypomyelination, and ocular albinism in a female with dup(X) (pter-->q24::q21.32-->qter) and random X inactivation. Am J Med Genet 72:329-334, 1997.
- Carter AN, Cole CL, Playle AG, Ramsay EJ, Shervington AA. GPR26: a marker for primary glioblastoma? Mol Cell Probes 22:133-137, 2008.
- Carvalho CM, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Shaw C, Peacock S, Pursley A, Tavyev YJ, Ramocki MB, Nawara M, Obersztyn E, Vianna-Morgante AM, Stankiewicz P, Zoghbi HY, Cheung SW, Lupski JR. Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by Fork Stalling and Template Switching. Hum Mol Genet 18:2188-2203, 2009.
- Carvalho CM, Bartnik M, Pehlivan D, Fang P, Shen J, Lupski JR. Evidence for disease penetrance relating to CNV size: Pelizaeus-Merzbacher disease and manifesting carriers with a familial 11 Mb duplication at Xq22. Clin Genet (versão online), 2011.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp Cell Res 60**:315-319, 1970.
- Chen Y, Low TY, Choong LY, Ray RS, Tan YL, Toy W, Lin Q, Ang BK, Wong CH, Lim S, Li B, Hew CL, Sze NS, Druker BJ, Lim YP. Phosphoproteomics identified Endofin, DCBLD2, and KIAA0582 as novel tyrosine phosphorylation targets of EGF signaling and Iressa in human cancer cells. **Proteomics 7**:2384-2397, 2007.
- Consilvio C, Vincent AM, Feldman EL. Neuroinflammation, COX-2, and ALS--a dual role? **Exp Neurol 187**:1-10, 2004.
- Courtens W, Wuyts W, Rooms L, Pera SB, Wauters J. A subterminal deletion of the long arm of chromosome 10: a clinical report and review. Am J Med Genet A 140:402-409, 2006.

- Cox JJ, Holden ST, Dee S, Burbridge JI, Raymond FL. Identification of a 650 kb duplication at the X chromosome breakpoint in a patient with 46,X,t(X;8)(q28;q12) and non-syndromic mental retardation. **J Med Genet 40**:169-174, 2003.
- Cox JJ, Willatt L, Homfray T, Woods CG. A SOX9 duplication and familial 46,XX developmental testicular disorder. **N Engl J Med 364**:91-93, 2011
- Crolla JA, van Heyningen V. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. **Am J Hum Genet 71**: 1138-1149, 2002.
- De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Guerneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. J Med Genet 44: 750-762, 2007.
- Del Bo R, Tiloca C, Pensato V, Corrado L, Ratti A, Ticozzi N, Corti S, Castellotti B, Mazzini L, Sorarù G, Cereda C, D'Alfonso S, Gellera C, Comi GP, Silani V; The SLAGEN Consortium. Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.J Neurol Neurosurg Psychiatry (versão online), 2011.
- Dermitzakis ET, Reymond A, Antonarakis SE. Conserved non-genic sequences an unexpected feature of mammalian genomes. Nat Rev Genet 6:151-157, 2005
- Dion PA, Daoud H, Rouleau GA. Genetics of motor neuron disorders: new insights into pathogenic mechanisms. Nat Rev Genet 10:769-782, 2009.
- Douyard J, Hawley P, Shaham M, Kimonis V. Duplication of 5q15-q23.2: case report and literature review. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 76**:272-276, 2006.
- Drachman DB, Rothstein JD. Inhibition of cyclooxygenase-2 protects motor neurons in an organotypic model of amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol 48:**792-795, 2000.
- Drets, M. E., & Shaw, M. W. Specific banding patterns of human chromosomes. **Proc** Natl Acad Sci 68:2073-2077, 1971.
- Dupont JM, Cuisset L, Cartigny M, Le Tessier D, Vasseur C, Rabineau D, Jeanpierre M. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. Am J Med Genet 111:405-408, 2002.
- Dutrillaux B, Lejeune J. Sur une novelle technique d'analyse du caryotype human. C R Acad Sci Paris 272:2638-2640, 1971.
- Emberger W, Petek E, Plecko-Starting B, Kroisel PM, Zierler H, Wagner K. A de novo complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 2, 3, and 10 associated with microcephaly and early onset spasticity. J Med Genet 37:892-896, 2000.

