LUIZ CARLOS ZANGRANDE VIEIRA

**Os mecanismos de formação e os efeitos
clínicos de duas deleções cromossômicas:
del(X)(p11.23) e del(8)(p23.1)**

São Paulo

2007

LUIZ CARLOS ZANGRANDE VIEIRA

**Os mecanismos de formação e os efeitos
clínicos de duas deleções cromossômicas:
del(X)(p11.23) e del(8)(p23.1)**

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.

Orientadora:
Dra. Angela M. Vianna Morgante

São Paulo

2007

Vieira, Luiz Carlos Zangrande

Os mecanismos de formação e os efeitos clínicos de duas
deleções cromossômicas: del(X)(p11.23) e del(8)(p23.1).
74pp.

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

1. Rearranjos Cromossômicos Estruturais. 2. Pontos de
Quebra Cromossômicos. 3. Deficiência Mental
Sindrômica.

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

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Angela M. Vianna Morgante
Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílios financeiros do CNPq e da FAPESP
concedidos à orientadora e ao aluno.

À minha família.

Todo homem, por natureza, quer saber.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

A Angela Morgante, pela orientação, pela oportunidade e pelo estímulo.

Ao Prof. Paulo Otto, Chefe do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, por proporcionar um ambiente de trabalho descontraído e pela avaliação clínica dos pacientes.

A Sylvie Antonini, pelos primeiros ensinamentos, paciência e co-orientação.

Aos pacientes e seus familiares, pela colaboração com o projeto.

A Ligia, Mara, Fátima, Maraisa e Paulo Rogério, pelas brincadeiras, bom humor de cada dia e pelo apoio técnico.

A Carla Rosenberg, Ana Cristina Victorino Krepschi dos Santos, Luciana Amaral Haddad e Regina Celia Mingroni Netto pelas colaborações e sugestões.

A Rafaella, Jihane, Carola e Karina, pelo importante auxílio na execução da parte molecular.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Humana e do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, que ajudaram a superar as dificuldades, tornando agradável o passar dos dias: Adriano, Ana Lúcia, Ana Carla, Ana Cristina, Andrea, Betânia, Carola, Cláudia(s), Cris, Daniel, Deborah, Eliete, Fátima, Flavia, Fernando, Mara, Maraisa, Mariana, Nathália, Jacaré, Joana, Juliana, Karen, Karina, Larissa, Ligia, Lilian, Luciana, Rafaella, Raquel, Ronaldo, Sarita, Sílvia, Sylvie, Teresa e Virgínia.

À turma que, quase sempre, me acompanhava nas peregrinações ao “bandejão”: Fortaleza, Leandro, Marcella, Nathália, Polonês, Sandra e Vanessa.

A todos os outros amigos, que, apesar de não terem sido citados, também tiveram importância ao longo desse trabalho.

A Natália G. Barros, pela compreensão, atenção e incentivo dados a todo momento.

À minha família, por toda confiança depositada e por todas as formas de apoio possíveis.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	9
I.1. A FORMAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS	9
I.2. AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS INDICANDO GENES CANDIDATOS A QUADROS CLÍNICOS	13
I.3. AS VARIANTES ESTRUTURAIS, SEUS EFEITOS CLÍNICOS E A PREDISPOSIÇÃO A REARRANJOS	15
II. OBJETIVOS	18
III. PACIENTES E MÉTODOS	20
III.1. PACIENTES	20
III.1.1. PACIENTE 1	20
III.1.2. PACIENTE 2	22
III.2. MÉTODOS	23
III.2.1. ANÁLISE CROMOSSÔMICA	23
III.2.1.1. Preparações cromossômicas	23
III.2.1.2. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	23
III.2.2. ANÁLISES DO DNA	25
III.2.2.1 Extração do DNA	25
III.2.2.2. Análise <i>de loci</i> de microssatélites	25
III.2.2.3. Seqüenciamento do DNA	26
III.2.2.4. <i>Southern blotting</i>	27
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
IV.1. DELEÇÃO DO CROMOSSOMO X	29
IV.1.1. MAPEAMENTO DOS PONTOS DE QUEBRA	29
IV.1.2. A DELEÇÃO E O QUADRO CLÍNICO	39
IV.2. DELEÇÃO DO CROMOSSOMO 8	45
IV.2.1. MAPEAMENTO DOS PONTOS DE QUEBRA	45
IV.2.2. A ORIGEM PARENTAL DA DELEÇÃO	57
IV.2.3. OS POLIMORFISMOS E A FORMAÇÃO DOS REARRANJOS DO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 8	57
IV.2.4. O QUADRO CLÍNICO DE DELEÇÕES DO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 8	65
V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	69
<i>Deleção do braço curto do cromossomo X</i>	69
<i>Deleção do braço curto do cromossomo 8</i>	71
VI. ABSTRACT	72
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
BANCOS DE DADOS ELETRÔNICOS E OUTROS RECURSOS DA INTERNET	82

I. INTRODUÇÃO

As anomalias cromossômicas são encontradas em cerca de seis em cada 1.000 recém-nascidos e em 25% dos abortos e natimortos, sendo de 50 a 60% a frequência nos abortamentos de primeiro trimestre. As anomalias cromossômicas mais frequentes são as numéricas, porém os rearranjos cromossômicos estruturais equilibrados são detectados em cerca de 1:500 indivíduos na população geral e os rearranjos estruturais não equilibrados correspondem a cerca de 3% das anormalidades cromossômicas (revisão em Jacobs e Hassold, 1986).

I.1. A FORMAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS

O dano ao DNA provoca a ativação de processos de reparo controlados geneticamente. As células normais são capazes de reparar danos com fidelidade ou introduzir erros durante o reparo, de acordo com o tipo de lesão e do mecanismo utilizado para o reparo (revisão em Moustacchi, 2000). As quebras na dupla fita do DNA (*Double Strand Break* – DSB), sejam induzidas por agentes externos (radiação ionizante, por exemplo) ou resultantes de processos celulares normais, podem ser retificadas na célula eucarionte por duas principais vias de reparo: a recombinação homóloga (*Homologous Recombination* – HR) ou a junção de extremidades não homólogas (*Non-Homologous End Joining* – NHEJ) (revisão em Moustacchi, 2000; Haber, 2000).

Ocorrendo mais de uma quebra em uma mesma célula, o reparo por NHEJ pode unir extremidades não contíguas, com adição ou com perda de seqüências, causando rearranjos estruturais. O mecanismo de NHEJ foi evidenciado, por exemplo, 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). Os rearranjos estruturais podem ainda se originar do reparo por recombinação homóloga, quando são utilizadas seqüências homólogas ectópicas, como substrato para a recombinação. A análise das seqüências presentes nos pontos de quebra de rearranjos e a determinação do grau de homologia entre elas podem fornecer

indicações sobre a contribuição dos diferentes mecanismos de reparo para sua formação (revisão em Haber, 2000).

Com o avanço das técnicas moleculares, foi possível identificar que determinadas regiões do genoma possuem características estruturais que as predispõem a participar de rearranjos. Doenças causadas por tais rearranjos foram denominadas por Lupski (1998) de doenças genômicas, contrastando com o mecanismo clássico para doença genética, em que um fenótipo anormal é principalmente originado por mutações de ponto. Por exemplo, em casos de genes sensíveis à dosagem flanqueados por repetições orientadas em *tandem*, se ocorrer recombinação não alélica entre as repetições flanqueadoras, os genes localizados entre as repetições podem ser deletados (haploinsuficiência) ou duplicados (aumento de dosagem). No caso de genes homólogos dispostos em *tandem*, podem surgir genes híbridos recombinantes, com diferentes propriedades. Se a recombinação ocorre entre repetições invertidas e uma cópia da repetição está localizada dentro de um gene, o resultado é uma inversão que inativa o gene.

Portanto, na HR, o tipo de sequência utilizada como molde para o reparo define se o reparo será conservador ou se introduzirá erros. Quando a sequência homóloga da cromátide irmã é o molde para o reparo, não há erros. No caso de a sequência molde ser a do cromossomo homólogo, pode ocorrer conversão gênica. O molde escolhido pode, entretanto, ser uma sequência homóloga, porém não alélica (*Non-Allelic Homologous Recombination* – NAHR), o que resulta em rearranjos cromossômicos. Por exemplo, está documentada a participação de elementos repetidos *Alu* e LINE-1 na origem de rearranjos cromossômicos, a partir de reparo por NAHR. É o caso das duplicações parciais do gene *ALL1* na leucemia mielóide aguda, que resultam da recombinação entre sequências *Alu* nos introns 1 e 6 desse gene (Strout *et al.*, 1998).

Já se demonstrou que alterações cromossômicas constitucionais com alta recorrência, que condicionam diversas síndromes, resultam de NAHR entre repetições de baixo número de cópias (*Low Copy Repeats* – LCR), que podem incluir genes/pseudogenes e sequências repetidas diversas, em *tandem* ou invertidas (Shaw e Lupski, 2004). Essas alterações são principalmente duplicações e deleções, geralmente não detectáveis nas análises citogenéticas de rotina. Esse é, por exemplo, o mecanismo que origina a microdeleção de cerca de 3,7 MB em 17p11.2, presente na maioria dos pacientes com a síndrome de Smith-Magenis. Os segmentos de junção correspondem à fusão de LCR que ladeiam o segmento deletado. Essas mesmas LCR estão envolvidas

na origem da microduplicação correspondente à deleção, como esperado num evento de NAHR (revisão em Lupski, 2003).

As LCR têm entre 10 e 500 Kb de extensão, costumam compartilhar mais de 95% de identidade (Stankiewicz *et al.*, 2003) e compreendem de 5% a 10% do genoma (Bailey *et al.*, 2001). As NAHR entre duas LCR nem sempre ocorrem num mesmo ponto dentro delas, mas o rearranjo resulta em alterações de dosagem relacionadas a uma determinada doença genômica (Stankiewicz e Lupski, 2002). Apesar dos longos trechos de identidade de sequência entre cópias de LCR, a recombinação ocorre em posições preferenciais. Assim, em doenças como Charcot-Marie-Tooth do tipo 1A (CMT1A), neurofibromatose do tipo 1 (NF1) e síndrome Williams-Beuren (WBS) ocorrem “hotspots” que variam de 557 pb a 12 Kb e que representam apenas 2%-13% da sequência de identidade entre as LCR (revisão em Shaw *et al.*, 2004). É interessante que, em células de mamíferos, 200 pb parece ser o comprimento mínimo ininterrupto com identidade de sequência requerida para iniciar a recombinação homóloga na meiose (revisão em Lukacovich e Waldman, 1999).

Em algumas situações, foi mostrado que rearranjos cromossômicos afetando segmentos cromossômicos relativamente longos podem ser causados por NAHR. De forma geral, as translocações recíprocas são únicas quanto aos cromossomos participantes e os pontos de quebra. Sendo assim, a maioria é muito pouco conhecida em termos de mecanismos de formação. Há, entretanto, uma certa predominância de translocações envolvendo certos segmentos de alguns cromossomos, sugerindo a presença de homologia entre os diferentes cromossomos rearranjados. A t(11;22) é um rearranjo conhecido por sua recorrência e por ter um fragmento de junção semelhante em diferentes afetados. Nesse caso, a quebra no braço longo do cromossomo 22 foi localizada na LCR-B e no braço longo do cromossomo 11, em uma região repetitiva rica em AT. A LCR-B também tem repetições AT, o que sugere a ocorrência de recombinações entre esses segmentos (Shaikh *et al.*, 2001). Esse ponto de quebra na LCR-B também foi identificado em outras translocações: t(17;22)(q11.2;q11.2), t(1;22)(p21.2;q11.2) e t(4;22)(q35.1;q11.2). A maioria das quebras em 22q11 ocorreu no centro de uma repetição palindrômica rica em AT de 595 pb de comprimento. As quebras nos outros cromossomos envolvidos nessas translocações (11q23, 17q11.2, 1p21.2, 4q35.1) também ocorrem no centro de sequências repetidas invertidas. Essas observações sugerem que a estrutura secundária do DNA na forma de grampos é a base do rearranjo (revisão em Gotter *et al.*, 2007). Uma inversão de um segmento de 3 Mb

em 22q11.21, tipicamente deletado em pacientes com a síndrome da deleção 22q11.2, parece ser o evento que precedeu uma translocação 46,XY,t(8;22)(q24.13;q11.21), com o ponto de quebra recorrente em 22q e o outro em uma repetição rica em AT de 8q (Gotter *et al.*, 2007).

No caso das translocações Robertsonianas, o emparelhamento de seqüências repetitivas pericentroméricas, que teriam homologia em cromossomos acrocêntricos, propiciaria a transferência de braços cromossômicos pela troca entre seqüências emparelhadas em disposição invertida ou por uma recombinação em U (Shaffer e Lupski, 2000).

Muitos dos estudos de mapeamento de pontos de quebra de aberrações cromossômicas concentram-se em “alterações genômicas recorrentes”. Há, porém, alguns estudos cujo foco foram alterações cromossômicas que afetam grandes blocos cromossômicos, buscando a caracterização mais precisa desses rearranjos e a determinação de seus mecanismos de origem.

Em 1996, Floridia *et al.* estudaram 16 casos de duplicação invertida do braço curto do cromossomo 8 [invdup(8p)]. A fim de identificar os segmentos duplicados, os autores utilizaram FISH, análise de polimorfismos de DNA por PCR e análise quantitativa por *Southern blotting*. Os rearranjos ocorreram sempre entre cromossomos homólogos e os pontos de quebra na extremidade distal do braço curto do cromossomo 8 foram localizados nos mesmos segmentos cromossômicos. Os autores sugeriram a presença, nesses segmentos, de seqüências repetidas com orientação invertida, cujo emparelhamento na meiose favoreceria a ocorrência de recombinação, levando à formação de dicêntricos. Quebras centroméricas originariam os cromossomos 8 com duplicação invertida.

Antonini *et al.* (2002) estudaram dois casos de duplicação do braço curto do cromossomo 3, identificados por meio do padrão de bandas G. A investigação por FISH permitiu o mapeamento dos pontos de quebra em segmentos contidos em YAC ou em intervalos delimitados por tais sondas. A análise de microssatélites por PCR indicou que ambos os rearranjos ocorreram entre cromátides irmãs dos cromossomos paternos.

Krepischi-Santos e Vianna-Morgante (2003) mapearam os pontos de quebra em três casos de duplicação do braço curto do cromossomo 9, utilizando FISH e a análise de polimorfismos de DNA. Nos três casos, a duplicação abrangia quase todo o braço curto do cromossomo 9, tendo sido demonstrado que a duplicação era direta em dois casos e invertida no outro. Nos dois casos de dirdup(9p), o ponto de quebra distal foi

localizado na região subtelomérica, enquanto que o ponto de quebra proximal foi localizado na região pericentromérica. O estudo de polimorfismos de DNA indicou que esses rearranjos ocorreram na meiose materna. Na invdup(9p), o ponto de quebra proximal foi mapeado nas seqüências centroméricas, enquanto que o ponto de quebra distal foi localizado num segmento proximal à região subtelomérica, que não estava presente no cromossomo duplicado. A análise de polimorfismos de DNA apontou a origem paterna e pós-zigótica do rearranjo. As autoras sugerem que os rearranjos teriam se originado de recombinação entre seqüências repetitivas com homologia presentes nas regiões pericentromérica e subtelomérica do cromossomo 9.

Rearranjos aparentemente equilibrados, associados a alterações fenotípicas, podem refletir uma complexidade adicional no mecanismo de formação. Em uma amostragem de dez casos de translocações constitucionais aparentemente equilibradas em pacientes com fenótipo anormal, Gribble *et al.* (2005) detectaram rearranjos complexos crípticos (CCR – *Cryptic Complex Chromosomal Rearrangements*) em seis casos. Mais quatro casos como esses foram descritos posteriormente por Ciccone *et al.* (2005). Uma deleção em portadora de translocação aparentemente equilibrada entre três cromossomos foi detectada por CGH-array por Rosenberg *et al.* (2005).

São desconhecidos os mecanismos de formação e as seqüências envolvidas na maior parte dos rearranjos cromossômicos não recorrentes. A caracterização dessas seqüências pode ajudar a compreender melhor os mecanismos de origem das alterações cromossômicas. O aprimoramento das técnicas citogenéticas em associação com a análise do DNA e com o crescente conhecimento da seqüência e da arquitetura do genoma humano tem permitido abordar tais aspectos da formação dos rearranjos cromossômicos, levando aos mecanismos subjacentes à sua formação. Ao mesmo tempo, com a caracterização desses rearranjos busca-se entender seus efeitos clínicos e chegar à identificação de genes relacionados às alterações fenotípicas.