- Evans MI, White BJ, Kent SG, Levine MA, Levin SW, Larsen JW Jr. Balanced rearrangement of chromosomes 2, 5, and 13 in a family with duplication 5q and fetal loss. **Am J Med Genet 19**:783-790, 1984.
- Eymard-Pierre E, Lesca G, Dollet S, Santorelli FM, di Capua M, Bertini E, Boespflug-Tanguy O. Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. **Am J Hum Genet 71**:518-527, 2002.
- Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M, Danes S, van Heyningen V, Hanson I. Aniridia associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. Hum Mol Genet 4:415-422, 1995.
- Fantes JA, Boland E, Ramsay J, Donnai D, Splitt M, Goodship JA, Stewart H, Whiteford M, Gautier P, Harewood L, Holloway S, Sharkey F, Maher E, van Heyningen V, Clayton-Smith J, Fitzpatrick DR, Black GC. FISH mapping of de novo apparently balanced chromosome rearrangements identifies characteristics associated with phenotypic abnormality. Am J Hum Genet 82:916-926, 2008.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome.**Nat Rev** Genet 7:85-97, 2006.
- Fiegler H, Gribble SM, Burford DC, Carr P, Prigmore E, Porter KM, Clegg S, Crolla JA, Dennis NR, Jacobs P, Carter NP. Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. J Med Genet 40: 664-670, 2003.
- Foltz G, Ryu GY, Yoon JG, Nelson T, Fahey J, Frakes A, Lee H, Field L, Zander K, Sibenaller Z, Ryken TC, Vibhakar R, Hood L, Madan A. Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma. Cancer Res 66:6665-6674, 2006.
- Fonseca SAS. Alterações cromossômicas estruturais no mapeamento de regiões candidatas para quadros sindrômicos. **Tese de Doutorado** (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP) 2005.
- Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PM, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. **BMJ 332**:759-763, 2006.
- Fryns JP, van den Berghe H. Possible excess of mental handicap and congenital malformations in autosomal reciprocal translocations. **Ann Genet 22:**125-127, 1979.
- Fukuda H, Nakamura N, Hirose S. MARCH-III Is a novel component of endosomes with properties similar to those of MARCH-II. J Biochem 139:137-145, 2006.
- Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, Yang X, Guo S, Feng G, He L. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. Nat Genet 28:386-388, 2001.
- Garbern JY. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. Cell Mol Life Sci 64:50-65, 2007.
- Giardino D, Finelli P, Amico FP, Gottardi G, Civa R, Corona G, Nocera G, Larizza L. Unbalanced segregation of a complex four-break 5q23-31 insertion in the 5p13 band in a malformed child. **Eur J Hum Genet 12:**455-459, 2004.

- Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. **Am J Hum Genet 68:**874-883, 2001.
- Giglio S, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Guerneri S, Selicorni A, Stumm M, Tonnies H, Ventura M, Zollino M, Neri G, Barber J, Wieczorek D, Rocchi M, Zuffardi O. Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. Am J Hum Genet 71:276-285, 2002.
- Gimeno, RE, Ortegon, AM, Patel, S, Punreddy, S, Ge, Sun, Y, Lodish, HF, Stahl, A. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. J Biol Chem 278: 16039-16044, 2003.
- Gordon CT, Tan TY, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S, Farlie PG. Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease. J Med Genet 46:649-656, 2009.
- Graser S, Stierhof YD, Nigg EA. Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. J Cell Sci 120:4321-4331, 2007.
- Grasshoff U, Singer S, Liehr T, Starke H, Fode B, Schöning M, Dufke A. A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q24-1q22 monosomy 4q27-q28. **Cytogenet Genome Res 103:**17-23, 2003.
- Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, 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. J Med Genet 42:8-16, 2005.
- Gruchy N, Barreau M, Kessler K, Gourdier D, Leporrier N. A paternally transmitted complex chromosomal rearrangement (CCR) involving chromosomes 2, 6, and 18 includes eight breakpoints and five insertional translocations ITs) through three generations. **Am J Med Genet 152:**185-190, 2009.
- Grunnet ML, Leicher C, Zimmerman A, Zalneraitis E, Barwick M. Primary lateral sclerosis in a child. Neurology 39:1530-1532, 1989.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. **Pathogenetics 1**:4, 2008.
- Hanson D, Murray PG, Sud A, Temtamy SA, Aglan M, Superti-Furga A, Holder SE, Urquhart J, Hilton E, Manson FD, Scambler P, Black GC, Clayton PE. The primordial growth disorder 3-M syndrome connects ubiquitination to the cytoskeletal adaptor OBSL1. Am J Hum Genet 84:801-806, 2009.
- Hayashi S, Ono M, Makita Y, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Fortuitous detection of a submicroscopic deletion at 1q25 in a girl with Cornelia-de Lange syndrome carrying t(5;13)(p13.1;q12.1) by array-based comparative genomic hybridization. Am J Med Genet A 143A:1191-1197, 2007.

- Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, Donovan DJ, Eisenman R, Fan Y, Farra CG, Ferguson HL, Gusella JF, Harris DJ, Herrick SR, Kelly C, Kim HG, Kishikawa S, Korf BR, Kulkarni S, Lally E, Leach NT, Lemyre E, Lewis J, Ligon AH, Lu W, Maas RL, MacDonald ME, Moore SD, Peters RE, Quade BJ, Quintero-Rivera F, Saadi I, Shen Y, Shendure J, Williamson RE, Morton CC. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. Am J Hum Genet 82:712-722, 2008.
- Hill-Harfe KL, Kaplan L, Stalker HJ, Zori RT, Pop R, Scherer G, Wallace MR. Fine mapping of chromosome 17 translocation breakpoints > or = 900 kb upstream of SOX9 in acampomelic campomelic dysplasia and a mild, familial skeletal dysplasia. Am J Hum Genet 76: 663–671, 2005.
- Hodes ME, Woodward K, Spinner NB, Emanuel BS, Enrico-Simon A, Kamholz J, Stambolian D, Zackai EH, Pratt VM, Thomas IT, Crandall K, Dlouhy SR, Malcolm S. Additional copies of the proteolipid protein gene causing Pelizaeus-Merzbacher disease arise by separate integration into the X chromosome. Am J Hum Genet 67:14-22, 2000.
- Horowitz DS e Krainer AR. A human protein required for the second step of pre-mRNA splicing is functionally related to a yeast splicing factor. **Genes Dev 11**:139-151, 1997.
- Howarth KD, Pole JC, Beavis JC, Batty EM, Newman S, Bignell GR, Edwards PA. Large duplications at reciprocal translocation breakpoints that might be the counterpart of large deletions and could arise from stalled replication bubbles. **Genome Res 21**:525-534, 2011.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. Am J Med Genet 87:349-353, 1999.
- Ida T, Miharu N, Hayashitani M, Shimokawa O, Harada N, Samura O, Kubota T, Niikawa N, Matsumoto N. Functional disomy for Xq22-q23 in a girl with complex rearrangements of chromosomes 3 and X. **Am J Med Genet A 120A:**557, 2003
- Iida A, Hosono N, Sano M, Kamei T, Oshima S, Tokuda T, Kubo M, Nakamura Y, Ikegawa S.Optineurin mutations in Japanese amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry (versão online), 2011.
- Inoue K, Tanaka H, Scaglia F, Araki A, Shaffer LG, Lupski JR. Compensating for central nervous system dysmyelination: females with a proteolipid protein gene duplication and sustained clinical improvement. **Ann Neurol 50**:747-754, 2001.
- Inoue K, Osaka H, Thurston VC, Clarke JT, Yoneyama A, Rosenbarker L, Bird TD, Hodes ME, Shaffer LG, Lupski JR. Genomic rearrangements resulting in PLP1 deletion occur by nonhomologous end joining and cause different dysmyelinating phenotypes in males and females. Am J Hum Genet 71:838-53, 2002.
- Inoue K. PLP1-related inherited dysmyelinating disorders: Pelizaeus-Merzbacher disease and spastic paraplegia type 2. **Neurogenetics 6**:1-16, 2005.
- ISCN (2009): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds.). S Karger, Basel 2009.
- Jacobs PA, Hassold TJ. Chromossome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. **Human Genetics: Proceedings of the 7th International Congress**: 234-244, 1986.

- Jakubiczka S, Schröder C, Ullmann R, Volleth M, Ledig S, Gilberg E, Kroisel P, Wieacker P. Translocation and deletion around SOX9 in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. **Sex Dev 4**:143-149, 2010.
- Jensen LR, Amende M, Gurok U, Moser B, Gimmel V, Tzschach A, Janecke AR, Tariverdian G, Chelly J, Fryns JP, Van Esch H, Kleefstra T, Hamel B, Moraine C, Gecz J, Turner G, Reinhardt R, Kalscheuer VM, Ropers HH, Lenzner S. Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. Am J Hum Genet 76: 227-236, 2005.
- Jiang YM, Yamamoto M, Kobayashi Y, Yoshihara T, Liang Y, Terao S, Takeuchi H, Ishigaki S, Katsuno M, Adachi H, Niwa J, Tanaka F, Doyu M, Yoshida M, Hashizume Y, Sobue G. Gene expression profile of spinal motor neurons in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 57:236-251, 2005.
- Johnston JJ, Olivos-Glander I, Killoran C, Elson E, Turner JT, Peters KF, Abbott MH, Aughton DJ, Aylsworth AS, Bamshad MJ, Booth C, Curry CJ, David A, Dinulos MB, Flannery DB, Fox MA, Graham JM, Grange DK, Guttmacher AE, Hannibal MC, Henn W, Hennekam RC, Holmes LB, Hoyme HE, Leppig KA, Lin AE, Macleod P, Manchester DK, Marcelis C, Mazzanti L, McCann E, McDonald MT, Mendelsohn NJ, Moeschler JB, Moghaddam B, Neri G, Newbury-Ecob R, Pagon RA, Phillips JA, Sadler LS, Stoler JM, Tilstra D, Walsh Vockley CM, Zackai EH, Zadeh TM, Brueton L, Black GC, Biesecker LG. Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. Am J Hum Genet 76:609-622, 2005.
- Jurevics H, Hostettler J, Sammond DW, Nave KA, Toews AD, Morell P. Normal metabolism but different physical properties of myelin from mice deficient in proteolipid protein. J Neurosci Res 71:826–834, 2003.
- Kent J, Wheatly SC, Andrews JE, Sinclair AE, Koopman P. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. **Development 122**:2813-2822, 1996.
- Kleinjan DJ, Coutinho P. Cis-ruption mechanisms: disruption of cis-regulatory control as a cause of human genetic disease. **Brief Funct Genomic Proteomic 8:**317-332, 2009.
- Kleinjan DA, Lettice LA. Long-range gene control and genetic disease. Adv Genet 61:339-388, 2008.
- Kleinjan DJ, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. **Hum Mol Genet 7**:1611-1618, 1998.
- Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, Letteboer T, van Nesselrooij B, Hochstenbach R, Poot M, Cuppen E. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. **Hum Mol Genet 20:**1916-1924, 2011.
- Klopocki E, Lohan S, Brancati F, Koll R, Brehm A, Seemann P, Dathe K, Stricker S, Hecht J, Bosse K, Betz RC, Garaci FG, Dallapiccola B, Jain M, Muenke M, Ng VC, Chan W, Chan D, Mundlos S. Copy-number variations involving the IHH locus are associated with syndactyly and craniosynostosis. Am J Hum Genet 88:70-75, 2011.