1.2. AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS INDICANDO GENES CANDIDATOS A QUADROS CLÍNICOS

Vários estudos têm relacionado genes a determinados quadros clínicos a partir de alterações cromossômicas presentes nos afetados. Os rearranjos equilibrados, como as translocações recíprocas, são particularmente informativos, pois oferecem a oportunidade de se identificarem genes candidatos alterados pelas quebras

cromossômicas, como mostram os vários relatos da literatura. É ilustrativo o caso da paciente com hipotonia e deficiência mental grave, portadora de translocação t(X;3)(p11.2;p25) *de novo* descrito por Endris *et al.* (2002). O ponto de quebra no cromossomo X estava localizado fora de região codificadora, porém demonstrou-se que o gene *MEGAP* (**M**ental disorder-associated **GAP** protein), mapeado em 3p25, fora interrompido pelo rearranjo. Os autores estudaram 11 pacientes com alterações terminais em 3p e observaram deleção de *MEGAP* em todos os pacientes com deficiência mental grave. O único paciente portador de deleção do braço curto do 3 em que o gene estava presente tinha função cognitiva normal, demonstrando que a perda do gene *MEGAP* é crucial para o retardo mental nessa síndrome de deleção cromossômica. *MEGAP* é altamente expresso em tecido cerebral fetal e adulto, especificamente nos neurônios do hipocampo e do córtex, estruturas conhecidas por desempenhar funções principais na mais alta função cognitiva, aprendizado e memória. Participa ainda da regulação da migração neuronal e da ramificação axonal, que são importantes para a função cognitiva normal.

Já os rearranjos cromossômicos não equilibrados, com segmentos deletados e duplicados que podem incluir vários genes, não são o ideal para fazer essa associação genótipo-fenótipo. Mesmo assim, há possibilidade de se chegar a genes candidatos, como mostra, por exemplo, a associação do gene *CRELD1* com defeitos do septo ventricular (AVSD), que são malformações cardiovasculares relativamente comuns. A ocorrência de AVSD em pacientes com deleções do braço curto do cromossomo 3 levou à identificação de um *locus*, denominado AVSD2 na região deletada. Robinson *et al.* (2003) caracterizaram a molécula de adesão celular CRELD1, como sendo o produto de gene candidato para o *locus* AVSD2 e tendo sido identificadas mutações em heterozigose do gene *CRELD1* (**C**ysteine-**R**ich Protein With **EGF-Like Domains 1**) em 6% dos indivíduos com AVSD.

Com a aplicação da hibridação genômica comparativa utilizando-se *arrays* (CGH-array), desequilíbrios cromossômicos que abrangem menos de 1 Mb passaram a ser detectados, aumentando assim a chance de se identificarem genes relacionados aos quadros clínicos. Por exemplo, recentemente, os genes *MAPT* (**M**icrotubule-**A**ssociated **P**rotein **Tau**; mutações antes associadas com a demência fronto-temporal associada a parkinsonismo) e *CRHR1* (**C**orticotropin-**R**eleasing **H**ormone **R**eceptor **1**) foram associados com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor por estarem contidos nas microdeleções de 500 –600 kb em 17q21.3, detectadas em afetados (Varela *et al.*, 2006;

Koolen *et al.*, 2006; Shaw-Smith *et al.*, 2006). Entretanto, a relação desses microdesequilíbrios cromossômicos com o fenótipo pode ser complexa, como discutiremos a seguir.

1.3. AS VARIANTES ESTRUTURAIS, SEUS EFEITOS CLÍNICOS E A PREDISPOSIÇÃO A REARRANJOS

A hibridação genômica comparativa, utilizando *arrays* (CGH-array) tem evidenciado não somente variações no número de cópias de segmentos cromossômicos em associação com quadros clínicos (Krepischi-Santos *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2006), como também variações no número de cópias como polimorfismos na população geral (CNV, *Copy Number Variation*, ou CNP, *Copy Number Polymorphism*; Sharp *et al.*, 2005; Redon *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007).

A relação de microdeleções e microduplicações com o fenótipo clínico pode, entretanto, ser complexa. Microdeleções e duplicações presentes tanto em indivíduos afetados quanto em outros fenotipicamente normais dificultam a associação com os quadros clínicos. Admitir, como causa de alteração fenotípica, apenas rearranjos autossômicos *de novo* e, quando herdados, somente os ligados ao X, todos não descritos como polimorfismos, é pensar de modo conservador. Mecanismos como expressão de gene recessivo antes coberto, dependência de outras alterações genômicas e mecanismos diversos de penetrância incompleta podem estar atuando para a manifestação clínica ou não de um microrrearranjo (Krepischi-Santos *et al.*, 2006).

Redon *et al.* (2006) construíram a primeira geração de mapa de CNV do genoma humano com base em um estudo de 270 indivíduos de três continentes. Para a busca por CNV, utilizaram *arrays* de genotipagem de SNP e CGH-array de clones do genoma humano, cobrindo 360 Mb (12% do genoma). Detectaram 1447 regiões de CNV, podendo compreender sobreposições, como também ganhos ou perdas adjacentes. Essas CNV contêm centenas de genes, inclusive já relacionados a doenças, e outros elementos funcionais.

Wong *et al.* (2007) realizaram um *screening* genômico de pessoas normais e identificaram 3654 CNV em cromossomos autossômicos. Dessas, 800 apareciam com uma frequência de pelo menos 3% dentre indivíduos analisados, 77% das quais ainda não haviam sido descritas. Verificaram também que mais de 1500 genes estavam incluídos nas CNV: genes relacionados aos sentidos (de receptores olfativos, de sabor,

de visão e de audição), genes que sabidamente variam em número de cópias (grupo sanguíneo RH, amilases e defensinas), genes relacionados a câncer e a doenças multifatoriais (como as doenças de Alzheimer e de Parkinson, doenças coronarianas, obesidade, diabetes, susceptibilidade a dependência de nicotina, propensão à esquizofrenia). A diferença entre os indivíduos mais discrepantes quanto a CNV foi de 9 Mb (266 *loci* ou 228 clones de CNV), o que levou à conclusão de que mais de 1,5% do genoma é tolerante a CNV.

Ullmann *et al.* (2007) identificaram uma duplicação de 1,5 Mb por CGH-array, flanqueada por LCR, em 16p13, em quatro homens autistas de três famílias não relacionadas, em alguns de seus parentes normais e afetados em graus variáveis. A deleção do mesmo intervalo foi detectada em outros três pacientes com deficiência mental e outras anomalias clínicas. Variações de número de cópias não haviam sido descritas para essa região e nunca havia sido encontrada nos mais de 600 indivíduos analisados. Com isso, os autores sugerem que essas alterações predisporiam ao autismo e à deficiência mental.

Klopocki *et al.* (2007) identificaram uma deleção de 200 Kb, em 1q21.1, com pontos de quebra ricos em LCR, em todos os 30 pacientes investigados com síndrome de TAR (trombocitopenia hipomegacariocítica e aplasia de rádio), por meio de CGH-array. A deleção, que não foi encontrada em 700 indivíduos controle, foi herdada em 75% dos casos, em sua maioria de genitores normais. Isso levou os autores a postularem que a síndrome está de fato relacionada à deleção, mas o fenótipo só se manifestaria na presença de alguma modificação adicional, indicando que esses rearranjos podem conferir susceptibilidade e não ser determinísticos.

As variantes estruturais podem servir de substrato para novos rearranjos, tornando seus portadores mais propensos a terem descendentes com alterações cromossômicas patogênicas. Por exemplo, microdeleções podem surgir da recombinação não homóloga entre repetições diretas em um cromossomo. Sequências repetidas dispostas em sentidos opostos, em um mesmo cromossomo, podem servir de substrato para um rearranjo homólogo não alélico, em um duplo evento de recombinação entre elas, que resulte em inversões pericêntricas ou paracêntricas ou em rearranjos mais complexos, dependendo do número de permutações entre os blocos de alta homologia.

Sharp *et al.* (2005) definiram 130 regiões dispersas por ~274 Mb, potencialmente propensas a rearranjos (*hotspots*), por estarem flanqueadas por

repetições que seriam propensas a recombinação. Construíram um *microarray* para detectar variações de números de cópias por CGH nessas regiões. Em 47 indivíduos normais de quatro continentes, identificaram 119 regiões de CNV, 73 ainda não descritas. Havia uma igual frequência de duplicações e deleções. Regiões de *hotspots* chegaram a apresentar um aumento de cópias de até quatro vezes. Em geral, as CNV estavam presentes em todas as populações estudadas, indicando que os eventos de expansão ou retração são recorrentes.

Entre as variantes descritas por Sharp *et al.* (2005) algumas já eram conhecidas, como é o caso dos aglomerados de genes anti-microbiais de beta-defensinas em 8p23.1 (*DEFB4*, *DEFB103* e *DEFB104*). Indivíduos da população geral podem apresentar de duas a doze cópias desses genes no genoma diplóide e um cromossomo pode ter de uma a oito cópias; esse polimorfismo pode ser identificado por FISH como uma variação eucromática de 8p23.1 (Hollox *et al.*, 2003). Nesse segmento do cromossomo 8 também existem duas regiões de repetição de receptores olfativos (ORR), distantes 5cM uma da outra, e um em cada quatro indivíduos da população geral é portador de inversão polimórfica do segmento entre essas duas ORR (revisão em Hollox *et al.*, 2003). As inversões polimórficas propiciam o rearranjo t(4;8)(p16;p23). Todas as mães dos pacientes estudados apresentavam tanto a inversão em 4p16 quanto em 8p23, que aparecem na população com uma frequência de 12,5% e 26%, respectivamente. Tais inversões ocorrem via NAHR entre LCR com orientações invertidas, que contêm aglomerados gênicos de receptores olfativos, tanto no cromossomo 4 quanto no 8 (revisão em Shaw e Lupski, 2004).

Sharp *et al.* (2006) detectaram quatro deleções de ~600 Kb, em 17q21.31, em pacientes com retardo mental, investigados por *microarray*. Koolen *et al.* (2006) e Shaw-Smith *et al.* (2006) descreveram essa mesma deleção, que pode ser responsável por até 1% dos casos de deficiência mental (Lupski, 2006). Tais deleções teriam resultado de NAHR associada à inversão polimórfica na população. As inversão está flanqueada por LCR, distantes ~900 Kb uma da outra e que estão invertidas no haplótipo mais comum (80%). O outro haplótipo, presente em 20% da população europeia, tem outras LCR orientadas no mesmo sentido, o que predispõe a região a NAHR, gerando uma deleção de ~600 a ~700 Kb, que inclui seis genes, incluindo o *MAPT*.

Nos últimos anos, com o advento dos *microarrays*, diversas variantes genômicas já foram identificadas como polimorfismos na população geral. Outras foram

identificadas como causa de fenótipo alterado. Além disso, fica evidente que a associação de determinados quadros fenotípicos com microrrearranjos genômicos pode ser muito complexa e microdeleções e microduplicações genômicas podem não ser determinantes de alterações clínicas, mas conferir susceptibilidade para certas doenças. Dessa forma o estudo dos desequilíbrios genômicos submicroscópicos pode contribuir para a compreensão de mecanismos genéticos envolvidos em doenças de etiologia desconhecida.

II. OBJETIVOS

Neste trabalho, são analisadas duas deleções cromossômicas (uma deleção do cromossomo 8 e outra do cromossomo X) detectadas em pacientes com retardo mental associado a sinais, que foram encaminhados, para exame cromossômico e diagnóstico, ao Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana (IB-USP). Buscando determinar a origem e os mecanismos de formação desses cromossomos alterados e estabelecer a relação entre essas alterações cromossômicas e o fenótipo de seus portadores, este trabalho alia a análise cromossômica por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a análise do DNA.

III. PACIENTES E MÉTODOS

III.1. PACIENTES

Os rearranjos cromossômicos foram detectados em pacientes atendidos no Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana, LGH (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da USP). Os responsáveis pelos pacientes deram consentimento, após os devidos esclarecimentos, para que o exame fosse aprofundado em pesquisa. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos – do Instituto de Biociências da USP (Protocolo nº 033/2005). A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pela equipe de médicos geneticistas desse serviço e nos serviços de origem, onde foram realizados os exames médicos complementares. Os pacientes foram diagnosticados como portadores das seguintes deleções cromossômicas: 46,XY, del(X)(p11) e 46, XX, del(8)(p23.1).

III.1.1. PACIENTE 1

Deleção do braço curto do cromossomo X: 46,XY, del(X)(p11.23)

O paciente foi encaminhado ao Serviço por apresentar retardo mental profundo associado a microcefalia, baixa estatura e fâcies peculiar, tendo apresentado puberdade precoce, por volta dos 9 anos de idade. Foi relatada a ocorrência de outros afetados do sexo masculino com quadro clínico semelhante, que se distribuem na família de acordo com um padrão de herança ligada ao X recessiva (Figura 1).

O probando (IV.26 – Figura 1) nasceu de parto normal a termo, com peso de 2450 g e comprimento de 43 cm. Era hipotônico. Sentou sem apoio com um ano de idade e andou com 2 anos e 8 meses. Examinado aos 12 anos, apresentava retardo mental profundo, movimentos estereotipados, havia sinais de hipotonia e não falava. Tinha contato visual pobre, aversão ao contato físico e crises de agressão. Sua estatura era de 132 cm (< 3º percentil); tinha olhos profundos, filtro nasal curto, orelhas grandes em abano e rotadas para trás, pés planos e testículos aumentados. O exame físico sempre foi prejudicado, pois o paciente não cooperava. Aos 16 anos de idade, o perímetro cefálico era de 53 cm (2º percentil). O tio materno do probando, igualmente

afetado, não foi examinado pela equipe médica do Serviço de Aconselhamento Genético do LGH, que pôde apenas avaliar suas fotografias.

O exame cromossômico realizado em linfócitos de sangue periférico após bandamento G não revelou alterações. Foi realizado posteriormente um *screening* genômico, utilizando CGH-array, que incluía ~3.500 alvos (segmentos de DNA humano clonados em BAC) distantes um do outro 1 Mb (Knijnenburg *et al.*, 2004). Este array foi produzido no Centro Médico da Universidade de Leiden, na Holanda, e a análise desse caso foi parte de um estudo colaborativo entre o Centro Médico de Leiden e o Laboratório de Genética Humana (Rosenberg *et al.*, 2006). Foi detectada uma deleção em Xp11, de aproximadamente 2Mb. Esta deleção foi detectada também no tio materno do paciente (III.24 — Figura 1), com quadro clínico semelhante, mas não no tio clinicamente normal (III.26).

III.1.2. PACIENTE 2

Deleção do braço curto do cromossomo 8: 46, XX, del(8)(p23.1)

Em sua consulta ao Serviço de Aconselhamento Genético, a menina, aos seis anos e dois meses de idade, demonstrava dificuldade motora e de aprendizado; era hiperativa. Apresentava estatura de 113 cm (25º percentil), peso de 20 Kg (25º percentil) e perímetro cefálico de 47 cm (abaixo do 3º percentil). Ao exame físico apresentou os seguintes sinais: nariz aquilino, desvio de septo nasal, palato alto e estreito, orelhas em abano com hipoplasia de cartilagem e clinodactilia bilateral do 5º dedo. Tinha hipermetropia. Foi relatada a correção cirúrgica de comunicação inter-atrial. O pai da criança tinha quadro clínico semelhante, não tendo conseguido alfabetizar-se.

A análise após bandamento GTG mostrou uma deleção do braço curto do cromossomo 8 – del(8)(p23→pter) – na paciente e em seu pai. A mãe da paciente tem cariótipo normal, assim como seus avós paternos (Figura 2).

Figura 1. Heredograma do Paciente 1, construído com base em informações dadas por III-25.

Figura 2. Heredograma da Paciente 2.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. ANÁLISE CROMOSSÔMICA

III.2.1.1. Preparações cromossômicas

As preparações cromossômicas 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 72h, 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 minutos finais do cultivo. Para a hipotonização, utilizou-se uma solução de KCl (0,075M) por 12 minutos a 37°C e para a fixação, metanol:ácido acético, 3:1. Parte do material foi conservado 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 de técnicas de bandamento cromossômico, ou congeladas a -20°C para utilização posterior em experimentos de hibridação *in situ*.

III.2.1.2. Hibridação in situ fluorescente (FISH)

Nos experimentos de hibridação *in situ* fluorescente foram utilizados, como sondas, segmentos cromossômicos clonados em cromossomos artificiais de bactérias (BAC), localizados nas regiões cromossômicas de interesse. As sondas foram selecionadas a partir dos mapas obtidos em bancos de dados: Genome Database (GDB; <http://gdbwww.gdb.org>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>), National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nih.gov>) e University of California – Santa Cruz – Genome Browser (UCSC; <http://genome.ucsc.edu>). Foram obtidas do BACPAC Resources, Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI; <http://www.chori.org>).

As bactérias que continham as seqüências clonadas foram multiplicadas em LB líquido e seletivo (cloranfenicol 20 µg/mL). A extração das sondas seguiu o protocolo fornecido pelo CHORI (Oakland). A concentração das sondas foi estimada em gel de

agarose 0,8% e a marcação feita por *nick translation* com biotina ou digoxigenina (Biotin-Nick Translation Mix ou Dig-Nick Translation Mix, respectivamente; Roche Applied Science), conforme instruções do fabricante. A supressão das seqüências repetitivas foi feita com 6 µg de Cot (Roche) para 250 µg de sonda. Para a precipitação do DNA da sonda adicionou-se uma quantidade de acetato de sódio 3M equivalente a 10% do volume da reação de marcação e etanol absoluto equivalente a 2,5 vezes desse volume. Após incubação *overnight* a -20°C , procedia-se à centrifugação por 30 minutos a 13000 rpm. Após serem precipitadas, as sondas foram re-suspendidas em 12 µL de meio de hibridação (formamida 50% e dextran sulfato 10%, em 2xSSC), em concentrações que variaram de 300-600 ng/µL. A desnaturação foi feita a 98°C por 10 min, seguida de *pré-annealing* a 37°C por 30 min.