- Knower KC, Kelly S, Ludbrook LM, Bagheri-Fam S, Sim H, Bernard P, Sekido R, Lovell-Badge R, Harley VR.Failure of SOX9 regulation in 46XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. **PLoS One 6**:e17751, 2011.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell 50**:509-517, 1987.
- Krepischi-Santos AC, Rajan D, Temple IK, Shrubb V, Crolla JA, Huang S, Beal S, Otto PA, Carter NP, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C. Constitutional haploinsufficiency of tumor suppressor genes in mentally retarded patients with microdeletions in 17p13.1. Cytogenet Genome Res 125:1-7, 2009.
- Kurahashi H, Emanuel BS. Long AT-rich palindromes and theconstitutional t(11;22) breakpoint. **Hum Mol Genet 10**:2605-2617, 2001a.
- Kurahashi H, Emanuel BS. Unexpectedly high rate of de novo constitutional t(11;22) translocations in sperm from normal males. **Nat Genet 29**: 139-140, 2001b.
- Kurahashi H, Shaikh TH, Hu P, Roe BA, Emanuel BS, Budarf ML. Regions of genomic instability on 22q11 and 11q23 as the etiology for the recurrent constitutional t(11;22). Hum Mol Genet 9: 1665-1670, 2000.
- Kurahashi H, Inagaki H, Yamada K, Ohye T, Taniguchi M, Emanuel BS, Toda T. Cruciform DNA structure underlies the etiology for palindrome-mediated human chromosomal translocations. **J Biol Chem 279**: 35377-35383, 2004.
- Kurahashi H, Inagaki H, Hosoba E, Kato T, Ohye T, Kogo H, Emanuel BS.Molecular cloning of a translocation breakpoint hotspot in 22q11. Genome Res 17: 461-469, 2007.
- Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS. The constitutional t(11;22): implications for a novel mechanism responsible for gross chromosomal rearrangements.**Clin Genet 78**:299-309, 2010.
- Kurth I, Pamminger T, Hennings JC, Soehendra D, Huebner AK, Rotthier A, Baets J, Senderek J, Topaloglu H, Farrell SA, Nürnberg G, Nürnberg P, De Jonghe P, Gal A, Kaether C, Timmerman V, Hübner CA. Mutations in FAM134B, encoding a newly identified Golgi protein, cause severe sensory and autonomic neuropathy. Nature Genet 41: 1179-1181, 2009.
- Lauderdale JD, Wilensky JS, Oliver ER, Walton DS, Glaser T. 30 deletions cause aniridia by preventing PAX6 gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 97:13755-13759, 2000.
- Lecointre C, Pichon O, Hamel A, Heloury Y, Michel-Calemard L, Morel Y, David A, Le Caignec C.Familial acampomelic form of campomelic dysplasia caused by a 960 kb deletion upstream of SOX9. **Am J Med Genet A 149A**:1183-1189, 2009.
- Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M, CareyJC. Precise localization ofNF1 to 17ql 1.2 by balanced translocation. **Am J Hum Genet 44**:20-24, 1989
- Lee JA, Madrid RE, Sperle K, Ritterson CM, Hobson GM, Garbern J, Lupski JR, Inoue K. Spastic paraplegia type 2 associated with axonal neuropathy and apparent PLP1position effect. **Ann Neurol 59**: 398-403, 2006.

- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR.A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. Cell 131:1235-1247, 2007.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrugghe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. **Mol Cell Biol 17:**2336-2346, 1997.
- Leipoldt M, Erdel M, Bien-Willner GA, Smyk M, Theurl M, Yatsenko SA, Lupski JR, Lane AH, Shanske AL, Stankiewicz P, Scherer G. Two novel translocation breakpoints upstream of SOX9 define borders of the proximal and distal breakpoint cluster region in campomelic dysplasia. Clin Genet 71:67-75, 2007.
- LeMaire-Adkins R, Radke K, Hunt PA.Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. J Cell Biol 139:1611-1619, 1997.
- Leroy O, Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Belarbi K, Delacourte A, Andreadis A, Sablonnière B, Buée L, Sergeant N, Caillet-Boudin ML. ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. J Neurosci Res 84:852-859, 2006.
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. **Proc Natl Acad Sci USA 99:**7548-7553, 2002.
- Li SY, Gibson LH, Gomez K, Pober BR, Yang-Feng TL. Familial dup(5)(q15q21) associated with normal and abnormal phenotypes. **Am J Med Genet 75:**75–77, 1998.
- Liang X, Wu L, Wang Q, Hand T, Bilak M, McCullough L, Andreasson K. J Mol Function of COX-2 and prostaglandins in neurological disease. J Mol Neurosci 33:94-99, 2007.
- Liehr T. Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD). Mol Cytogenet. 3:8,2010.
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. Nature 448:73-77, 2007.
- Lizarraga SB, Margossian SP, Harris MH, Campagna DR, Han AP, Blevins S, Mudbhary R, Barker JE, Walsh CA, Fleming MD. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. **Development** 137:1907-1917, 2010.
- Lodder EM, Hoogeboom AJ, Coert JH, de Graaff E. Deletion of 1 amino acid in Indian hedgehog leads to brachydactylyA1. **Am J Med Genet A 146A:**2152-2154, 2008.
- Lybaek H, Øyen N, Fauske L, Houge G. A 2.1 Mb deletion adjacent but distal to a 14q21q23 paracentric inversion in a family with spherocytosis and severe learning difficulties. **Clin Genet 74:**553-559, 2008.

- Ma G, Yu J, Xiao Y, Chan D, Gao B, Hu J, He Y, Guo S, Zhou J, Zhang L, Gao L, Zhang W, Kang Y, Cheah KS, Feng G, Guo X, Wang Y, Zhou CZ, He L. Indian hedgehog mutations causing brachydactyly type A1 impair Hedgehog signal transduction at multiple levels. **Cell Res (versão online)**, 2011.
- Mademont-Soler I, Morales C, Armengol L, Soler A, Sánchez A.Description of the smallest critical region for Dandy-Walker malformation in chromosome 13 in a girl with a cryptic deletion related to t(6;13)(q23;q32). **Am J Med Genet A 152:**2308-2312, 2010.
- Mansour S, Hall CM, Pembrey ME, Young ID. A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. J Med Genet 32:415-420, 1995.
- Maranduba CM, Sá Moreira E, Müller Orabona G, Pavanello RC, Vianna-Morgante AM, Passos-Bueno MR.Does the P172H mutation at the TM4SF2 gene cause X-linked mental retardation? **Am J Med Genet A 124:**413-415, 2004.
- Martin NJ, Cartwright DW, Harvey PJ. Duplication 5q(5q22-5q33): From an intrachromosomal insertion. Am J Med Genet 20:57-62, 1985.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. Nature 465:223-226, 2010.
- Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. Cell Death Differ 13:852-60, 2006.
- Meer B, Wolff G, Back E. Segregation of a complex rearrangement of chromosomes 6, 7, 8 and 12 through three generations. **Hum Genet 58:**221-225, 1981.
- Meijer IA, Simoes-Lopes AA, Laurent S, Katz T, St-Onge J, Verlaan DJ, Dupré N, Thibault M, Mathurin J, Bouchard JP, Rouleau GA. A novel duplication confirms the involvement of 5q23.2 in autosomal dominant leukodystrophy. Arch Neurol 65:1496-1501, 2008.
- Millecamps S, Boillée S, Chabrol E, Camu W, Cazeneuve C, Salachas F, Pradat PF, Danel-Brunaud V, Vandenberghe N, Corcia P, Le Forestier N, Lacomblez L, Bruneteau G, Seilhean D, Brice A, Feingold J, Meininger V, LeGuern E. Screening of OPTN in French familial amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging 32:e11-3, 2011
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet 86:749-764, 2010.
- Miller G, Neilan M, Chia R, Gheryani N, Holt N, Charbit A, Wells S, Tucci V, Lalanne Z, Denny P, Fisher EM, Cheeseman M, Askew GN, Dear TN. ENU mutagenesis reveals a novel phenotype of reduced limb strength in mice lacking fibrillin 2. PLoS One 5:e9137, 2010.

- Mimault C, Giraud G, Courtois V, Cailloux F, Boire JY, Dastugue B, Boespflug-Tanguy. Proteolipoprotein gene analysis in 82 patients with sporadic Pelizaeus-Merzbacher Disease: duplications, the major cause of the disease, originate more frequently in male germ cells, but point mutations do not. The Clinical European Network on Brain Dysmyelinating Disease. Am J Hum Genet 65:360-369, 1999.
- Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. J Biol Chem 279:11327-11335, 2004.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. **Nat Genet 14:**62-68, 1996.
- Morales C, Mademont-Soler I, Armengol L, Milà M, Badenas C, Andrés S, Soler A, Sánchez A. Characterization of a 5.8-Mb interstitial deletion of chromosome 3p in a girl with 46,XX,inv(7)dn karyotype and phenotypic abnormalities. Cytogenet Genome Res 125:334-340, 2009.
- Morokuma Y, Nakamura N, Kato A, Notoya M, Yamamoto Y, Sakai Y, Fukuda H, Yamashina S, Hirata Y, Hirose S. MARCH-XI, a novel transmembrane ubiquitin ligase implicated in ubiquitin-dependent protein sorting in developing spermatids. J Biol Chem 282: 24806-24815, 2007.
- Mourão A, Varrot A, Mackereth CD, Cusack S, Sattler M. Structure and RNA recognition by the snRNA and snoRNA transport factor PHAX. **RNA 16:**1205-1216, 2010.
- Mrowka R, Blüthgen N, Fähling M. Seed-based systematic discovery of specific transcription factor target genes. **FEBS J 275:**3178-192, 2008.
- Muncke N, Wogatzky BS, Breuning M, Sistermans EA, Endris V, Ross M, Vetrie D, Catsman-Berrevoets CE, Rappold G. Position effect on PLP1 may cause a subset of Pelizaeus-Merzbacher disease symptoms. J Med Genet 41:e121, 2004.
- Naderi A, Teschendorff AE, Beigel J, Cariati M, Ellis IO, Brenton JD, Caldas C.BEX2 is overexpressed in a subset of primary breast cancers and mediates nerve growth factor/nuclear factor-kappaB inhibition of apoptosis in breast cancer cell lines. **Cancer Res. 67**:6725-6736, 2007.
- Ninomiya S, Isomura M, Narahara K, Seino Y, Nakamura Y. Isolation of a testisspecific cDNA on chromosome 17q from a region adjacent to the breakpoint of t(12;17) observed in a patient with acampomelic campomelic dysplasia and sex reversal. **Hum Mol Genet 5:**69-72, 1996.
- Nobuhisa I, Kato R, Inoue H, Takizawa M, Okita K, Yoshimura A, Taga T. Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation. **J Exp Med 199:**737-742, 2004.
- Nonami A, Kato R, Taniguchi K, Yoshiga D, Taketomi T, Fukuyama S, Harada M, Sasaki A, Yoshimura A. Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells. J Biol Chem 279:52543-52551, 2004.