As lâminas das preparações cromossômicas foram armazenadas a -20°C . Após o descongelamento, o material foi tratado com RNase (100 µg/mL em 2xSSC), por uma hora a 37°C , seguindo-se três banhos de 2xSSC, desidratação em banhos de etanol e secagem ao ar. Para a desnaturação dos cromossomos, utilizou-se formamida 70% em 2xSSC, por 2 min a 73°C , seguida da desidratação em etanol gelado e secagem ao ar.

A sonda no meio de hibridação foi colocada sobre a lâmina e recoberta com lamínula, incubando-se em câmara úmida a 37°C por dois dias. As lâminas foram lavadas em solução de formamida 50% em 2xSSC por 2 min a 37°C , um banho de 2xSSC por 1 min a 37°C e um banho de PBT (PBS acrescido de 0,1%, tween 20 e 0,15% de BSA – Sigma) por 5 min à temperatura ambiente.

Procedeu-se à imunodeteção com avidina (no caso de marcação com biotina) ou com anti-digoxigenina (no caso de marcação com digoxigenina) conjugada a FITC (fluorescência verde) ou a rodamina (fluorescência vermelha) em PBT (1:50 em PBT), mantendo-se as lâminas em câmara úmida, por 45 min a 37°C . Seguiram-se três banhos de PBT de 3 min cada, à temperatura ambiente. Os cromossomos foram corados com iodeto de propídeo (0,6 ng/µL; Sigma) e as lâminas, montadas com DAPI (0,8 µg/mL; Sigma) em Vectashield Mounting Medium (Vector).

As preparações foram observadas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot 2. Para documentação, as imagens foram capturadas por uma câmara CCD acoplada ao microscópio e processadas usando-se o programa ISIS (Metasystems).

III.2.2. ANÁLISES DO DNA

III.2.2.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de amostras de aproximadamente 5 mL sangue periférico, colhidas com o anticoagulante EDTA K3 a 15% (Vacutainer). A lise foi feita em solução de sacarose 0,32 M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; MgCl₂ 5 mM; TritonX100 a 1%. Após centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em solução tampão (NaCl 0,075 M; EDTA 0,02 M), acrescentando-se em seguida uma solução de SDS e solução a 10% de proteinase K. As amostras foram incubadas por uma noite em estufa a 37°C. Foi então acrescentado fenol destilado (Merck). As amostras foram centrifugadas e a fase superior, transferida para outro tubo, adicionando-se fenol e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação, acrescentou-se clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) à fase superior. Seguiu-se nova centrifugação e uma solução de KCl 2 M e etanol gelado foi acrescentada ao sobrenadante. O DNA precipitado foi removido com auxílio de um capilar de vidro com ponta curva, lavado em etanol 70%, seco ao ar por alguns minutos e ressuspensionado em TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A concentração das amostras foi estimada utilizando-se espectrofotômetro, a partir do valor de absorbância a 260 nm. A integridade do DNA foi avaliada em gel de 0,8% de agarose. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até a sua utilização.

III.2.2.2. Análise de loci de microssatélites

Para a delimitação dos pontos de quebra e determinação da origem parental do rearranjo, utilizamos também a análise de *loci* de microssatélite, realizada por PCR. Os *loci* de microssatélites mapeados nas regiões de interesse foram selecionados a partir dos mapas disponíveis nos bancos de dados anteriormente citados.

Os protocolos para a amplificação por PCR seguiram as condições disponíveis no GenBank. Após a eletroforese em gel de agarose 2% foi realizada coloração com brometo de etídeo.

Para determinação da origem parental da deleção do cromossomo 8, foi genotipado o *locus* D8S550, parte do kit “ABI PRISM® Linkage Mapping Set v. 2.5-MD10” (Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram separados por

eletroforese em capilar no aparelho MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences) juntamente com o padrão de peso molecular “MegaBACE™ ET 550-R Size Standard”. A análise foi realizada, utilizando-se o *software* “Genetic Profiler versão 2.2”.

III.2.2.3. Seqüenciamento do DNA

O seqüenciamento do DNA foi utilizado para identificar mutações em gene candidato a explicar alterações fenotípicas no Paciente 1, o *ZNF81*. Para isso, visamos as regiões codificadoras desse gene e utilizamos os *primers* desenhados por Kleefstra *et al.* (2004). Entretanto, alguns *primers* usados nesse trabalho para amplificar o exon 6 não funcionaram e, segundo os sítios da internet Primer3 e IDT, eram incompatíveis, pois apresentavam temperaturas de pareamento discrepantes e formavam dímeros que interferiam na PCR. Com isso, desenhemos quatro novos pares de oligonucleotídeos para amplificar esses segmentos (Tabela I). Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) e em seguida quantificados em gel de agarose 2%, utilizando como padrão o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Tabela I. *Primers* utilizados para a amplificação das regiões codificadoras do gene *ZNF81*.

ALVO	ORIENTAÇÃO	OLIGO (5'→3')	PRODUTO
EXON 3	LEFT PRIMER*	GTTCAGCGCTAAGTACCATTGA	858 pb
	RIGHT PRIMER*	GAGCTAATTGCAAATTACGAAG	
EXON 4	LEFT PRIMER*	CTCCATCCTCCAGTGCTGATCATG	237 pb
	RIGHT PRIMER*	GGGCACAATTTAACCCATAACAGG	
EXON 5	LEFT PRIMER*	CTCAGTTCCCATGAAATGTGG	286 pb
	RIGHT PRIMER*	CCAACCTTTAAGCAATAACAGC	
EXON 6 A	LEFT PRIMER	TCTTGCGGTCTATTGTTTGTG	498 pb
	RIGHT PRIMER	CCTGTATGTGTATTTTCGTGGTG	
EXON 6 B	LEFT PRIMER	TTGGGCATGGTCAAGTTTT	478 pb
	RIGHT PRIMER	TGAGTTGTCTGATGCCTGAGT	
EXON 6 C	LEFT PRIMER	GCAATGAATGTGGGAAATCA	457 pb
	RIGHT PRIMER	TTTGACCTGTTGGTGAAAGC	
EXON 6 D	LEFT PRIMER	AGGCTTTCACCAACAGGTCA	500 pb
	RIGHT PRIMER	TCTCATTTTCAAGAAACAGGATT	

* De acordo com Kleefstra *et al.* (2004).

A reação de seqüenciamento foi realizada segundo o protocolo do fabricante do seqüenciador MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences), em volume final de reação de 10 µL, utilizando 30ng do produto de PCR, 0,5mM de primer e 4 µL de *DYEnamic ET terminator reagent premix* (Amersham Biosciences). Para análise das seqüências, utilizamos o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

III.2.2.4. Southern blotting

Na busca por identificar e delimitar os fragmentos de junção dos rearranjos cromossômicos, utilizamos o *Southern blotting*. A partir da localização dos pontos de quebra nos BAC, conhecendo-se as seqüências das regiões em que estão mapeados, foi possível o desenho de *primers* que permitiram obter, por PCR, os oligonucleotídeos para serem utilizados como sondas em *Southern blotting*, para reconhecer os segmentos de junção das quebras, previstos no mapa de restrição.

O desenho dos *primers* foi feito a partir de mapas cromossômicos e seqüências genômicas do banco de dados *Ensembl* e utilizando o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>).

Para a amplificação das sondas, utilizamos cerca de 100 ng de DNA genômico, em volume final de reação de 25 µL, na presença de Tris 300 mM (pH 8,5), Hepes 100 mM, MgCl 25 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, dNTP 200 µM, 15 pmoles dos *primers forward* e *reverse* e 1 unidade de *Taq* polimerase. O programa do termociclador consistiu de uma primeira etapa em que o primeiro ciclo tinha temperatura inicial de 94°C por 1 min para a desnaturação, diminuindo até 69°C por 30 seg para a hibridação dos *primers* e aumentando até 72°C para a extensão, seguindo-se 13 ciclos em que a temperatura de hibridação diminui 0,5°C por ciclo, até atingir a temperatura de 62°C. A segunda etapa consistiu em 16 ciclos com temperatura de desnaturação de 94°C, hibridação a 62°C e extensão a 72°C, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados, em gel contendo 2 % de agarose, pela coloração com brometo de etídio, através de trans-iluminação ultravioleta.

Com base nos mapas de restrição dos segmentos de interesse (pDRAW32 1.0 Revision 1.1.88, www.acaclone.com; Webcutter 2.0, <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>), as amostras de DNA genômico foram submetidas a digestão com as enzimas adequadas,

segundo protocolo do fabricante. Os fragmentos de DNA resultantes foram separados, em gel de 0,7% de agarose, por eletroforese e sua transferência para membranas de *nylon* foi realizada de acordo com o método descrito por Southern (1975).

As sondas foram marcadas com nucleotídeo radioativo [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP] por *random priming*, utilizando-se o *kit* de marcação *Random Primers DNA Labeling System* (Gibco-BRL), conforme as instruções do fabricante. A desnaturação das sondas foi feita por 5 min a 100°C e a hibridação por 2 horas a 65°C. A lavagem foi feita por 20 min à temperatura ambiente em uma solução de 2xSSC e 0,1% SDS e 5 min a 65°C em solução 1xSSC e 0,1% SDS. Em seguida, as membranas foram secas ao ar e expostas a filmes de raios X Kodak® T-MAT, por 1 a 4 dias, a -70°C. A revelação dos filmes foi feita automaticamente no aparelho X Kodak RP X-OMAT Processor, no Hospital Universitário da USP.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. DELEÇÃO DO CROMOSSOMO X

IV.1.1. MAPEAMENTO DOS PONTOS DE QUEBRA

No Paciente 1, o exame cromossômico no nível de 550 bandas G não revelou alterações. O rearranjo cromossômico foi detectado por CGH-array: deleção do BAC RP1-54B20 [cariótipo 46,XY, del(X)(p11)]. No nível de resolução do CGH-array, o segmento deletado ficou restrito a aproximadamente 2 Mb. Esse resultado foi validado por FISH realizada em metáfases de sangue periférico da genitora do paciente, o que permitiu a comparação entre os sinais das sondas nos dois cromossomos X. O resultado indicou uma deleção parcial da sonda RP1-54B20 (Figura 3).

Os pontos de quebra foram então delimitados por FISH de segmentos do cromossomo X clonados em BAC (CHORI), mapeados em Xp11.23 (Figura 5).

O ponto de quebra distal ao centrômero foi localizado no BAC RP1-54B20 (Figura 3), parcialmente deletado, e o proximal, no BAC RP11-38O23 (Figura 4), também parcialmente deletado. Esses BAC estão mapeados em Xp11.23 e se sobrepõem parcialmente em 100 pb (Figuras 5 e 6).

Figura 3. FISH em metáfase da mãe do Paciente 1, mostrando a deleção parcial da sequência do BAC RP1-54B20 em um dos cromossomos X: a seta preenchida indica o sinal no cromossomo X normal e a seta vazia indica o cromossomo der(X) com sinal de hibridação relativamente mais fraco.

Figura 4. FISH em metáfase da mãe do Paciente 1, mostrando a deleção parcial da sequência do BAC RP11-38O23 em um dos cromossomos X: a seta preenchida indica o sinal no cromossomo X normal e a seta vazia indica o cromossomo der(X) com sinal de hibridação relativamente mais fraco.

Figura 5. Delimitação do segmento deletado no cromossomo X (NCBI, maio de 2007). À esquerda está um esquema do cromossomo X e a área em cinza representa a região abrangida pelas sondas utilizadas. Ao centro está o mapa da posição relativa dos BAC utilizados para delimitar os pontos de quebra; a régua indica a distância em Mb. À direita está o mapa dos genes e pseudogenes (em azul), contidos na sequência dos BAC parcialmente deletados (em vermelho); as setas indicam a direção das respectivas sequências no cromossomo e a régua, a distância em Kb.

Figura 6. Mapa do trecho do cromossomo X (Ensembl release 44) que corresponde à região clonada nos BAC RP1-54B20 e RP11-38O23 (*Human tilepath clones*), parcialmente deletados no Paciente 1. Acima está um esquema do cromossomo X, em que a linha vermelha vertical indica o trecho visualizado abaixo. Estão sendo mostrados: o comprimento da sequência (*Length*), a banda cromossômica (*Chr. X band*), o clone do CGH-array (*1mb cloneset*), os loci de microssatélites (*Markers*), os genes (*Ensembl Genes*, *EST Genes*, *Vega Havana Genes*), regiões relacionadas a casos clínicos que apresentam microrrearranjos (DECIPHER) e regiões descritas como variações de número de cópias (*RedonCNV regions*, *DGV* e *RedonCNV loci*).

O refinamento da localização dos pontos de quebra foi feito utilizando-se marcadores do tipo microssatélites. Seleccionamos inicialmente os *loci* DXS1267 (56 pb → 47726700-47726755 pb) e DXS6616 (117 pb → 47804519-47804635 pb), mapeados no segmento contido no BAC RP1-54B20 (Figura 6 e 9). O resultado mostrou que o Paciente 1 perdeu o *locus* DXS6616, mas manteve o DXS1267 em seu cromossomo X (Figura 7). Esse resultado permitiu localizar o ponto de quebra distal num segmento de aproximadamente 77,7 Kb.

Figura 7. Gel de agarose mostrando os produtos de *PCR multiplex* dos *loci* de microssatélites DXS6616 e DXS1267, mapeados no segmento clonado no BAC RP1-54B20 (parcialmente deletado no Paciente 1). A não amplificação do *locus* DXS6616 indica que se encontra deletado no paciente. A PCR não quantitativa não permite detectar a deleção na mãe do paciente, que possui um cromossomo X normal, além do deletado [der(X)].

Testamos um outro marcador do tipo microssatélite mapeado na região do ponto de quebra proximal (Figura 6), o DXS9833 (150 pb → 47906414-47906565 pb). Verificamos que está presente no Paciente 1 (Figura 8), o que nos permitiu delimitar o ponto de quebra proximal entre esse marcador e a porção distal do BAC RP11-38O23 (47861372pb), em um segmento de no máximo 45 Kb, contendo parte do gene *SSX6* e o *SPACA5B*.

No ponto de quebra distal, mostramos a integridade dos exons 4 e 6 do gene *ZNF182* [Vega Havana Genes – OTTHUMG00000021460] (Tabela II e Figura 8). Assim, o ponto de quebra distal foi situado entre a sequência final da parte traduzida do

exon 6 de *ZNF182* (47735972 pb) e o marcador DXS6616 (47804519 pb), num intervalo de 68547 pb, contendo parte dos genes *ZNF182* [Ensembl Genes – ENSG00000147118] e os genes *ZNF630* e *SPACA5*.

Tabela II. – Sequência dos *primers* utilizados para amplificar o exon 4 e a sequência final da parte traduzida do exon 6 do gene *ZNF182* [Vega Havana Genes – OTTHUMG00000021460].

Oligo	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento
Exon 4 - <i>Left Primer</i>	GAACCAGGAACCCAATCAGA	219 pb
Exon 4 - <i>Right Primer</i>	ACCCACAAAGACCAAGTTGC	
Exon 6 - <i>Left Primer</i>	ATGCACTGAGTGTGGCAAAG	160 pb
Exon 6 - <i>Right Primer</i>	TTTCTTTCCTGCATGGGTTC

Figura 8. Gel de agarose mostrando os produtos de PCR do exon 4 e da sequência final da parte traduzida do exon 6 do gene *ZNF182* [Vega Havana Genes – OTTHUMG00000021460 – mapeado no segmento clonado no BAC RP1-54B20] e do *locus* de microsatélite DXS9833, mapeado no clone RP11-38O23 (parcialmente deletado no Paciente 1).

O banco de dados NCBI, cuja última atualização do sequenciamento de referência do genoma humano foi em 31 de agosto de 2006, utiliza a plataforma *Build* 36.2, assim como o Ensembl. Entretanto, algumas informações contidas em cada um deles nem sempre são equivalentes. O Ensembl em sua versão 44, de abril de 2007,

apresenta uma interface de trabalho mais prática. Com isso, utilizamos o banco de dados Ensembl como referência para as análises a seguir.

A análise *in silico* da região dos pontos de quebra mostrou a presença de dois genes semelhantes, ambos codificadores de proteína, *SPACA5* e *SPACA5B* (anteriormente denominados de *PNPK6288* ou de *NP_995328.1* e considerados idênticos), um na sequência do clone RP1-54B20 e outro na do RP11-38O23 (Figura 6). Utilizando o aplicativo BLAST (NCBI) entre o gene *SPACA5* [ENSG00000171489], de 5393 pb (47748678-47754070 pb), e o gene *SPACA5B* [ENSG00000171478], de 1957 pb (47874983-47876939 pb), verificamos a existência de 99% de identidade de sequência, compreendendo todo o gene *SPACA5B* e a porção final do gene *SPACA5*, a partir de 3437 pb de seu início. Além disso, utilizando o BLAST para a verificação de similaridades entre os BAC RP1-54B20 e RP11-38O23, observamos que há uma região de 16453 pb (47748657-47765110 pb) em RP11-54B20 (Bloco A) em que há identidade com um bloco de 15847 pb (47871526-47887373 pb) em RP11-38O23 (Bloco B). Os únicos genes presentes nesses blocos são *SPACA5*, no bloco A, e *SPACA5B*, no bloco B. O BLAST entre essas duas regiões de aproximadamente 16 Kb dos dois clones mostra sequências ininterruptas de 282 a 5948 pb com mais de 95% de similaridade. A distância entre os genes *SPACA5* e *SPACA5B* é de 120913 pb e a distância entre os blocos de identidade A e B nos dois BAC é de 106416 pb (Figura 9).