- Nothwang HG, Kim HG, Aoki J, Geisterfer M, Kübart S, Wegner RD, van Moers A, Ashworth LK, Haaf T, Bell J, Arai H, Tommerup N, Ropers HH, Wirth J. Functional hemizygosity of PAFAH1B3 due to a PAFAH1B3-CLK2 fusion gene in a female with mental retardation, ataxia and atrophy of the brain. **Hum Mol Genet 10**:797-806, 2001.
- Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MV, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS, Kurahashi H. Paternal origin of the de novo constitutional t(11;22)(q23;q11). **Eur J Hum Genet 18:**783-787, 2010.
- Osztovics M, Kiss P. Trisomy 5q15-q31 due to maternal insertion, ins(6;5) (q21;q15q31). Acta Paediatr Acad Sci Hung 23:231-237, 1982.
- Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. Nucleic Acids Res 32 (versão online): W280-W286, 2004.
- Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptácek LJ, Fu YH. Lamin B1duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. Nat Genet 38:1114-1123, 2006.
- Page SL, Shaffer LG. Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. Nat Genet 15:231-232, 1997.
- Panzeri C, De Palma C, Martinuzzi A, Daga A, De Polo G, Bresolin N, Miller CC, Tudor EL, Clementi E, Bassi MT. The first ALS2 missense mutation associated with JPLS reveals new aspects of alsin biological function. Brain 129:1710-9, 2006.
- Papadopoulou E, Sismani C, Christodoulou C, Ioannides M, Kalmanti M, Patsalis P.Phenotype-genotype correlation of a patient with a "balanced" translocation 9;15 and cryptic 9q34 duplication and 15q21q25 deletion. Am J Med Genet A 152A:1515-1522, 2010.
- Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D, Forbush B III. Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. J Biol Chem. 270: 17977-17985, 1995.
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, Sarda P. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. **Hum Reprod 17:**476-494, 2011.
- Peretz A, Gil-Henn H, Sobko A, Shinder V, Attali B, Elson A. Hypomyelination and increased activity of voltage-gated K(+) channels in mice lacking protein tyrosine phosphatase epsilon. **EMBO J 19:**4036-4045, 2000.
- Pfeifer D, Kist R, Dewar K, Devon K, Lander ES, Birren B, Korniszewski L, Back E, Scherer G. Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to SOX9: evidence for an extended control region. Am J Hum Genet 65:111-124, 1999.
- Pop R, Conz C, Lindenberg KS, Blesson S, Schmalenberger B, Briault S, Pfeifer D, Scherer G. Screening of the 1 Mb SOX9 5' control region by array CGH identifies a large deletion in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. J Med Genet 41:e47, 2004.

- Ramocki MB, Dowling J, Grinberg I, Kimonis VE, Cardoso C, Gross A, Chung J, Martin CL, Ledbetter DH, Dobyns WB, Millen KJ. Reciprocal fusion transcripts of two novel Zn-finger genes in a female with absence of the corpus callosum, ocular colobomas and a balanced translocation between chromosomes 2p24 and 9q32. Eur J Hum Genet 11:527-534, 2003.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. Nature 444:444-454, 2006.
- Rees MI, Worwood M, Thompson PW, Gilbertson C, May A. Red cell dimorphism in a young man with a constitutional chromosomal translocation t(11;22)(p15.5;q11.21). Br J Haematol 87:386-395, 1994.
- Refai O, Friedman A, Terry L, Jewett T, Pearlman A, Perle MA, Ostrer H. De novo 12;17 translocation upstream of SOX9 resulting in 46,XX testicular disorder of sex development. Am J Med Genet A 152:422-426, 2010.
- Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Héon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. **Science 295:**1077-1079, 2002.
- Robinson WP. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. **Bioessays 22:**452-459, 2000.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ: Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. J Med Genet 43:180-186, 2006.
- Röthlisberger B, Kotzot D, Brecevic L, Koehler M, Balmer D, Binkert F, Schinzel A. Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. **Eur J Hum Genet 7:**873-883, 1999.
- Sagai T, Hosoya M, Mizushina Y, Tamura M, Shiroishi T. Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. **Development 132:**797-803, 2005.
- Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. **J Cell Biol 169:**285-295, 2005.
- Sakai D, Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. **Development 133:**1323-1333, 2006.