Figura 9. Esquema do segmento do cromossomo X na região do rearranjo (Ensembl release 44). Os blocos vermelhos representam os genes *SPACA5* (clone RPI-54B20) e *SPACA5B* (clone RP11-38023) e os azuis representam as outras regiões de identidade entre os BAC parcialmente deletados no Paciente 1.

Em várias síndromes causadas por deleção/duplicação cromossômica, os segmentos genômicos afetados estão flanqueados por elementos repetidos de elevada homologia, estruturas que podem atuar como substrato de recombinação homóloga não alélica (Shaw e Lupski, 2004). Levando em consideração a identidade de sequência entre esses segmentos em que localizamos os pontos de quebra, nossa hipótese foi que uma recombinação homóloga não alélica entre eles tenha originado a deleção.

Elaboramos como estratégia para a detecção dos blocos de ~16 Kb de alta identidade um experimento de PCR que indicasse a presença ou não das extremidades dos blocos de repetição (Tabela III e Figura 10A). Para amplificar o início do bloco A, desenhamos um *left primer* cuja extremidade 5' está a 103 pb do início do bloco e um *right primer* com extremidade 3' a 178 pb após o início do bloco, o que gerava um fragmento de 281 pb. Para amplificar o início do bloco B, elaboramos um *left primer* que precede em 297 pb o início do bloco e o *right primer* utilizado foi o mesmo da reação de PCR anterior, o que gerava um fragmento de 475 pb. Para amplificar o fim do bloco A, elaboramos um *left primer* cuja extremidade 5' está a 26 pb do fim do bloco e um *right primer* com extremidade 3' a 373 pb após o fim do bloco, o que gerava um

fragmento de 399 pb. Para amplificar o fim do bloco B, utilizamos o mesmo *left primer* da reação anterior e um *right primer* com extremidade 3' a 184 pb após o fim do bloco, o que gerava um fragmento de 210 pb.

No paciente, não foram amplificadas as seqüências do início do bloco B e do fim do bloco A (Figura 10). Esses resultados são compatíveis com a participação dos blocos de alta similaridade de seqüência, que incluem os genes *SPACA5* e *SPACA5B*, na formação do rearranjo, pela recombinação homóloga não alélica.

Tabela III. *Primers* utilizados para a amplificação das extremidades dos blocos de alta identidade de seqüência (5'→3') e as respectivas posições em pb no cromossomo X das extremidades 5'.

INÍCIO DO BLOCO DISTAL	<i>LEFT PRIMER</i>	TTATGCAGAGGCAGGCACT	47748554
	<i>RIGHT PRIMER</i>	ACCCACCGTCCTTCAAAC	47748834
INÍCIO DO BLOCO PROXIMAL	<i>LEFT PRIMER</i>	GGGCGATCTTTAAACACATCA	47871229
	<i>RIGHT PRIMER</i>	ACCCACCGTCCTTCAAAC	47871703
FIM DO BLOCO DISTAL	<i>LEFT PRIMER</i>	CCTTTTTCGACCTTTATCC	47765007
	<i>RIGHT PRIMER</i>	TGCCAGCAAATACGTACAA	47765405
FIM DO BLOCO PROXIMAL	<i>LEFT PRIMER</i>	CCTTTTTCGACCTTTATCC	47887274
	<i>RIGHT PRIMER</i>	CCATGGTTTGAATGTCCTCA	47887483

Figura 10. (A) Esquema da região dos blocos de repetição A e B que contêm os genes *SPACA5* e *SPACA5B* (barras vermelhas) e as outras regiões de identidade (barras azuis) entre os BAC parcialmente deletados no Paciente 1. Os quadrados coloridos acima das barras representam os *primers* utilizados para a amplificação por PCR das extremidades dos blocos de repetição (os quadrados de mesma cor simbolizam o mesmo *primer*). O tamanho em pb dos produtos de PCR está representado em verde (seqüência amplificada tanto no paciente quanto em indivíduo controle) e vermelho (seqüência amplificada apenas em indivíduo controle). O SNP a 1189 pb do início de cada bloco e que os distingue está indicado. As barras negras representam os segmentos delimitados para os pontos de quebra. A posição de cada estrutura representada, inclusive a posição do SNP a 1189 pb do início dos dois blocos e que os distingue, é dada em pares de bases do cromossomo X (Ensembl *release* 44). (B) Amplificação das extremidades dos blocos A e B: gel de agarose, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR e o marcador de peso molecular de 50 pb; as canaletas indicadas pelas letras P, C e B correspondem a Paciente, Controle clinicamente normal e Branco, respectivamente. No paciente, não foram amplificadas as seqüências do início do bloco B (IP-P) e do fim do bloco A (FD-P).

Simultaneamente, estabelecemos colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Hans Bokhoven e da Dra. Dorien Lugtenberg, do Nijmegen Medical Centre, da Holanda, que também possui pacientes com o mesmo padrão de deleção, para a análise de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) ao longo dos blocos A e B. O grupo holandês estabeleceu as variantes exclusivas de cada bloco e, a partir daí, identificou aquelas que cada paciente possuía. Ficou demonstrado que o nosso paciente apresenta todos os polimorfismos estudados do bloco B e nenhum do bloco A.

O SNP mais distal estudado estava a 1189 pb do início dos blocos (nas posições 47749845 e 47872714 pb do cromossomo X – Figura 10A), no intron 1-2 (47748760-47752058 pb) de um dos transcritos [ENST00000304355] do gene *SPACA5*, estando apenas a variante do bloco B presente no paciente. O ponto de quebra proximal pôde ser localizado telomérico a esse SNP, entre ele e o *left primer*, que utilizamos para amplificar o início do bloco B, um segmento de 1486 pb. Quanto ao ponto de quebra distal, estando o SNP ausente, ele pôde ser localizado entre o *left primer* utilizado para amplificar o início do bloco A e o SNP, um segmento de 1292 pb. Os segmentos delimitados para a quebra contêm 1189 pb dos blocos de repetição, com 99% de identidade de sequência, entre parte do gene *SPACA5* no bloco A e a sequência do bloco B que precede o gene *SPACA5B*. Portanto, a recombinação homóloga entre esses segmentos pode ter originado a deleção. Dessa forma, o fragmento deletado teria aproximadamente 123 Kb de extensão.

IV.1.2. A DELEÇÃO E O QUADRO CLÍNICO

A relação mais simples que pode ser estabelecida entre uma deleção do cromossomo X e o quadro clínico no sexo masculino é que a ausência de genes na região deletada seja a causa do fenótipo. Há quatro genes mapeados na região delimitada para a deleção (figura 6): *SSX6*, *SPACA5*, *ZNF182* e *ZNF630*.

SSX6 [ENSG00000171483 ou OTTHUMG00000021464]

O gene *SSX6* (*Sarcoma, sinovial, X breakpoint 6*) faz parte da família de genes *SSX*, mapeados em Xp11. Como todos os genes *SSX*, contém 10 exons, dos quais oito (2 a 9) são transcritos. A proteína hipotética tem 188 aminoácidos e contém um domínio

KRAB (*KRuppel-Associated Box*), típico da família (Gure *et al.*, 2002). O mRNA foi detectado em linhagem celular de melanoma humano, mas em nenhum tecido normal examinado. Este gene não aparece, portanto, como um candidato para a deficiência mental.

***SPACA5* [LOC389852 – ENSG00000171489] e *SPACA5B* [LOC729201 – ENSG00000171478] (também denominados de *NP_995328.1* ou *PNPK6288*)**

Chen *et al.* (2006) identificaram cinco novas famílias de genes com expressão específica em testículos e mais de 98% de similaridade de sequência entre os membros das famílias, numa busca de aglomerados de transcritos de *loci* do cromossomo X, seguida da análise *in silico* do perfil de expressão dos genes. Os autores identificaram duas repetições diretas do gene *LOC389852* (*SPACA5*), em Xp11.23. O mRNA foi encontrado especialmente em testículo, mas também detectado em diversos tecidos somáticos, como cérebro, cólon, rim, pâncreas e próstata. A proteína de 159 aminoácidos tem atividade de lisozima, participa do catabolismo da parede celular e é encontrada no meio extracelular (NCBI – revisado em 30 de outubro de 2006).

O banco de dados Ensembl (*release* 44), entretanto, considera a existência de dois transcritos do gene *SPACA5* (*LOC389852*): um transcrito a partir de 5 exons, com extensão de 648 pb e traduzido numa proteína de 159 aminoácidos [ENST00000304355]; o outro transcrito a partir de 4 exons, com 571 pb e também traduzido numa proteína de 159 resíduos [ENST00000376940]. As duas proteínas têm identidade de 100% (BLAST, NCBI).

O gene *SPACA5B*, que não está deletado, é transcrito unicamente a partir de 4 exons, tem 595 pb e é traduzido em uma proteína de 159 aminoácidos [ENST00000304270]. O pareamento (BLAST, NCBI) dessa proteína com aquela produzida pelo *SPACA5* mostrou 99% de identidade, diferindo em um único aminoácido (assinalado abaixo em **negrito**):

SPACA5	1	MKAWGTVVVTLATLMVVTVD	AKIYE R CELAARLERAGLNGYKGYGVGDWLCMAHYESGFD	60
SPACA5B	1	MKAWGTVVVTLATLMVVTVD	AKIYE L CELAARLERAGLNGYKGYGVGDWLCMAHYESGFD	60
SPACA5	61	TAFVDHNP	DGSSEYGIFQLNSAWWCDNGITPTKNLCHMDCHDLLNRHILDDIRCAKQIVS	120
SPACA5B	61	TAFVDHNP	DGSSEYGIFQLNSAWWCDNGITPTKNLCHMDCHDLLNRHILDDIRCAKQIVS	120
SPACA5	121	SQNGLSAWTSWRLHCSGHD	LSEWLKGCDMHVKIDPKIHP	159
SPACA5B	121	SQNGLSAWTSWRLHCSGHD	LSEWLKGCDMHVKIDPKIHP	159

Conforme nossos resultados de mapeamento dos pontos de quebra (Figura 10), é provável que tenha ocorrido recombinação homóloga não alélica entre o gene *SPACA5* e o segmento de homologia que precede o gene *SPACA5B*, resultando na deleção. Assim o gene *SPACA5* estaria alterado pela recombinação. Um efeito clínico de um novo produto gênico poderia ocorrer, mas desconhecendo-se a função desse gene e havendo a possibilidade de complementação funcional pelo produto do gene *SPACA5B* não nos é possível ir além de considerar sua participação no fenótipo como uma possibilidade.

***ZNF630* (XP_033853.2) [OTTHUMG00000021463] e *ZNF182* [ENSG00000147118 ou OTTHUMG00000021460]**

A família protéica do tipo *zinc finger* (ZNF) [ENSF000000000001] está representada por 452 genes na espécie humana (Ensembl *release* 44). As proteínas variam na estrutura, mas possuem um domínio que requer um ou mais íons de zinco para estabilizar sua estrutura (UniProt). Ligam-se a ácidos nucleicos e desempenham funções diversas, sendo a principal a de regular a transcrição (Bellefroid *et al.*, 1991). Pelo menos três genes que codificam proteínas *zinc-finger*, *ZNF41* (MIM 314995), *ZNF81* (Kleefstra *et al.*, 2004) e *ZNF674* (Lugtenberg *et al.*, 2006) foram encontrados mutados em pacientes com retardo mental ligado ao X.

Os genes *ZNF630* e *ZNF182* codificam proteínas *zinc-finger* expressas principalmente no cérebro (GeneCard database).

O banco de dados Ensembl (*release* 44), entretanto, mostra quatro transcritos do gene *ZNF182* (Figura 11). O primeiro, NP_001007089.1 [ENST00000376943], com 3486 pb, é produto de 6 exons e gera uma proteína de 620 aminoácidos. O segundo, ZN630_HUMAN [ENST00000276054], é transcrito de 5 exons, tem 2561 pb e é traduzido numa proteína de 533 aminoácidos. É idêntico ao transcrito do gene *ZNF630*,

o ZNF630-001 [OTTHUMT00000056456]. O terceiro transcrito, ZN182_HUMAN [ENST00000305127], também descrito pelos bancos de dados UniProt e GeneCard database, é originado de 4 exons, tem 3227 pb e codifica para uma proteína de 639 resíduos. O quarto, ENST00000359880, proveniente de 3 exons, com 2082 pb e que produz uma proteína de 694 aminoácidos, é resultante da mais longa transcrição do gene *ZNF182*, pois inclui o gene *SPACA5* em um de seus introns e tem o primeiro exon do gene *ZNF630* como o seu último exon.

Figura 11. Mapa da região do cromossomo X que mostra os transcritos dos genes *ZNF182* (NP_001007089.1; ZN182_HUMAN; ENST00000359880; ZN630_HUMAN), *SPACA5* (NP_001073369.1 – Havana e Ensembl Protein Coding) e *ZNF630* (ZNF630-001 – idêntico ao ZN630_HUMAN) (Ensembl release 44).

Estando ausentes o gene *ZNF630* e parte do gene *ZNF182* (afetando o transcrito ENST00000359880), ambos são candidatos, contribuindo para a deficiência mental.

Entretanto, o segmento delimitado pelos pontos de quebra está contido numa região do cromossomo X em que ocorrem variações de número de cópias do DNA (Figura 6). Microduplicações polimórficas foram descritas em Xp11.23 (The Centre for Applied Genomics), assim como microdeleções (Redon *et al.*, 2006 – Figura 6). A microdeleção que descrevemos pode, assim, estar casualmente associada com o fenótipo na família que estudamos. Essa pode também ser a explicação para uma microdeleção

de 50kb, mais proximal ao centrômero em relação a que aqui descrevemos, que foi relatada por Froyen *et al.* (2007), em associação com deficiência mental. Ou para a microduplicação mais extensa, incluindo esse segmento deletado, também associada a deficiência mental, que foi descrita anteriormente por Bonnet *et al.* (2006).

Uma vez que a microdeleção que estudamos pode ser uma variante estrutural genômica sem efeito fenotípico, levamos em conta a possibilidade de que um gene ligado à deleção estivesse mutado, causando a deficiência mental na família. O gene *ZNF81* [ENSG00000197779] (47581245-47666554 pb), localizado *upstream* em relação à região deletada que delimitamos, ~32 Kb de distância (Figura 6), surgiu como o principal candidato, sendo o mais próximo à deleção e já tendo sido relacionado com deficiência mental. Kleefstra *et al.* (2004) mostraram que o ponto de quebra do cromossomo X de uma translocação, t(X;9)(p11.23;q34.3), em uma mulher com retardo mental grave, rompeu o gene *ZNF81* e o fundiu com um elemento *Alu* no cromossomo 9. A investigação de mutações nesse gene em mais de 300 famílias com indivíduos com retardo mental ligado a Xp11.2 revelou uma mutação 536G-A, que corresponde a uma substituição S179N, segregando com o retardo mental na família MXR45 descrita por Hamel *et al.* (1999). Essa mutação não foi detectada em 451 cromossomos X de indivíduos controle. O ponto de quebra no cromossomo 9 rompeu o gene *Eu-HMTase-1*, o que pode ter contribuído para algumas das características dismórficas da paciente portadora da translocação. Assim, Kleefstra *et al.* (2004) sugeriram que tal mutação no gene *ZNF81* pode ser causa de retardo mental não específico ligado ao X.

Os *primers* e condições de amplificação para a análise da região codificadora do gene *ZNF81* no Paciente 1 estão descritos no item Pacientes e Métodos (Pág. 18). O seqüenciamento não revelou qualquer alteração, nem mesmo variantes (Ensembl *release* 42).

Existe, é claro, a possibilidade de que uma mutação em outro gene qualquer do cromossomo X seja a causa do fenótipo, não tendo relação com a microdeleção.

Entretanto a relação entre microdeleções e microduplicações com fenótipos clínicos pode ser mais complexa. A literatura começa a registrar casos sugestivos de que certas alterações genômicas possam na verdade contribuir para uma susceptibilidade à doença e não serem determinísticas do fenótipo per se. É o caso da deleção de 200 Kb, em 1q21.1, detectada por Klopocki *et al.* (2007) em todos os 30 pacientes investigados com síndrome de TAR (trombocitopenia hipomegacariocítica e aplasia radial). A deleção não foi encontrada em 700 indivíduos controle, reforçando a interpretação da

relação causal com a doença. Entretanto, foi herdada em 75% dos casos, em sua maioria de genitores normais. Os dados levaram os autores a postularem que a síndrome está de fato relacionada à deleção, mas o fenótipo só se manifestaria na presença de alguma alteração adicional no genoma. Ullmann *et al.* (2007) identificaram uma duplicação de 1,5 Mb por CGH-array, flanqueada por LCR, em 16p13, em quatro homens autistas de três famílias não relacionadas, em alguns de seus parentes normais e afetados em graus variáveis. A deleção do mesmo intervalo foi detectada em outros três pacientes com deficiência mental e outras anomalias clínicas. Variações de número de cópias não haviam sido descritas para essa região e nem foram encontradas em mais de 600 indivíduos analisados. Com isso, os autores sugerem que essas alterações predisporiam ao autismo e à deficiência mental.

Assim, o estudo dos demais afetados em outros ramos da família, quanto ao quadro clínico e a presença da microdeleção, é imprescindível para avaliar todas essas possibilidades.

IV.2. DELEÇÃO DO CROMOSSOMO 8

IV.2.1. MAPEAMENTO DOS PONTOS DE QUEBRA

A Figura 12 mostra o cromossomo 8 com deleção parcial do braço curto, após bandamento GTG. O ponto de quebra foi mapeado em 8p23. Essa deleção foi detectada na Paciente 2 e em seu pai.

Figura 12. Par de cromossomos 8 da Paciente 2, após bandamento GTG. Observa-se a deleção parcial do braço curto, com o ponto de quebra mapeado em 8p23.

A hibridação da sonda subtelomérica de 8p (Vysis) mostrou que a região estava presente no cromossomo der(8) (Figura 13) e que, portanto, a deleção era intersticial.

Figura 13. As setas indicam a sonda subtelomérica de 8p (Vysis), que hibrida com os cromossomos 8 normal e deletado.

Os pontos de quebra foram delimitados por FISH de segmentos do cromossomo 8 clonados em BAC (CHORI) (Figura 16). O ponto de quebra distal pôde ser localizado

na sequência do BAC RP11-556O5 (8p23.1), que está parcialmente deletado no der(8) (Figura 14).

Figura 14. Ponto de quebra distal: a seta preenchida indica o sinal do BAC RP11-556O5 no cromossomo 8 normal e a seta vazia indica o cromossomo der(8) com sinal de hibridação relativamente mais fraco presente no der(8) (a sonda alfoíde específica marca os centrômeros).

O ponto de quebra proximal foi delimitado pelos BAC RP11-589N15 (11627380-11803128 pb – deletado) e RP11-481A20 (11778967-11929473 pb – não deletado) (Figura 15). Esses BAC localizam-se em 8p23.1 e se sobrepõem parcialmente em 24161 pb.

Figura 15. Limites do ponto de quebra proximal: (A) seta preenchida indica o sinal do BAC RP11-589N15 no cromossomo 8 normal e a seta vazia indica o cromossomo der(8) sem sinal de hibridação; (B) o BAC RP11-481A20 hibridou nos dois cromossomos do par 8; a sonda alfoíde específica marca os centrômeros. A porção distal desse BAC sobrepõe-se com a porção proximal do BAC RP11-589N15.

Estando os BAC do ponto de quebra proximal superpostos, um produzindo sinal e o outro não, o ponto de quebra deve estar localizado na sequência de um deles, não produzindo alteração detectável pela hibridação dos BAC: existe a possibilidade da presença de um pequeno segmento do BAC deletado e de pequena deleção do BAC presente, que não alterem os sinais de hibridação.

A partir da delimitação por FISH dos pontos de quebra, distantes cerca de 3,9 Mb, em 8p23.1, realizamos análises *in silico* dos segmentos envolvidos. Utilizamos o aplicativo BLAST, disponibilizado pelo banco de dados NCBI, para investigar segmentos de homologia entre as sequências dos BAC que contêm os pontos de quebra. No alinhamento entre os BAC RP11-556O5 (ponto de quebra distal) e RP11-481A20 (ponto de quebra proximal), verificamos a existência de pelo menos duas grandes regiões de homologia entre as sequências: uma apresenta 4506 pb com 90% de identidade e a outra 2160 pb com 89% de identidade. Essas duas regiões (Figura 17) são constituídas por sequências de retrovírus endógenos humanos (HERV) do grupo E: HERVE.

Analisando os clones de forma mais aprofundada (Figura 18), observamos que, na sequência do BAC RP11-556O5, existe um grande HERVE, de 7826 pb (8067193-8075019pb), que, para distingui-lo dos demais, denominamos de HERVE(A). No BAC RP11-481A20 existem dois blocos de HERVE, um de 2158 pb e outro de 4508 pb. Entretanto, esses dois blocos apresentam dois HERVE cada. O primeiro possui um HERVE(B) de 1094bp (11802035-11803128pb) e um HERVE(C) de 1171pb (11807037-11808207pb). O segundo apresenta um HERVE(D) de 668bp (11827952-11828619pb) e um HERVE(E) de 2159bp (11828629-11830787pb). Além de HERVE, o BAC RP11-481A20 também contém sequências de receptores olfativos (OR) e de defensinas (DEF), que, assim como os HERV, podem favorecer a recombinação homóloga não alélica. Entretanto, não há OR e nem DEF na sequência do BAC RP11-556O5 (Figura 25).

Figura 16. Delimitação do segmento do cromossomo 8 deletado. À esquerda, está um esquema do cromossomo 8 e a área em cinza representa a região em que estão mapeadas as sondas utilizadas. À direita, está o mapa da posição relativa dos BAC utilizados para delimitar os pontos de quebra (NCBI, junho de 2006). A régua indica a distância em Mb.

Nossa hipótese foi que a deleção tivesse resultado da recombinação entre dois desses segmentos de HERVE, com a perda do material intersticial. Para testar essa hipótese, foi planejado um experimento de *Southern blotting*, com a intenção de detectar o fragmento de junção resultante do rearranjo.

Com o auxílio do aplicativo pDRAW32 1.0 Revision 1.1.88 (www.acaclone.com), foi selecionada como adequada a enzima *Afl* II, cujos sítios de corte não envolvem os HERVE (Figura 19). Dessa forma, como resultado do rearranjo, esperava-se ter quatro possíveis fragmentos. Se a NAHR ocorreu entre HERVE(A) e HERVE(B), o fragmento teria 13043 pb. Caso tenha sido entre HERVE(A) e HERVE(C), teria 9643 pb. Se foi entre HERVE(A) e HERVE(D), teria 15403 pb. Mas se foi entre HERVE(A) e HERVE(E), teria 10843 pb.

Como todas as possibilidades envolvem o HERVE(A), foi necessário construir uma sonda que o identificasse, levando em consideração que a enzima *Afl* II gera um fragmento de 15847 pb, que contém HERVE(A), no cromossomo 8 normal. Para a construção da sonda por PCR, identificamos inicialmente um segmento de 1134 pb do cromossomo 8, em que, de acordo com o Ensembl (*release* 32), não há seqüências repetitivas. Esse segmento está contido no clone RP11-556O5 (8009046-8212456 pb) e estende-se de 50414 pb até 51548 pb nesse BAC, ou seja, no intervalo 8059460-8060594 pb do cromossomo 8. Considerando que o corte da enzima *Afl* II ocorre em 8059570 pb, o intervalo para a escolha da seqüência da sonda ficou restrito a um segmento de 1024 pb, entre 8059570 e 8060594 pb, telomericamente a HERV(A). O par de *primers* utilizado (Tabela IV) para a construção da sonda amplifica um produto de 654 pb.

Nesse experimento, não obtivemos resultado que permitisse uma conclusão: não foi possível distinguir qualquer um dos fragmentos que pudesse representar o de junção (13043, 9643, 15403 ou 10843 pb), distinguível do fragmento normal (15847 pb). Entretanto, existe a possibilidade de que o fragmento de junção seja o de 15403 pb, não sendo, no experimento, distinguível do fragmento normal de 15847 pb (banda de ~16 Kb da Figura 20). Se este for o caso, o evento de recombinação na origem da deleção teria ocorrido entre o HERVE(A) e o HERVE(D). Assim, o segmento deletado teria ~3,75 Mb, em 8p23.1.

Figura 18. – Esquema representando o alinhamento das seqüências de HERVE (Ensembl *release* 39) e o resultado do BLAST (NCBI) entre HERVE(A) e os demais, indicando o grau de similaridade entre as seqüências.

Figura 19. – Esquema representando os sítios de corte da enzima *Afl* II entre as seqüências de HERVE, com suas posições dadas em pb do cromossomo 8 (Ensembl *release* 39).

Tabela IV. – Sequência dos *primers* utilizados na construção da sonda.

Oligo	Sequência (5'→3')
<i>Left Primer</i>	AGTGACTCCTCAGCGGAAAA
<i>Right Primer</i>	CTGGGCCATAACCATTGAC

Figura 20. *Southern Blot*: a sonda marcada com [α^{32} P]-dATP detectou um fragmento ~16 kb, tanto no paciente como nos controles. Os demais fragmentos devem representar outros fragmentos genômicos com homologia com a sonda.

Analizamos também a deleção utilizando um *tilepath array* genômico do cromossomo 8 (1371 clones de BAC), construído no Nijmegen Medical Centre, Holanda. Esse conjunto representa em média uma sonda a cada 100 Kb, cobrindo toda a extensão do cromossomo 8, que tem 146,27 Mb. Os procedimentos de hibridação foram realizados pela Dra. Ana Cristina Krepischi-Santos, pesquisadora do CNPq no LGH. As metodologias de marcação, hibridação e análise foram descritas por de Vries *et al.* (2005). O experimento demonstrou que a deleção é contínua, porém indicou ser maior do que havia sido delimitada por FISH, compreendendo ~5,7 Mb (Tabela V).

Tabela V. Correspondência entre os resultados obtidos na análise da deleção 8p por *tilepath array* genômico do cromossomo 8 e os resultados obtidos por FISH.

Array-CGH		FISH
Clone	Resultado	Resultados
RP11-485I5	Normal	
RP11-231L4	Ponto de quebra	
RP11-447A6	del	
RP11-738O21	del	
RP11-594D21	del	
RP11-743F19	del	
RP11-739E3	del	
RP11-115E11	del	
RP11-556O5	del	Ponto de quebra
RP11-435L12	del	
RP11-1G6	del	
RP11-443C23	del	
RP11-54G22	del	
RP11-19J4	del	
RP11-18L2	del	
RP11-215M9	del	
RP11-495C9	del	
RP11-776B5	del	
RP11-341D4	del	
RP11-143J23	del	
RP11-796J3	del	
CTD-2339A14	del	
RP11-320C22	del	
RP11-797C19	del	
RP11-732H23	del	
RP11-369G24	del	
RP11-112G9	del	
RP11-654E3	del	
RP11-423K3	del	
RP11-593D5	del	
RP11-177H2	del	
RP11-787E6	del	
RP11-318F18	del	
RP11-437P14	del	
RP11-448A20	del	
RP11-582P18	del	
RP11-802F15	del	
RP11-433O12	del	
RP11-794G6	del	(= RP11-80B8) del
RP11-367E11	del	(= RP11-481A20) ponto de quebra
RP11-350L10	del	
RP11-351I21	del	
RP11-419I17	del	Presente
CTD-2185F10	del	
RP11-801I21	del	
RP11-683E21	Ponto de quebra	
RP11-813L8	Ponto de quebra	
RP11-561J23	Normal	

Considerando o princípio das duas técnicas e que os segmentos discrepantes podem constituir variantes genômicas, realizamos FISH de sondas mapeadas nos segmentos discordantes (RP11-287P18, RP11-556O5, RP11-481A20, RP11-1236K1 e RP11-419I17 – Figura 16) em metáfases de indivíduos com cariótipos normais. Verificamos a ocorrência: (A) de hibridação cruzada [hibridação em outros *loci* genômicos, incluindo a região de receptores olfativos no braço curto do cromossomo 4, que participa na translocação t(4;8)(p16;p23)], e (B) de diferença quanto ao número de cópias das seqüências entre homólogos, evidenciada por diferenças entre a intensidade dos sinais de hibridação (Figuras 21, 22 e 23).

Assim, as diferenças entre os resultados do *microarray* e da FISH podem ser explicadas por terem sido apontadas como deletadas seqüências que apenas devem estar presentes em menor número de cópias na Paciente 2, mas dentro da variabilidade populacional.

Figura 21. FISH da sonda RP11-1236K1 em metáfase de indivíduo controle, mostrando sinais de hibridação tanto no cromossomo 8 como no 4, além de diferença na intensidade dos sinais de hibridação entre os cromossomos homólogos.

Figura 22. FISH das sondas RP11-287P18 e RP11-419I17 em metáfases e núcleos interfásicos de indivíduo controle, mostrando sinais de hibridação cruzada e variações na intensidade dos sinais de hibridação entre cromossomos homólogos.

Figura 23. FISH das sondas RP11-481A20 e RP11-556O5 em metáfases de indivíduo controle, mostrando sinais de hibridação cruzada e variação na intensidade dos sinais de hibridação entre cromossomos homólogos.

IV.2.2. A ORIGEM PARENTAL DA DELEÇÃO

Determinamos a origem parental da deleção, analisando o *locus* D8S550, mapeado no segmento deletado (Pacientes e Métodos, Pág. 17), no pai da paciente e em seus avós paternos. Verificamos que o avô paterno é homozigoto (alelos de 215 pb); a avó paterna é heterozigota (alelos de 197 e 211 pb) e o pai da paciente apresenta apenas um alelo de 215 pb, herdado de seu pai, demonstrando que a deleção é de origem materna (Figura 24).

Alguns estudos demonstraram que a maioria dos casos de rearranjos em 8p tem origem na meiose materna, sejam inversões, duplicações, deleções e translocações (Florida *et al.*, 1996; Giglio *et al.*, 2001; revisão em Shaw e Lupski, 2004).

IV.2.3. OS POLIMORFISMOS E A FORMAÇÃO DOS REARRANJOS DO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 8

Em 1996, Florida *et al.* estudaram 16 casos de duplicação invertida do braço curto do cromossomo 8 [inv dup(8p)]. A fim de identificar os segmentos duplicados, os autores utilizaram FISH, análise de polimorfismos de DNA por PCR e análise quantitativa por *Southern blotting*. Os rearranjos ocorreram sempre entre cromossomos homólogos e os pontos de quebra na extremidade distal do braço curto do cromossomo 8 foram localizados nos mesmos segmentos cromossômicos. Os autores sugeriram a presença, nesses segmentos, de seqüências repetidas com orientação invertida, cujo emparelhamento na meiose favoreceria a ocorrência de recombinação, levando à formação de dicêntricos. Quebras centroméricas originariam os cromossomos 8 com duplicação invertida.

Atualmente, sabe-se que 8p23.1 é uma região cromossômica especialmente rica em elementos repetidos que freqüentemente participam de rearranjos. Aí ocorrem duas regiões de repetição de receptores olfativos (ORR), distantes 5cM uma da outra, como também aglomerados de genes anti-microbiais de beta-defensinas (DEF). Esses genes (*DEFB4*, *DEFB103* e *DEFB104*) são polimórficos quanto ao número de cópias, podendo um cromossomo ter uma a oito cópias (Hollox *et al.*, 2003).

Um em cada quatro indivíduos da população geral é portador de uma inversão polimórfica do segmento entre as duas ORR (revisão em Hollox *et al.*, 2003). Essa inversão polimórfica, que não é possível ser identificada na análise cromossômica convencional, estaria relacionada com a formação de duplicações invertidas de 8p (como aquelas descritas por Floridia *et al.*, 1996), por deleções de 8p (Devriendt *et al.*, 1999; Pehlivan *et al.*, 1999) por marcadores supra-numerários [+der(8)(8p23.1-pter)], por duplicação intersticial de 8p23 e pela translocação t(4;8)(p16;p23) (revisão em Giglio *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003).

Giglio *et al.* (2001) estudaram uma del(8p) cujo ponto de quebra distal localiza-se próximo ao marcador D8S1706 (6928157-6928525 pb), que está mais distal do que o ponto de quebra do caso do presente estudo, que localizamos no clone RP11-556O5 (8009071-8212432 pb). Já o ponto de quebra proximal foi identificado por Giglio *et al.* (2001) próximo ao *locus* D8S1130 (11871345-11871658 pb), que, de acordo com o banco de dados da UCSC, está contido no clone RP11-481A20 (11779087-11929409 pb), no ponto de quebra proximal da deleção de nosso estudo. Giglio *et al.* (2001) sugeriram que os aglomerados de genes de receptores olfativos (OR) podem ter servido de substrato para a formação dos rearranjos em 8p estudados em seu trabalho e nos de outros estudos também. Entretanto, não fizeram uma análise molecular detalhada que definisse exatamente os pontos de quebra em relação a esses genes.

Para caracterizar a inversão polimórfica em 8p23, Sugawara *et al.* (2003) construíram um mapa físico, baseado em BAC e PAC, que cobriu os 4,7 Mb da inversão e suas regiões flangeadoras. Identificaram uma LCR em cada ponto de quebra: a distal, de ~1,3 Mb, entre os clones CTB-415D8 (atualmente não encontrado nos bancos de dados como estando no cromossomo 8) e RP11-556O5; a outra, proximal, de ~0.4 Mb, entre os clones RP11-351I21 e RP11-303G3 – 12233358-12611672 pb. Os autores compararam esses dois blocos e verificaram elevada similaridade de sequência, com uma complexa configuração, em que fragmentos apresentam orientações direta e invertida (Figura 25).