- Salomons GS, Bok LA, Struys EA, Pope LL, Darmin PS, Mills PB, Clayton PT, Willemsen MA, Jakobs C. An intriguing "silent" mutation and a founder effect in antiquitin (ALDH7A1). Ann Neurol 62: 414-418, 2007.
- Saugier-Veber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. Nat Genet 6:257-262, 1994.
- Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S, Dubourg C, Henry C, Lucas J, Odent S, Pasquier L, Copin H, Latour P, Cordier MP, Nadeau G, Till M, Edery P, Andrieux J. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. Eur J Med Genet 52:291-296, 2009.
- Schmidt MA, Michels VV, Dewald GW. Cases of neurofibromatosis with rearrangements of Chromosome 17 involving band 17q11.2. Am J Med Genet 28:771-777, 1987.
- Schmidt M, Du Sart D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. **Am J Med Genet 42:**161-169, 1992.
- Schuster J, Sundblom J, Thuresson AC, Hassin-Baer S, Klopstock T, Dichgans M, Cohen OS, Raininko R, Melberg A, Dahl N. Genomic duplications mediate overexpression of lamin B1 in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) with autonomic symptoms. Neurogenetics 12:65-72, 2011.
- Schwanitz G, Schmid P, Berthold HJ, Grosse KP. Partial trisomy 13 with clinical signs of Patau syndrome resulting from a complex paternal rearrangement of chromosome 6, 10 and 13. **Ann Genet Paris 21:**100-103, 1978.
- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2:971-97 1971.
- Seki N, Azuma T, Yoshikawa T, Masuho Y, Muramatsu M, Saito T. cDNA cloning of a new member of the Ras superfamily, RAB9-like, on the human chromosome Xq22.1-q22.3 region. **J Hum Genet 45:**318-22, 2000.
- Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. **Nature 453:**930-934, 2008
- Seong HA, Gil M, Kim KT, Kim SJ, Ha H. Phosphorylation of a novel zinc-finger-like protein, ZPR9, by murine protein serine/threonine kinase 38 (MPK38). Biochem J 361:597-604, 2002.
- Shaffer LG, Lupski JR.Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. Annu Rev Genet 34:297-329, 2000.
- Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangementbased disorders: the genomic basis of disease. **Hum Mol Genet 13:**R57-R64, 2004.
- Shirakawa K, Suzuki H, Ito M, Kono S, Uchiyama T, Ohashi T, Miyajima H. Novel compound heterozygous ALS2 mutations cause juvenile amyotrophic lateral sclerosis in Japan. **Neurology 73:**2124-2126, 2009.
- Singh TD, Park SY, Bae JS, Yun Y, Bae YC, Park RW, Kim IS. MEGF10 functions as a receptor for the uptake of amyloid-β. **FEBS Lett 584:**3936-3942, 2010.

- Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E, Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis PC. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. **Mol Cytogenet 1:**15, 2008.
- Sivakumar K, Sambuughin N, Selenge B, Nagle JW, Baasanjav D, Hudson LD, Goldfarb LG. Novel exon 3B proteolipid protein gene mutation causing late-onset spastic paraplegia type 2 with variable penetrance in female family members. Ann Neurol 45:680-683, 1999.
- Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. **Nat Rev Genet 6:**782-792, 2005.
- Spokony RF, Aoki Y, Saint-Germain N, Magner-Fink E, Saint-Jeannet JP. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus. **Development 129:**421-432, 2002.
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. Cell 144:27-40, 2011.
- Sudbeck P, Lienhard Schmitz M, Baeuerle PA, Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. **Nat Genet 13:**230-232, 1996.
- Sugihara K, Maruyama H, Kamada M, Morino H, Kawakami H. Screening for OPTN mutations in amyotrophic lateral sclerosis in a mainly Caucasian population. **Neurobiol Aging (versão online)**, 2011.
- Sureban SM, Murmu N, Rodriguez P, May R, Maheshwari R, Dieckgraefe BK, Houchen CW, Anant S. Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation. Gastroenterology 132:1055-1065, 2007.
- Swarup G, Nagabhushana A. Optineurin, a multifunctional protein involved in glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and antiviral signalling. **J Biosci 35:**501-505, 2010.
- Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, Kirby A, Liu S, Muddukrishna B, Ohsumi TK, Shen Y, Borowsky M, Daly MJ, Morton CC, Gusella JF. Next-generation sequencing strategies enable routine detection of balanced chromosome rearrangements for clinical diagnostics and genetic research. Am J Hum Genet 88:469-481, 2011.
- Tharapel AT, Summitt RL. A cytogenetic survey of 200 unclassifiable mentally retarded children with congenital anomalies and 200 normal controls. **Hum Genet 37:**329-338, 1977.
- Timchenko NA, Iakova P, Cai ZJ, Smith JR, Timchenko LT. Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. Mol Cell Biol 21:6927-6938, 2001.
- Tjio JH, Levan A. The chromosome numbers of man. Hereditas 42:1-6, 1956.

- Tominaga K, Leung JK, Rookard P, Echigo J, Smith JR, Pereira-Smith OM. MRGX is a novel transcriptional regulator that exhibits activation or repression of the B-myb promoter in a cell type-dependent manner. **J Biol Chem 278:**49618-49624, 2003.
- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. **Nat Genet 36:**636-641, 2004.
- Tzenova J, Kaplan BJ, Petryshen TL, Field LL. Confirmation of a dyslexia susceptibility locus on chromosome 1p34-p36 in a set of 100 Canadian families. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 127B:**117-124, 2004.
- Usarek E, Kuźma-Kozakiewicz M, Schwalenstöcker B, Kaźmierczak B, Münch C, Ludolph AC, Barańczyk-Kuźma A. Tau isoforms expression in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurochem Res 31:**597-602, 2006
- van Bakel, I; Holt, S; Craig, I.; Boyd, Y. Sequence analysis of the breakpoint regions of an X;5 translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. Am J Hum Genet 57:329-336, 1995.
- van Blitterswijk M, van Vught PW, van Es MA, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, de Visser M, Veldink JH, van den Berg LH. Novel optineurin mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. **Neurobiol Aging (versão online)**, 2011.
- Vandeweyer G, Kooy RF. Balanced translocations in mental retardation. **Hum Genet 126**:133-147, 2009.
- 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 individuals with campomelic dysplasia. Am J Hum Genet 76: 652-662, 2005
- Vianna-Morgante AM, Kerkis IE, Krepischi-Santos ACV. Sequencing of the breakpoint junction fragments of an X;autosome translocation in a female with Duchenne muscular dystrophy. The American Society of Human Genetics. 54th Annual Meeting. Toronto, Canada. 947/W, 2004.
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. Science 273:613-622, 1996.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Diff 10:45-65, 2003.
- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. Science 249:181-186, 1990.
- Walter MC, Reilich P, Huebner A, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, Kress W, Born C, Schoser BG, Krause KH, Klutzny U, Bulst S, Frey JR, Lochmüller H. Scapuloperoneal syndrome type Kaeser and a wide phenotypic spectrum of adult-onset, dominant myopathies are associated with the desmin mutation R350P. Brain 130:1485-1496, 2007.

- Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, Liu S, Jiang Y, Yang F, Wu Y, Cao X. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. Blood 103:1747-1754, 2004.
- Wang HT, Chang JW, Guo Z, Li BG.In silico-initiated cloning and molecular characterization of cortexin 3, a novel human gene specifically expressed in the kidney and brain, and well conserved in vertebrates. Int J Mol Med 20:501-510, 2007.
- Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. **Am J Hum Genet 49:** 995-1013, 1991.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. **Proc Natl Acad Sci USA 72:**1858-1862, 1975.
- Wilkins JF, Haig D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. Nat Rev Genet 4:359-368, 2003.
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. J Med Genet 40:575-584, 2003.
- Winston JT, Koepp DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW. A family of mammalian F-box proteins. **Curr Biol 9:**1180-1182, 1999.
- Wirth J, Wagner T, Meyer J, Pfeiffer RA, Tietze HU, Schempp W, Scherer G. Translocation breakpoints in three patients with campomelic dysplasia and autosomal sex reversal map more than 130 kb from SOX9. Hum Genet 97:186-93, 1996.
- Wohlleber E, Kirchhoff M, Zink AM, Kreiss-Nachtsheim M, Küchler A, Jepsen B, Kjaergaard S, Engels H. Clinical and molecular characterization of two patients with overlapping de novo microdeletions in 2p14-p15 and mild mental retardation. Eur J Med Genet 54:67-72, 2011.
- Wolf NI, Sistermans EA, Cundall M, Hobson GM, Davis-Williams AP, Palmer R, Stubbs P, Davies S, Endziniene M, Wu Y, Chong WK, Malcolm S, Surtees R, Garbern JY, Woodward KJ. Three or more copies of the proteolipid protein gene PLP1 cause severe Pelizaeus-Merzbacher disease. Brain 128:743-751, 2005.
- Woodward K, Kirtland K, Dlouhy S, Raskind W, Bird T, Malcolm S, Abeliovich D. X inactivation phenotype in carriers of Pelizaeus-Merzbacher disease: skewed in carriers of a duplication and random in carriers of point mutations. **Eur J Hum Genet 8:**449-454, 2000.
- Woodward K, Cundall M, Palmer R, Surtees R, Winter RM, Malcolm S. Complex chromosomal rearrangement and associated counseling issues in a family with Pelizaeus-Merzbacher disease. **Am J Med Genet A 118:**15-24, 2003.
- Woodward KJ, Cundall M, Sperle K, Sistermans EA, Ross M, Howell G, Gribble SM, Burford DC, Carter NP, Hobson DL, Garbern JY, Kamholz J, Heng H, Hodes ME, Malcolm S, Hobson GM. Heterogeneous duplications in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease suggest a mechanism of coupled homologous and nonhomologous recombination. Am J Hum Genet 77:966-9887, 2005.

- Woodward KJ. The molecular and cellular defects underlying Pelizaeus-Merzbacher disease. **Expert Rev Mol Med 10:**e14, 2008.
- Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, Smith SF, North P, Callaway H, Kelly K, Walter K, Abnizova I, Gilks W, Edwards YJ, Cooke JE, Elgar G. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. PLoS Biol 3:e7, 2005.
- Wunderle VM, Critcher R, Hastie N, Goodfellow PN, Schedl A. Deletion of longrange regulatory elements upstream of SOX9 causes campomelic dysplasia. Proc Natl Acad Sci USA 95:10649-10654, 1998.
- Yada T, Sato T, Kaseyama H, Gotoh M, Iwasaki H, Kikuchi N, Kwon YD, Togayachi A, Kudo T, Watanabe H, Narimatsu H, Kimata K. Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. J Biol Chem 278:39711-39725, 2003.
- Yiu EM, Farrell SA, Soman T. Classic Pelizaeus-Merzbacher disease in a girl with an unbalanced chromosomal translocation and functional duplication of PLP1. **Mov Disord 24:**2171-2172, 2009.
- Zatz M, Vianna-Morgante AM, Campos P, Diament AJ. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. J Med Genet 18:442-447, 1981.
- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P, McDonell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, Friocourt G, des Portes V, Cardona A, Frints S, Meindl A, Brandau O, Ronce N, Moraine C, van Bokhoven H, Ropers HH, Sudbrak R, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Chelly J. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation.Nat Genet 24:167-170, 2000.
- Zhu G, Wu CJ, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNF alphainduced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. **Curr Biol 17:**1438-1443, 2007.

### **Recursos da Internet**

Children's Hospital Oakland Research Institute, CHORI- http://www.chori.org

Database of Genomic Variants, DGV - http://projects.tcag.ca/variation

Database of Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans using Ensembl

Resources, DECIPHER - http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher

Ensembl - http://www.ensembl.org

ECR browser - http://ecrbrowser.dcode.org

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

University of California, Santa Cruz, UCSC Genome Browser - http://genome.ucsc.edu