Ciccone *et al.* (2006) descreveram um mosaico 46,XX,psu dic(8)(p23.2)/46,XX,del(8)(p23.1), em que as duas linhagens celulares ocorriam com frequências de 60% e 40%, respectivamente; a peculiaridade é que a deleção compreendia duas regiões não contíguas, como resultado de uma inversão polimórfica de 8p. A clássica

inversão polimórfica do braço curto do cromossomo 8 foi identificada no pai da paciente por FISH dos clones RP11-399J23 e RP11-589N15. A análise de microssatélites mostrou a ausência de alelos paternos na região deletada na paciente e permitiu concluir que as alterações nas duas linhagens celulares se originaram de um mesmo cromossomo 8 paterno, formando-se inicialmente um cromossomo dicêntrico. Por CGH-array, os autores demonstraram também que a região distal de 8p estava deletada em ambas as linhagens. Por FISH, definiram os pontos de quebra no cromossomo dicêntrico e no cromossomo com a deleção terminal. O pseudodicêntrico apresentava deletada a região do telômero ao clone RP11-1K11 (4,7 Mb; o ponto de quebra não coincide com os dois aglomerados de OR em 8p23.1), enquanto o resto do cromossomo estava duplicado. Com relação à linhagem del(8p), uma das regiões deletadas (6,7 Mb) estendia-se do telômero ao clone RP11-5E15, enquanto que o segmento entre os clones RP11-399J23 (não deletado) e RP11-62H7 estava presente; a outra deleção no mesmo cromossomo localizava-se entre RP11-429B7 e RP11-589N15 (deletado), enquanto o resto do cromossomo não mostrou alteração, do clone RP11-813L8 até 8q-ter.

A deleção que estudamos tem aproximadamente 3,9 Mb, pois o ponto de quebra distal está localizado na sequência de RP11-556O5 (8009046-8212456 pb) e o proximal está provavelmente no segmento de superposição dos clones RP11-589N15 e RP11-481A20 (11778967-11803128 pb). Portanto, os pontos de quebra da deleção estão contidos na região polimórfica da inversão definida por Sugawara *et al.* (2003). Quanto à deleção del(8p), que Ciccone *et al.* (2006) relacionaram à inversão polimórfica envolvendo blocos de OR, o ponto de quebra da deleção distal e o ponto de quebra proximal da deleção proximal não estão mapeados de forma precisa, mas existe a possibilidade de estarem nos mesmos clones em que localizamos os pontos de quebra na Paciente 2.

A análise *in silico* dos segmentos envolvidos na deleção que estudamos nos permitiu verificar a existência de segmentos de homologia entre as sequências dos BAC que contêm os pontos de quebra proximal e distal (Figura 25). Esses segmentos são constituídos por sequências de retrovírus endógenos humanos (HERV) do grupo E: HERVE. Na sequência do BAC RP11-556O5 (parcialmente deletado) existe um grande HERVE de 7826pb, e no BAC RP11-481A20 (presente) existem dois blocos que contêm HERVE, um de 2158pb e outro de 4508pb. Além de HERVE, o BAC RP11-481A20

também apresenta seqüências de regiões de receptores olfativos (ORR) e defensinas (DEF). Entretanto, não há ORR e nem DEF na seqüência do BAC RP11-556O5.

Os HERV representam rastros de infecções retrovirais em células germinativas ancestrais, constituindo de 1 a 8% do genoma humano. Inserções e deleções de retrovírus podem mudar não só a estrutura dos genes e, conseqüentemente, de seus produtos, mas também sua regulação. Além disso, eles podem afetar a estabilidade do genoma pela introdução de *hotspots* recombinantes (revisão em Sverdlov, 2000; Hughes e Coffin, 2001). A alta homologia que detectamos entre as HERV que estão mapeadas nos pontos de quebra da deleção que estudamos sugere que essas seqüências tenham servido de substrato para recombinação, originando o rearranjo.

Levando em consideração o estudo de Floridia *et al.* (1996), em que é demonstrado que as inv dup(8p) têm origem na meiose materna, Giglio *et al.* (2001) investigaram a inversão polimórfica em 8p em oito mães de pacientes com inv dup(8p) e em uma mãe de paciente com +der(8p). Foram realizadas FISH em cromossomos metafásicos de todas elas, com duas sondas (GS173o4 e GS257o3) que limitam as regiões dos blocos de repetição, demonstrando que a região estava invertida em um dos homólogos de todas elas. Entretanto, só puderam verificar a origem materna do rearranjo em um dos pacientes. A mesma inversão submicroscópica foi encontrada em heterozigose em 19 (26%) de 72 indivíduos controle descendentes de europeus (frequência alélica de 13%). Os autores sugeriram que a inversão em heterozigose geraria susceptibilidade aos rearranjos em 8p.

Com a intenção de estimar a proporção da inversão polimórfica em 8p23 na população normal japonesa, Sugawara *et al.* (2003) realizaram FISH de dois clones localizados dentro da inversão, RP11-399J23 e RP11-589N15, em 50 pessoas, revelando 28 homozigotos quanto ao cromossomo 8 sem inversão, 17 heterozigotos e cinco homozigotos quanto à inversão. Assim, a frequência do alelo invertido nessa amostra da população japonesa é de 27%.

Nossa paciente herdou a deleção de seu pai e essa deleção se originou num cromossomo materno. Realizamos FISH de dois clones mapeados dentro da região de inversão, RP11-211C9 (distal) e RP11-80B8 (proximal), e detectamos a inversão em homozigose não somente na avó da paciente, mas também em seu avô e em um indivíduo controle; num segundo indivíduo controle, a inversão estava em heterozigose (Figura 26).

Como o segmento invertido inclui os blocos de HERVE, a orientação entre eles não fica alterada. Pela análise *in silico*, não conseguimos visualizar o mecanismo pelo qual a inversão pudesse colocar os HERVE em mesmo sentido de orientação e levar à perda de quase 4 Mb por recombinação não alélica entre eles. Os HERVE que participariam da recombinação continuam em sentidos opostos mesmo nos cromossomos com a inversão. Nossa análise também não identificou outras seqüências que indicassem que a homozigose quanto à inversão pudesse favorecer a ocorrência da deleção. Emanuel *et al.* (2001) propuseram um modelo para a formação de deleção que considera o pareamento de seqüências invertidas num mesmo cromossomo, formando uma alça de segmentos não pareados, que gera a perda do trecho contido nela. Esse pode ter sido o mecanismo de formação da deleção em nossa paciente, em que os HERV contidos nas seqüências dos pontos de quebra serviriam de substrato para o pareamento intracromossômico e a formação da alça correspondente ao segmento deletado.

O fato de termos analisado quatro indivíduos não consangüíneos, não japoneses e encontrado três homozigotos quanto à inversão e um heterozigoto nos chamou a atenção, pois a freqüência esperada de homozigotos na população descendente de europeus é de 1,7% (Giglio *et al.*, 2001). Apesar dos desvios que uma amostra pequena pode trazer, validamos esses resultados, usando outra combinação de clones: RP11-589N15 (proximal) e RP11-399J23 (distal), ambos contidos na região da deleção (Figura 27), confirmando os resultados anteriores. Achamos que é interessante aumentar o tamanho amostral para verificar se a tendência continua, como uma característica de nossa população.

Figura 24. Determinação da origem materna da deleção por meio da análise do *locus* de microssatélite D8S550, mapeado no segmento deletado. O pai da paciente, também portador da deleção, possui um único alelo de 215 pb, herdado de seu pai, que tem cariótipo normal.

Figura 25. Mapa da região do cromossomo 8 em que estão mapeados os clones que contém os pontos de quebra da del(8) (RP11-556O5 e RP11-589N15/RP11-481A20). As cabeças de seta indicam a orientação das seqüências de receptores olfativos (pretas), de defensinas (brancas) e de HERVE (vermelhas). As barras verticais listradas representam as regiões definidas por Sugawara *et al.* (2003) como locais de quebra que originam a inversão polimórfica. A régua indica a distância em Kb (Ensembl, release 44).

Figura 26. FISH das sondas RP11-80B8 (proximal; vermelha) e RP11- 211C9 (distal; verde) em metáfases (A) da avó paterna da Paciente 2, (B) do avô paterno, (C) do indivíduo Controle 1 e (D) do indivíduo Controle 2. Os resultados mostram que a inversão está em homozigose em A, B e C e em heterozigose em D.

Figura 27. FISH das sondas RP11-589N15 (proximal; vermelha) e RP11-399J23 (distal; verde) em metáfases (A) da avó paterna da Paciente 2, (B) do avô paterno e (C) de um indivíduo controle não portador da inversão. Confirmamos a presença da inversão em homozigose nos avós paternos da Paciente 2.

IV.2.4. O QUADRO CLÍNICO DE DELEÇÕES DO BRAÇO CURTO DO CROMOSSOMO 8

Anormalidades do braço curto do cromossomo 8 estão associadas a um quadro clínico de atraso de desenvolvimento e malformações congênitas (revisão em Engelen *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1998; Yenamandra *et al.*, 1999). A Tabela VI mostra as características clínicas de pacientes com deleções parciais do braço curto do cromossomo 8. O quadro caracteriza-se por retardo de crescimento, microcefalia, defeitos cardiovasculares, retardo mental leve, comprometimento importante da fala, hiperatividade e comportamento impulsivo. A gravidade da deficiência mental e a ocorrência de microcefalia parecem estar relacionadas à extensão da deleção.

O comportamento característico, com hiperatividade de manifestação precoce e comportamento impulsivo descritos por Fryns *et al.* (1989), Claeys *et al.* (1997) e Devriendt *et al.* (1999), também foi diagnosticado na Paciente 2. Nossa paciente, entretanto, nunca apresentou convulsões, uma característica descrita em alguns afetados pela síndrome de del(8p) relatada por esses autores.

Os defeitos cardíacos congênitos (CHD) mais frequentes nos portadores da deleção são os de septo atrioventricular (AVSD), mas outros podem ser encontrados. A associação consistente de AVSD com a deleção distal de 8p indica que a região 8p23 contém gene(s) que está(ão) envolvido(s) no desenvolvimento cardíaco (revisão em Devriendt *et al.*, 1999; Pierpont *et al.*, 2000).

Uma revisão das anomalias cromossômicas em pacientes com CHD sugere que 8p23.1 é uma região crítica. Por meio de FISH e da análise de marcadores, a região crítica associada à AVSD foi localizada em um segmento de 5-cM flanqueado por D8S1706 e WI-8327 distalmente e D8S1825 na região proximal. O gene *GATA4*, que codifica um fator de transcrição do tipo *zinc finger*, relacionado com desenvolvimento cardíaco, está localizado em 8p23.1. Tanto deleções quanto duplicações invertidas em 8p23.1 têm sido vistas em pacientes com defeitos cardíacos. Essas alterações incluem canal atrioventricular (AV), defeitos de septos atrial e ventricular (ASD, VSD), ventrículo direito com dupla saída (DORV – *double outlet right ventricle*), dextrocardia, estenose pulmonar (OS) e hipoplasia da parte esquerda do coração (revisão em Pehlivan *et al.*, 1999; Pierpont *et al.*, 2000).

O estudo de Devriendt *et al.* (1999) abrangeu pacientes com del(8p), em que a extensão das deleções foi determinada pela combinação da citogenética clássica, FISH e análise de marcadores polimórficos de DNA. Com exceção de uma grande deleção terminal, todas as deleções eram intersticiais. Em cinco pacientes, uma mesma deleção de ~6Mb foi encontrada. Um paciente sem defeito cardíaco ou microcefalia, mas com deficiência mental leve e comportamento característico tinha uma deleção menor, contida no intervalo de cerca de 6Mb. Dois pacientes sem defeitos cardíacos tinham deleções intersticiais mais proximais, que não tinham sobreposição com a região de aproximadamente 6Mb. Essas informações levaram os autores a definir regiões críticas para microcefalia e problemas cardíacos (HDCR8p), correspondendo ao segmento de 6Mb. Os autores mostraram que o gene *GATA4* estava deletado em todos os seus pacientes com defeito cardíaco e, conseqüentemente, era um candidato a estar relacionado com CHD. Interessantemente, o ortólogo do gene humano *GATA4* está envolvido na morfogênese cardíaca no camundongo.

Pehlivan *et al.* (1999) investigaram a ocorrência de deleção *GATA4* em cinco pacientes com deleção intersticial de 8p23.1, por meio de FISH. Quatro indivíduos que apresentavam CHD tinham deleção de *GATA4* em heterozigose. O gene *GATA4* não estava deletado em um quinto paciente que não tinha anomalias cardíacas. Por outro lado, análise por FISH de 48 indivíduos com CHD e cariótipos normais não detectou deleções crípticas de *GATA4*. Esses dados indicam que a deleção do gene *GATA4* está relacionada com a presença de CHD nos portadores de deleções intersticiais em 8p23.1.

Garg *et al.* (2003) mostraram, em uma grande genealogia, ligação entre defeitos de septo cardíaco e a região 8p22-23. Uma mutação sem sentido (G296S) em *GATA4* foi encontrada em heterozigose em todos afetados da família, mas não nos indivíduos controle. Essa mutação resulta na diminuição da afinidade de ligação ao DNA e da atividade transcricional de Gata4. Além disso, a mutação anulou uma interação física entre Gata4 e TBX5, uma proteína cuja alteração é responsável por um subconjunto de defeitos de septo cardíaco que aparecem associados a outros sinais clínicos. Em uma segunda família, Garg *et al.* (2003) identificaram uma mutação em *GATA4* (E359del), que é inativa transcricionalmente e que segregou com defeitos de septo cardíaco. Esses resultados

indicam a alteração de *GATA4* como uma causa genética de defeitos de septo cardíaco humanos, talvez através da interação com *TBX5*.

Os dois pacientes do estudo de Devriendt *et al.* (1999) portadores de deleções menores de 8p23.1, mas contidas no intervalo de cerca de 6Mb que abrange a região crítica para microcefalia e problemas cardíacos, embora não apresentassem essas duas malformações, tinham o fenótipo comportamental. Essa observação sugere que as alterações comportamentais estejam associadas a uma sub-região desse segmento de 6Mb, definida pelo paciente portador da menor deleção. Uma vez que esse paciente também tinha um discreto atraso de desenvolvimento, essa sub-região também pode conter um ou mais *loci* que contribuem para o desenvolvimento. Ainda não se sabe se o fenótipo comportamental e o atraso de desenvolvimento são causados pela haploinsuficiência do(s) mesmo(s) gene(s).

A deleção da Paciente 2, de cerca de 4Mb, está contida no segmento de cerca de 6Mb descrito por Devriendt *et al.* (1999) como a região crítica associada a microcefalia e a defeito de septo átrio-ventricular (AVSD). Ela possui múltiplas anomalias congênitas que são características da síndrome de del(8p), como microcefalia, retardo mental e de crescimento, hiperatividade e malformação cardíaca. A haploinsuficiência do gene *GATA4* deve ser responsável pela comunicação inter-atrial que apresentava e que foi corrigida cirurgicamente. O quadro clínico do genitor da paciente é claramente semelhante ao dela. Ele tem deficiência mental, não tendo conseguido alfabetizar-se e era hiperativo quando criança, segundo relato de sua genitora. Nele, entretanto, não foi diagnosticado defeito cardíaco, indicando a expressividade variável da deleção do gene *GATA4*.

Tabela VI. Características clínicas dos pacientes com deleção em 8p.

Referência	Caso / Idade	Deleção / Técnica	Características
Pehlivan <i>et al.</i> (1999)	Paciente 1 ♀ 12 anos	del(8)(p23.1→p23.2) Bandas GTG, FISH	Estatura entre 50-75º percentil, peso no 10º percentil e perímetro cefálico <5º percentil. Leve retardo cognitivo. Palato alto e arqueado, baixa implantação posterior de cabelo, bochechas proeminentes, unhas hipoplásicas, leve lordose e sinostose radio-ulnar. Calcificação dos gânglios basais, pâncreas atrofiado. Convulsões. Hipoglicemia, hipotireoidismo hipotalâmico, sintomas sugestivos de enteropatia devida a intolerância a gluten/lactose. Anormalidade cardíaca congênita (haploinsuficiente para o gene <i>GATA4</i>): ASD, PVS.
	Paciente 2 ♂ 12 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH	Estatura no 10º percentil, peso no 25º percentil e perímetro cefálico <2º percentil. Atraso na aquisição da fala, com distúrbio de articulação. Habilidade motora normal. Fácies peculiar, depressão bitemporal, ponte nasal proeminente e leve micrognatia. Anormalidade cardíaca congênita (haploinsuficiente para o gene <i>GATA4</i>): VSD, ASDII.
	Paciente 3 ♀ 10 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH	Estatura no 25º percentil, peso no 25º percentil e perímetro cefálico no 50º percentil. Atraso na fala e leve retardo mental. Fácies peculiar, palato alto e arqueado, mal implantação dentária, micrognatia. Esotropia intermitente. Escoliose. Anormalidade cardíaca congênita (haploinsuficiente para o gene <i>GATA4</i>): TOF, AVC.
	Paciente 4 ♀ 27 anos	del(8)(p23.1→p23.2) Bandas GTG, FISH	Leve retardo mental, atraso de desenvolvimento. Escoliose. Anormalidade cardíaca congênita (haploinsuficiente para o gene <i>GATA4</i>): ASDII, PVS, defeito da válvula mitral.
	Paciente 5 ♀ 9 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH	Estatura no 10º percentil, peso no 20º percentil e perímetro cefálico 2 desvios abaixo da média. Prematuridade. Atraso de desenvolvimento, dispraxia. Fácies peculiar, distância intercantaral iterna <3º percentil, palato alto e arqueado. Não apresenta anormalidade cardíaca, é normal quanto ao gene <i>GATA4</i> .
Devriendt <i>et al.</i> (1999)	Paciente 1 ♂ Prenatal	del(8)(p21.3→pter) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura, peso <10º e perímetro cefálico no 3º percentil. Atraso de desenvolvimento. Anormalidade cardíaca: AVSD, DORV, HRV, PVS, isomerização à esquerda. Hipospádia. Falecido.
	Paciente 2 ♂ 11 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura entre 10-25º percentil, peso <10º percentil e perímetro cefálico no 3º percentil. Leve retardo mental. Anormalidade cardíaca: AVSD, PVS, HRV, AVS, continuação da veia ázigos, isomerização à esquerda. Distúrbio comportamental. Epilepsia. Criptorquidismo e malrotação do intestino.
	Paciente 3 ♀ 8 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura e peso <10º percentil e perímetro cefálico no 3º percentil. Leve retardo mental. Anormalidade cardíaca: ASDII, PVS. Distúrbio comportamental. Fala hipernasal.
	Paciente 4 ♂ 6 meses	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura no 10º percentil e perímetro cefálico no 3º percentil. Atraso de desenvolvimento. Anormalidade cardíaca: AVSD, HRV, DILV, PVS. Falecido.
	Paciente 5 ♂ 17 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura e peso <10º percentil e perímetro cefálico no 3º percentil. Leve retardo mental. Atraso na fala. Desenvolvimento motor normal. Anormalidade cardíaca: ASDII, PVS. Distúrbio comportamental. Estreitamento do conduto auditivo externo (surdez condutiva).
	Paciente 6 ♂ 4 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Peso <10º percentil e perímetro cefálico entre 3-10º percentil. Anormalidade cardíaca: ASDII, PVS. Atraso de desenvolvimento neuro-motor. Distúrbio comportamental.
	Paciente 7 ♂ 9 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura >97º percentil, peso entre 25-50º percentil e perímetro cefálico entre 25-50º percentil. Leve retardo mental. Distúrbio comportamental. Epilepsia. Criptorquidismo.
	Paciente 8 ♂ Neonato	del(8)(p22) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura e peso entre 10-25º percentil e perímetro cefálico no 3º percentil. Atraso de desenvolvimento. Dismorfismo facial.
	Paciente 9 ♂ 6 meses	del(8)(p12→p22) Bandas GTG, FISH, microsatélite	Estatura no 50º percentil, peso no 25º percentil e perímetro cefálico no 3º percentil. Atraso de desenvolvimento. Dismorfismo facial. Criptorquidismo, hérnia inguinal.
Presente estudo	Paciente 1 ♀ 6 anos	del(8)(p23.1) Bandas GTG, FISH	Estatura no 25º percentil, peso no 25º percentil e perímetro cefálico <3º percentil. Nariz aquilino, palato alto e estreito, desvio de septo nasal, orelhas em abano com hipoplasia de cartilagem. Clinodactilia bilateral do 5º dedo. Hipermetropia. Anormalidade cardíaca Comunicação inter-atrial.. Dificuldade motora e de aprendizado. Hiperatividade. Atividade irritativa difusa no hemisfério cerebral direito; nunca teve convulsões.

Siglas: ASD (defeito do septo atrial), VSD (defeito do septo ventricular), AVSD (defeito de septo atrioventricular), ASDII (defeito de septo atrial tipo ostium secundum), TOF (tetralogia de Fallot), PVS (estenose da válvula pulmonar), HRV (ventrículo direito hipoplásico), AVS (estenose da válvula aórtica), DORV (ventrículo direito com dupla saída), DILV (ventrículo direito com dupla entrada).

V. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

As alterações cromossômicas estruturais associadas a fenótipos clínicos oferecem a oportunidade de identificação de genes cujas mutações possam estar determinando essas patologias, tendo em vista a possibilidade de que esses genes podem ter sido alterados pelas quebras ou ter o número de cópias modificado. Um número cada vez maior de evidências aponta para a participação de certas seqüências do genoma na formação de rearranjos cromossômicos recorrentes e não recorrentes. Neste trabalho, estudamos duas deleções cromossômicas detectadas em indivíduos com retardo mental associado a sinais clínicos. O objetivo foi determinar que mecanismos originaram esses rearranjos e como a perda ou quebra dos segmentos cromossômicos está relacionada com o fenótipo dos portadores. A caracterização das seqüências nos pontos de quebra e junção desses rearranjos é fundamental para a compreensão dos mecanismos de formação das alterações cromossômicas. A delimitação precisa dos segmentos deletados é necessária para a correlação com o quadro clínico. Para isso, este trabalho aliou o estudo cromossômico por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) à análise do DNA.

Deleção do braço curto do cromossomo X

O Paciente 1, com quadro de deficiência mental síndrômica, tem uma deleção no braço curto do cromossomo X, não detectável no exame cromossômico após bandamento G (550 bandas). A del(X)(p11) foi diagnosticada pelo *screening* genômico por hibridação genômica comparativa (CGH-array). A deficiência mental está presente na família seguindo um padrão de herança ligada ao X recessiva. A deleção foi detectada num tio materno do paciente, portador de quadro clínico semelhante, e em heterozigose nas genitoras dos pacientes.

Delimitamos os pontos das quebras cromossômicas que originaram a deleção, por meio de FISH de segmentos clonados em BAC: situam-se em Xp11.23, na seqüência dos clones adjacentes RP1-54B20 e RP11-38O23, parcialmente deletados e que se sobrepõem em apenas 100 pb. A genotipagem de microssatélites na região delimitada contribuiu para detalhar o mapeamento dos pontos de quebra da deleção.

A análise *in silico* dos segmentos que contêm os pontos de quebra mostrou que nos dois clones (RP1-54B20 e RP11-38O23) há um segmento de ~16Kb, com identidade superior a 95%, distantes 106Kb um do outro. No bloco A, região de ~16 Kb da sequência do clone RP1-54B20, há um único gene, o *SPACA5*. No bloco B, região de ~16 Kb da sequência do clone RP11-38O23, há um único gene, o *SPACA5B*.

Por meio de PCR, determinamos a presença do início do Bloco A e do final do Bloco B, além da ausência do final do Bloco A e do início do Bloco B. A análise de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) característicos de cada bloco mostrou que o paciente apresenta todos os polimorfismos estudados do Bloco B e nenhum do A. O SNP mais distal estudado estava a 1189 pb do início dos blocos, no intron 1-2 de um dos transcritos do gene *SPACA5*, estando apenas a variante do Bloco B presente no paciente. Assim, o ponto de quebra proximal pôde ser localizado em um segmento de 1486 pb, enquanto que o ponto de quebra distal pôde ser localizado em um segmento de 1292 pb. Os segmentos delimitados para a quebra contêm 1189 pb dos blocos de repetição, com 99% de identidade de sequência no gene *SPACA5* e na sequência do bloco proximal que precede o gene *SPACA5B*. A recombinação homóloga não alélica entre essas sequências similares pode, portanto, ter sido o mecanismo que originou a deleção. Há quatro genes candidatos mapeados na região delimitada para a deleção: *SSX6*, *SPACA5*, *ZNF182* e *ZNF630*. *SSX6* não aparece com candidato para a deficiência mental, pois se expressa apenas em linhagens tumorais. É provável que o gene *SPACA5* tenha sofrido recombinação não alélica com a sequência que precede o gene *SPACA5B*. Um efeito clínico de um novo produto gênico poderia ocorrer, mas desconhecendo-se a função desse gene e havendo a possibilidade de complementação funcional pelo produto do gene *SPACA5B* não nos é possível ir além de considerar sua participação no fenótipo como uma possibilidade. Estando ausentes o gene *ZNF630* e parte do gene *ZNF182* (afetando o transcrito ENST00000359880), ambos são candidatos, contribuindo para a deficiência mental, pois são expressos no cérebro e alguns representantes da família gênica já foram relacionados à deficiência mental.

No segmento em que a deleção está localizada, se conhecem variações de número de cópias em indivíduos clinicamente normais, o que torna complexa a relação dessa deleção com o fenótipo. Como em outras situações semelhantes, é possível que o fenótipo clínico dependa da associação da deleção com outra alteração genética. Uma associação

casual não pode ser descartada. Diante disso, testamos a possibilidade de que a deficiência mental na família pudesse ser causada por mutação em gene não deletado co-segregando com a deleção: não detectamos alterações na região codificadora do gene *ZNF81*, já relacionado à deficiência mental e mapeado a ~32 Kb a 5' da deleção.

Deleção do braço curto do cromossomo 8

A Paciente 2 tem uma deleção no braço curto do cromossomo 8 [cariótipo 46,XX, del(8)(p23)], que foi diagnosticada na análise cromossômica por bandamento GTG. Essa deleção está presente em seu pai, com quadro clínico semelhante. Os avós paternos da paciente têm cariótipos normais, sendo homozigóticos quanto a uma inversão de segmento que contém a deleção dos afetados e que é considerada polimórfica. Pela análise do *locus* de microssatélite D8S550 no pai e nos avós paternos da paciente, verificamos que a deleção ocorreu em um dos cromossomos 8 da avó. Os pontos das quebras cromossômicas que originaram a deleção foram mapeados usando-se FISH de segmentos clonados em BAC, delimitando-se um segmento deletado de cerca de 3,9 Mb, em 8p23.1. A análise *in silico* dos pontos de quebra mostrou a presença de seqüências de retrovírus endógenos humanos (HERV) do grupo E, com identidade de aproximadamente 90% nos segmentos dos pontos das quebras distal e proximal. Essas seqüências de identidade estão orientadas em sentidos opostos nas duas regiões dos pontos de quebra independentemente de estarem ou não em cromossomos portadores da inversão polimórfica. Nossa análise não identificou seqüências que indicassem que a homozigose quanto à inversão pudesse favorecer a ocorrência da deleção. A deleção pode ter sido gerada pelo pareamento intracromossômico entre duas dessas HERVE.

VI. ABSTRACT

Structural chromosomal alterations related to clinical phenotypes bring the opportunity to identify gene mutations determining the pathologies, because the causative genes may have been disrupted by the breaks or may have an altered number of copies. The delimitation of the segments involved in the chromosomal rearrangements is necessary for these genotype-phenotype correlations. The characterization of breakpoint and junction sequences in these chromosome alterations enables the identification of mechanisms originating them, and evidence has been produced pointing to the participation of particular genomic sequences in their formation. In this work, we studied two chromosomal deletions in patients with syndromic mental retardation, combining chromosomal analysis by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to DNA analysis. Our aim was to determine the mechanisms that originated these aberrations and how they were involved with the clinical phenotypes.

Patient 1, a boy with syndromic mental retardation, carried a microdeletion on the short arm of the X chromosome [46,XY,del(X)(p11)] that was detected by comparative genome hybridization (CGH-array). Mental retardation in his family had an X-linked recessive pattern of inheritance. The deletion was detected in a maternal uncle of the proband, who was similarly affected, and in heterozygosis in the patients' mothers. We delimited the deletion breakpoints by FISH of BAC clones: the deletion was mapped to adjacent BACs, which were partially deleted. Microsatellite genotyping contributed to refining breakpoint mapping. *In silico* analysis showed that the breakpoint-containing segments shared ~16 Kb sequences with more than 95% identity, which were 106 Kb apart from each other. With the collaboration of researchers from the Nijmegen Medical Centre, The Netherlands, the presence and absence of segments from the two blocks could be further identified by SNPs. The proximal breakpoint could be mapped to a 1486 bp segment, and the distal breakpoint to a 1292 bp segment, which shared 1189 bp of the repetition block, with 99% sequence identity. This segment includes the *SPACA5* gene and the sequence immediately upstream of the *SPACA5B* gene. Non-allelic homologous recombination (NAHR) between these sequences could have given rise to the deletion. Four genes map to the deleted segment: *SSX6*, *SPACA5*, *ZNF182* e *ZNF630*. However, this region has been

described as including copy number variants, thus raising the possibility of a casual association of the deletion with the clinical phenotype. Alternatively a complex causative association may be present, as for example the dependence on another genetic alteration for the clinical manifestation.

Patient 2, a syndromic mentally retarded girl, carried a deletion on the short arm of chromosome 8 [46,XX, del(8)(p23)], which was diagnosed by GTG chromosome banding analysis. This deletion was inherited from her father, who presented with similar clinical features. Both paternal grandparents of the probanda had normal karyotypes, and microsatellite genotyping indicated that the deletion occurred on a grandmother's chromosome. The chromosomal breakpoints were mapped by FISH of BAC clones, which delimited the deleted segment to ~ 3.9 Mb, in 8p23.1. Using a chromosome 8 tilepath microarray, the deletion was shown to be continuous. *In silico* analysis revealed the presence of human endogenous retrovirus (HERV) sequences of E group, with ~90% identity in the proximal and distal breakpoint segments. These sequences were in opposite directions in the breakpoint regions, and their intrachromosomal pairing may have led to the deletion. By FISH analysis, the paternal grandparents were shown to be homozygous for a cryptic polymorphic inversion that included the deleted segment. We could not identify segments with high identity that had their direction changed by the inversion thus facilitating NAHR and the production of a ~3.9 Mb deletion.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonini, S.; Kim, C. H.; Sugayama, S. M.; Vianna-Morgante, A. M. – Delimitation of duplicated segments and identification of their parental origin in two partial chromosome 3p duplications. **Am J Med Genet** **113(2)**: 144-150, 2002.

Bailey, J.A.; Yavor, A.M.; Massa, H.F.; Trask, B.J.; Eichler, E.E. – Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. **Genome Res** **11(6)**: 1005-1017, 2001.

Bellefroid, E.J.; Poncelet, D.A.; Lecocq, P.J.; Revelant, O.; Martial, J.A. – The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **88(9)**: 3608-12, 1991.

Bonnet, C.; Gregoire, M.J.; Brochet, K.; Raffo, E.; Leheup, B.; Jonveaux, P. – Pure de-novo 5 Mb duplication at Xp11.22-p11.23 in a male: phenotypic and molecular characterization. **J Hum Genet.**; **51(9)**: 815-21, 2006.

Brooks, S.S.; Genovese, M.; Gu, H.; Duncan, C.J.; Shanske, A.; Jenkins, E.C. – Normal Adaptative Function With Learning Disability in Duplication 8p Including Band p22. **Am J Med Genet** **78(2)**: 114-117, 1998.

Chen, Y.-T.; Iseli, C.; Venditti, C.A.; Old, L.J.; Simpson, A.J.G.; Jongeneel, C.V. – Identification of a new cancer/testis gene family, CT47, among expressed multicopy genes on the human X chromosome. **Genes Chromosomes Cancer** **45(4)**: 392-400, 2006.

Ciccone, R.; Giorda, R.; Gregato, G.; Guerrini, R.; Giglio, S.; Carrozzo, R.; Bonaglia, M.C.; Priolo, E.; Laganà, C.; Tenconi, R.; Rocchi, M.; Pramparo, T.; Zuffardi, O.; Rossi, E. – Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists?. **Hum Genet.** **117(6)**: 571-82, 2005.

Ciccone, R.; Mattina, T.; Giorda, R.; Bonaglia, M.C.; Rocchi, M.; Pramparo, T.; Zuffardi, O. – Inversion polymorphisms and non-contiguous terminal deletions: the cause and the (unpredicted) effect of our genome architecture. **J Med Genet.** **43(5)**:e19, 2006.

Claeys, I.; Holvoet, M.; Eyskens, B.; Adriaenssens, P.; Gewillig, M.; Fryns, J.P.; Devriendt, K. – A recognisable behavioural phenotype associated with terminal deletions of the short arm of chromosome 8. **Am J Med Genet** **74(5)**: 515-520, 1997.

de Vries, B.B.; Pfundt, R.; Leisink, M.; Koolen, D.A.; Vissers, L.E.; Janssen, I.M.; Reijmersdal, S.; Nillesen, W.M.; Huys, E.H.; Leeuw, N.; Smeets, D.; Sistermans, E.A.; Feuth, T.; van Ravenswaaij-Arts, C.M.; van Kessel, A.G.; Schoenmakers, E.F.; Brunner, H.G.; Veltman, J.A. – Diagnostic genome profiling in mental retardation. **Am J Hum Genet.** **77(4)**: 606-16, 2005.

Devriendt, K.; Matthijs, G.; Van Dael, R.; Gewillig, M.; Eyskens, B.; Hjalgrim, H.; Dolmer, B.; McGaughan, J.; Brøndum-Nielsen, K.; Marynen, P.; Fryns, J.P.; Vermeesch, J.R. – Delineation of the Critical Deletion Region for Congenital Heart Defects, on Chromosome 8p23.1. **Am J Hum Genet** **64(4)**: 1119-1126, 1999.

Emanuel, B.S.; Shaikh, T.H. – Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. **Nat Rev Genet.** **2(10)**: 791-800, 2001.

Endris, V.; Wogatzky, B.; Leimer, U.; Bartsch, D.; Zatyka, M.; Latif, F.; Maher, E.R.; Tariverdian, G.; Kirsch, S.; Karch, D.; Rappold, G.A. – The novel Rho-GTPase activating gene *MEGAP/srGAP3* has a putative role in severe mental retardation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **99(18)**: 11754-11759, 2002.

Engelen, J.J.M.; de Die-Smulders, C.E.M.; Sijstermans, J.M.J.; Meers, L.E.C.; Albrechts, J.C.M.; Hamers, A.J.H. – Familial partial trisomy 8p without dysmorphic features and only mild mental retardation. **J Med Genet** **32(10)**: 792-795, 1995.

Floridia, G.; Piantanida, M.; Minelli, A.; Dellavecchia, C.; Bonaglia, C.; Rossi, E.; Gimelli, G.; Croci, G.; Franchi, F.; Gilgenkrantz, S.; Grammatico, P.; Dalpra, L.; Wood, S.; Danesino, C.; Zuffardi, O. - The same molecular mechanism at the maternal meiosis I produces mono- and dicentric 8p duplications. **Am J Hum Genet.** **58(4)**: 785-796, 1996.

Froyen, G.; Bauters, M.; Boyle, J.; Van Esch, H.; Govaerts, K.; van Bokhoven, H.; Ropers, H.H.; Moraine, C.; Chelly, J.; Fryns, J.P.; Marynen, P.; Gecz, J.; Turner, G. – Loss of SLC38A5 and

FTSJ1 at Xp11.23 in three brothers with non-syndromic mental retardation due to a microdeletion in an unstable genomic region. **Hum Genet.** **121(5):** 539-47, 2007.

Fryns, J.P.; Kleczkowska, A.; Vogels, A.; Van Den Berghe, H. – Normal phenotype and slight mental retardation in de novo distal 8p deletion (8pter→8p23.1:). **Ann Génét** **32(3):** 171-173, 1989.

Garg, V.; Kathiriyai, I.S.; Barnes, R.; Schluterman, M.K.; King, I.N.; Butler, C.A.; Rothrock, C.R.; Eapen, R.S.; Hirayama-Yamada, K.; Joo, K.; Matsuoka, R.; Cohen, J.C.; Srivastava, D. – GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. **Nature** **424(6947):** 443-447, 2003.

Giglio, S.; Broman, K.W.; Matsumoto, N.; Calvari, V.; Gimelli, G.; Neumann, T.; Ohashi, H.; Voullaire, L.; Larissa, D.; Giorda, R.; Weber, J.L.; Ledbetter, D.H.; Zuffardi, O. – Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. **Am J Hum Genet.** **68(4):** 874-83, 2001.

Gotter, A.L.; Nimmakayalu, M.A.; Jalali, G.R.; Hacker, A.M.; Vorstman, J.; Conforto Duffy, D.; Medne, L.; Emanuel, B.S. – A palindrome-driven complex rearrangement of 22q11.2 and 8q24.1 elucidated using novel technologies. **Genome Res.** **17(4):** 470-81, 2007.

Gribble, S.M.; Prigmore, E.; Burford, D.C.; Porter, K.M.; Bee Ling Ng; Douglas, E.J.; Fiegler, H.; Carr, P.; Kalaitzopoulos, D.; Clegg, S.; Sandstrom, R.; Temple, I.K.; Youings, S.A.; Thomas, N.S.; Dennis, N.R.; Jacobs, P.A.; Crolla, J.A.; Carter, N.P. – The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. **J Med Genet.** **42(1):** 8-16, 2005.

Güre, A.O.; Wei, I.J.; Old, L.J.; Chen, Y.T. – The SSX gene family: characterization of 9 complete genes. **Int J Cancer.** **101(5):** 448-53, 2002.

Haber, J. E. - Partners and pathways repairing a double-strand break. **Trends Genet.** **16(6):** 259-64, 2000.

Hamel, B.C.J.; Smits, A.P.T.; van den Helm, B.; Smeets, D.F.C. M.; Knoers, N.V.A.M.; van Roosmalen, T.; Thoonen, G. H. J.; Assman-Hulsmans, C. F. C. H.; Ropers, H.-H.; Mariman, E. C.

M.; Kremer, H. – Four families (MRX43, MRX44, MRX45, MRX52) with nonspecific X-linked mental retardation: clinical and psychometric data and results of linkage analysis. **Am J Med Genet.** **85(3)**: 290-304, 1999.

Hollox, E.J.; Armour, J.A.; Barber, J.C. – Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. **Am J Hum Genet** **73(3)**: 591-600, 2003.

Hughes, J.F.; Coffin, J.M. – Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. **Nat Genet** **29(4)**: 487-489, 2001.

Jacobs, P.A.; Hassold, T.J. – Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. **Human Genetics: Proceedings of the 7th International Congress**: 234-244, 1986.

Kleefstra, T.; Yntema, H.G.; Oudakker, A.R.; Banning, M.J.G.; Kalscheuer, V.M.; Chelly, J.; Moraine, C.; Ropers, H.-H.; Fryns, J.-P.; Janssen, I.M.; Sistermans, E.A.; Nillesen, W.N.; de Vries, L.B.A.; Hamel, B.C.J.; van Bokhoven, H. – Zinc finger 81 (ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation. (Letter) **J. Med. Genet.** **41(5)**: 394-399, 2004.

Klopocki, E.; Schulze, H.; Strauss, G.; Ott, C.E.; Hall, J.; Trotier, F.; Fleischhauer, S.; Greenhalgh, L.; Newbury-Ecob, R.A.; Neumann, L.M.; Habenicht, R.; König, R.; Seemanova, E.; Megarbane, A.; Ropers, H.H.; Ullmann, R.; Horn, D.; Mundlos, S. – Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. **Am J Hum Genet.** **80(2)**: 232-40, 2007.

Knijnenburg, J.; Szuhai, K.; Giltay, J.; Molenaar, L.; Sloos, W.; Poot, M.; Tanke, H.J.; Rosenberg, C. – Insights from genomic microarrays into structural chromosome rearrangements. **Am J Med Genet** **132A(1)**: 36-40, 2005.

Koolen, D.A.; Vissers, L.E.; Pfundt, R.; de Leeuw, N.; Knight, S.J.; Regan, R.; Kooy, R.F.; Reyniers, E.; Romano, C.; Fichera, M.; Schinzel, A.; Baumer, A.; Anderlid, B.M.; Schoumans, J.; Knoers, N.V.; van Kessel, A.G.; Sistermans, E.A.; Veltman, J.A.; Brunner, H.G.; de Vries, B.B. – A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. **Nat Genet.** **38(9)**: 999-1001, 2006.

Krepischi-Santos, A.C.; Vianna-Morgante, A.M. – Disclosing the mechanisms of origin of *de novo* short-arm duplications of chromosome 9. **Am J Med Genet A**. **117(1)**: 41-6, 2003.

Krepischi-Santos, A.C.; Vianna-Morgante, A.M.; Jehee, F.S.; Passos-Bueno, M.R.; Knijnenburg, J.; Szuhai, K.; Sloos, W.; Mazzeu, J.F.; Kok, F.; Cheroki, C.; Otto, P.A.; Mingroni-Netto, R.C.; Varela, M.; Koiffmann, C.; Kim, C.A.; Bertola, D.R.; Pearson, P.L.; Rosenberg, C. – Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. **Cytogenet Genome Res**. **115(3-4)**: 254-61, 2006.

Lugtenberg, D, Yntema, H.G, Banning MJ, Oudakker AR, Firth HV, Willatt L, Raynaud M, Kleefstra T, Fryns JP, Ropers HH, Chelly J, Moraine C, Gecz J, Reeuwijk J, Nabuurs SB, de Vries BB, Hamel BC, de Brouwer AP, Bokhoven H. – ZNF674: A New Kruppel-Associated Box-Containing Zinc-Finger Gene Involved in Nonsyndromic X-Linked Mental Retardation. **Am J Hum Genet**. **78(2)**: 265-78, 2006.

Lukacsovich, T; Waldman, A.S. – Suppression of intrachromosomal gene conversion in mammalian cells by small degrees of sequence divergence. **Genetics** **151(4)**: 1559-1568, 1999.

Lupski, J.R. – Genome structural variation and sporadic disease traits. **Nat Genet**. **38(9)**: 974-6. 2006.

Lupski, J.R. – Genomic disorders: recombination-based disease resulting from genome architecture. **Am J Hum Genet** **72(2)**: 246-252, 2003.

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

Moustacchi, E. – DNA damage and repair: consequences on dose-responses. **Mutation Res**. **464(1)**: 35-40, 2000.

Pehlivan, T.; Pober, B.R.; Brueckner, M.; Garrett, S.; Slauch, R.; Rheeden, R.V.; Wilson, D.B.; Watson, M.S.; Hing, A. – *GATA4* haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. **Am J Hum Genet** **83(3)**: 201-206, 1999.

Petek, E.; Windpassinger, C.; Vincent, J.B.; Cheung, J.; Boright, A.P.; Scherer, S.W.; Kroisel, P.M.; Wagner, K. – Disruption of a novel gene (*IMMP2L*) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome. **Am J Hum Genet.** **68(4)**: 848-858, 2001.

Pierpont, M.E.; Markwald, R.R.; Lin, A.E. – Genetic aspects of atrioventricular septal defects. **Am J Med Genet** **97(4)**: 289-296, 2000.

Redon, R.; Ishikawa, S.; Fitch, K.R.; Feuk, L.; Perry, G.H.; Andrews, T.D.; Fiegler, H.; Shapero, M.H.; Carson, A.R.; Chen, W.; Cho, E.K.; Dallaire, S.; Freeman, J.L.; Gonzalez, J.R.; Gratacos, M.; Huang, J.; Kalaitzopoulos, D.; Komura, D.; Macdonald, J.R.; Marshall, C.R.; Mei, R.; Montgomery, L.; Nishimura, K.; Okamura, K.; Shen, F.; Somerville, M.J.; Tchinda, J.; Valsesia, A.; Woodwark, C.; Yang, F.; Zhang, J.; Zerjal, T.; Zhang, J.; Armengol, L.; Conrad, D.F.; Estivill, X.; Tyler-Smith, C.; Carter, N.P.; Aburatani, H.; Lee, C.; Jones, K.W.; Scherer, S.W.; Hurles, M.E. – Global variation in copy number in the human genome. **Nature.** **444(7118)**: 444-54, 2006.

Robinson, S.W.; Morris, C.D.; Goldmuntz, E.; Reller, M.D.; Jones, M.A.; Steiner, R.D.; Maslen, C.L. – Missense mutations in *CRELD1* are associated with cardiac atrioventricular septal defects. **Am J Hum Genet** **72(4)**: 1047-1052, 2003.

Rosenberg, C.; Knijnenburg, J.; Bakker, E.; Vianna-Morgante, A.M.; Sloos, W.; Otto, P.A.; Kriek, M.; Hansson, K.; Krepisch-Santos, A.C.; Fiegler, H.; Carter, N.P.; Bijlsma, E.K.; van Haeringen, A.; Szuhai, K.; Tanke, H.J. – 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(2)**: 180-6, 2006.

Rosenberg, C.; Knijnenburg, J.; Clauffailla Mde, L.; Brunoni, D.; Catelani, A.L.; Sloos, W.; Szuhai, K.; Tanke, H.J. – Array CGH detection of a cryptic deletion in a complex chromosome rearrangement. **Hum Genet.** **116(5)**: 390-4, 2005.

Shaffer, L.G.; Lupski, J.R. – Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. **Annu Rev Genet.** **34**: 297-329, 2000.

Shaikh, T.H.; Kurahashi, H.; Emanuel, B.S. – Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. **Genet Med.** **3(1)**: 6-13, 2001.

Sharp, A.J.; Hansen, S.; Selzer, R.R.; Cheng, Z.; Regan, R.; Hurst, J.A.; Stewart, H.; Price, S.M.; Blair, E.; Hennekam, R.C.; Fitzpatrick, C.A.; Segraves, R.; Richmond, T.A.; Guiver, C.; Albertson, D.G.; Pinkel, D.; Eis, P.S.; Schwartz, S.; Knight, S.J.; Eichler, E.E. – Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. **Nat Genet.** **38(9)**: 1038-42, 2006.

Sharp, A.J.; Locke, D.P.; McGrath, S.D.; Cheng, Z.; Bailey, J.A.; Vallente, R.U.; Pertz, L.M.; Clark, R.A.; Schwartz, S.; Segraves, R.; Oseroff, V.V.; Albertson, D.G.; Pinkel, D.; Eichler, E.E. – Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. **Am J Hum Genet.** **77(1)**: 78-88, 2005.

Shaw, C.J.; Lupski, J.R. – Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. **Hum Mol Genet.** **13, Rev Issue 1**: R57-64, 2004.

Shaw, C.J.; Withers, M.A.; Lupski, J.R. – Uncommon deletions of the Smith-Magenis syndrome region can be recurrent when alternate low-copy repeats act as homologous recombination substrates. **Am J Hum Genet.** **75(1)**: 75-81, 2004.

Shaw-Smith, C.; Pittman, A.M.; Willatt, L.; Martin, H.; Rickman, L.; Gribble, S.; Curley, R.; Cumming, S.; Dunn, C.; Kalaitzopoulos, D.; Porter, K.; Prigmore, E.; Krepischi-Santos, A.C.; Varela, M.C.; Koiffmann, C.P.; Lees, A.J.; Rosenberg, C.; Firth, H.V.; de Silva, R.; Carter, N.P. – Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. **Nat Genet.** **38(9)**: 1032-7, 2006.

Stankiewicz, P.; Lupski, J.R. Genome Architecture, rearrangements and genomic disorders. **Trends Genet** **18(2)**: 74-82, 2002.

Stankiewicz, P.; Shaw, C.J.; Dapper, J.D.; Wakui, K.; Shaffer, L.G.; Withers, M.; Elizondo, L.; Park, S.S.; Lupski, J.R. – Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. **Am J Hum Genet.** **72(5)**: 1101-1116, 2003.

Strout, M.P.; Marcucci, G.; Bloomfield, C.D.; Caligiuri, M.A. – The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A.** **95(5):** 2390-5, 1998.

Sugawara, H.; Harada, N.; Ida, T.; Ishida, T.; Ledbetter, D.H.; Yoshiura, K.; Ohta, T.; Kishino, T.; Niikawa, N.; Matsumoto, N. – Complex low-copy repeats associated with a common polymorphic inversion at human chromosome 8p23. **Genomics.** **82(2):** 238-44, 2003.

Sverdlov, E.D. – Retroviruses and primate evolution. **Bioessays.** **22(2):** 161-71. Review. 2000.

Ullmann, R.; Turner, G.; Kirchhoff, M.; Chen, W.; Tonge, B.; Rosenberg, C.; Field, M.; Vianna-Morgante, A.M.; Christie, L.; Krepischi-Santos, A.C.; Banna, L.; Brereton, A.V.; Hill, A.; Bisgaard, A.M.; Müller, I.; Hultschig, C.; Erdogan, F.; Wieczorek, G.; Ropers, H.H. – Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. **Hum Mutat.** **28(7):** 674-682, 2007.

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(2):** 329-336, 1995.

Varela, M.C.; Krepischi-Santos, A.C.; Paz, J.A.; Knijnenburg, J.; Szuhai, K.; Rosenberg, C.; Koiffmann, C.P. – A 17q21.31 microdeletion encompassing the MAPT gene in a mentally impaired patient. **Cytogenet Genome Res.** **114(1):** 89-92, 2006.

Vianna-Morgante, A.M.; Kerkis, I.E.; Krepischi-Santos, A.C.V. – 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.

Wong, K.K.; deLeeuw, R.J.; Dosanjh, N.S.; Kimm, L.R.; Cheng, Z.; Horsman, D.E.; MacAulay, C.; Ng, R.T.; Brown, C.J.; Eichler, E.E.; Lam, W.L. – A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. **Am J Hum Genet.** **80(1):** 91-104, 2007.

Yenamandra, A.; Perrone, R.; McLaughlin, J.; Mehta, L. – Inverted Duplication/Deletion of Chromosome 8p: Mild Clinical Phenotype. **Am J Med Genet** **82(1)**: 91-93, 1999.

BANCOS DE DADOS ELETRÔNICOS E OUTROS RECURSOS DA INTERNET

CHORI (Children's Hospital Oakland Research Institute)

<http://www.chori.org>

Database of Genomic Variants (atualizado em 11 de outubro de 2006)

<http://projects.tcag.ca/variation/>

Ensembl

<http://www.ensembl.org>

GeneCard database

www.genecards.org

Genome Database (GDB)

<http://gdbwww.gdb.org>

IDT

<http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>

Mammalian Genotyping Service (The National Heart, Lung, and Blood Institute)

<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/home/index.asp>

NCBI (National Center for Biotechnology Information)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Primer3

<http://frodo.wi.mit.edu/>

The Centre for Applied Genomics (build 36, March 2006)

<http://www.projects.tcag.ca/variation/>

UCSC (University of California – Santa Cruz) Genome Browser – Mar. 2006 Assembly

<http://genome.ucsc.edu>

UniProt

<http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml>

Webcutter 2.0

<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>