UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

RUBENS MATIAS RODRIGUES

Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido

> BAURU 2010

RUBENS MATIAS RODRIGUES

Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, para obtenção do titulo de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas. Orientadora: Profa. Dra. Maria Leine Guion de Almeida

BAURU 2010 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

R618r	Rodrigues, Rubens Matias Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido / Rubens Matias Rodrigues, 2010. 135p.; 30 cm.
	Dissertação (Mestrado - Área de concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo.
	Orientadora: Profa. Dra. Maria Leine Guion de Almeida
	1. Citogenética 2. Anomalia cromossômica 3. Anomalia craniofacial
	CDD: 616.043

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rubens Matias Rodrigues

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, para obtenção do titulo de mestre.

Área de concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr._____ Instituição Assinatura

Prof. Dr._____

Instituição_____Assinatura_____

Profa. Dra. Maria Leine Guion de Almeida (Orientadora) Instituição: HRAC-USP

Prof. Dra. Inge Elly Kiemle Trindade Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

Data de Depósito da dissertação junto à SPG:__/__/2010

DEDICATÓRIA

A Deus, por me abençoar e ter me dado força e saúde para concluir minhas tarefas.

Aos meus pais, **Nair** e **Aristeo** (in memoriam) que souberam dosar amor, honra e disciplina na minha formação como ser humano.

A minha esposa **Benedita** e meus filhos **Rubens Junior** e **Roger** pela suas compreensões nas horas difíceis e na minha ausência, privando-se da minha convivência, permitindo, assim o meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Leine Guion de Almeida, pela paciência, pelo ensinamento, pela confiança depositada em minha capacidade.

À amiga Roseli Maria Zechi Ceide, por todo o apoio e ensinamento.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Citogenética Tânia Yoshico Kamiya, Rosana Maria Candido de Souza Sandri, Tereza Marquez da Silva, Cibele Nazaré Alves Pereira Pires pela amizade e colaboração.

Aos Profissionais do Setor de Genética Clinica Dra. Maria Leine Guion de Almeida, Roseli Maria Zechi Ceide, Dr. Antonio Richieri Costa, Nancy Mizue Kokitsu Nakata, Siulan Vendramini Paulovich Pitolli, pelo atendimento aos pacientes deste trabalho, apoio e amizade.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação Andréia, Rogério e Maria José pelo auxilio e amizade.

Aos funcionários da Unidade de Ensino e Pesquisa pelo apoio.

À Camila Wenceslau Alvarez do setor de comunicação pela colaboração.

A todos colegas da família Centrinho, que contribuíram de alguma forma, com este trabalho.

Aos pacientes e seus familiares, pela colaboração, sem a qual seria impossível concretizar esse trabalho.

"As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem. " Lilian Tonet

Muito Obrigado!

RESUMO

RODRIGUES, RM. Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2010.

Objetivos: Investigar possíveis alterações citogenéticas, através da técnica de bandamento de alta resolução, em indivíduos com anomalias craniofaciais associadas ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e sem diagnóstico clínico-genético definido, com cariótipo (com bandas) prévio normal e estabelecer possível correlação entre o fenótipo dos indivíduos e as regiões cromossômicas alteradas.

Local de execução: Laboratório de Citogenética Humana e Serviço de Genética Clínica, HRAC-USP, Bauru-SP.

Indivíduos estudados e Resultados: O cariótipo de alta resolução de 16 indivíduos com anomalias craniofaciais associadas ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor pertencentes ao HRAC-USP, Bauru permitiu detectar alterações citogenéticas estruturais em 4 (25%) dos 16 indivíduos. Em 3 indivíduos detectou-se deleções em regiões subteloméricas (cromossomos 4p, 9p e 18q) e, em 1 indivíduo detectou-se adição de segmento cromossômico de origem desconhecida na região telomérica do cromossomo 12p.

Conclusões: A frequência alta (25%) de alterações cromossômicas estruturais em regiões cromossômicas terminais (teloméricas e subteloméricas) mostra que a técnica de alta resolução é útil na identificação de alterações nessas regiões, portanto, indivíduos com anomalias craniofaciais e atraso mental, sem diagnóstico genético-clínico definido, cujo cariótipo convencional foi normal, devem ser, submetidos à análise dos cromossomos por meio do cariótipo de alta resolução antes do procedimento de CGH-array.

Descritores: anomalias cromossômicas, anomalias craniofaciais, bandamento de alta resolução.

ABSTRACT

RODRIGUES, RM. Cytogenetic refinement in individuals with syndromic craniofacial anomalies with unkown diagnoses. [Dissertação] Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2010

Objective: To investigate possible cytogenetic abnormalities through high resolution banding technique in individuals with craniofacial anomalies presenting previous normal karyotype, associated to neuropsychological development delay, without clinic-genetic diagnoses, and establish possible correlation between phenotype and possible candidate chromosomal regions.

Local: Human Cytogenetic Laboratory and Clinical Genetic Service, HRAC-USP, Bauru, SP.

Individuals and Results: High resolution karyotype of 16 individuals with craniofacial anomalies associated to neuropsychological development delay in follow-up at the HRAC-USP, Bauru allowed the detection of structural chromosomal abnormalities in 4 (25%) of them. Three individuals presented deletion in the subtelomeric region (chromosomes 4p, 9p, and 18q), and one individual presented an addition of an unknown chromosomal fragment in the telomeric region of chromosome 12p.

Conclusions: The high frequency (25%) of structural chromosomal abnormalities in terminal region (telomeric and subtelomeric) shows that the high resolution technique is useful for identification of structural anomalies in these regions. Therefore, individuals with craniofacial anomalies associated to neuropsychological development delay without a definitive clinic-genetic diagnoses presenting a normal conventional karyotype, should be submitted to chromosomal analysis through high resolution karyotype before CGH-array procedure.

Key words: chromosomal abnormalities, craniofacial anomalies, high resolution banding.

LISTA DE FIGURAS

		~-
Figura 1 -	a) Deleção terminal; b) Deleção intersticial	37
Figura 2 -	Duplicação	38
Figura 3 -	Esquema da formação de uma translocação. a) translocação	
	recíproca; b) translocação robertsoniana	39
Figura 4 -	Esquema da formação de uma inversão cromossômica. a)	
	Inversão paracêntrica; b) Inversão pericêntrica	40
Figura 5 -	Esquema da formação de um cromossomo em anel	40
Figura 6 -	Esquema da formação de um isocromossomo	41
Figura 7 -	Aspectos clínicos do caso 1 nas idades de 3 meses (a e b) e	
	4 anos e 7 meses (c, d, e e)	69
Figura 8 -	Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma	69
Figura 9 -	Aspectos clínicos do caso 2 na idade de 1 ano e 8 meses	71
Figura 10 -	Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma	71
Figura 11 -	Aspectos clínicos do caso 3 na idade de 6 anos e 2 meses	73
Figura 12 -	Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma	73
Figura 13 -	Aspectos clínicos do caso 4 na idade de 8 anos e 2 meses	75
Figura 14 -	Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma	75
Figura 15 -	Aspectos clínicos do caso 5 nas idades de 14 meses (a) e 3 anos	
	e 3 meses (b, c, e d)	83
Figura 16 -	Aspectos clínicos do caso 6 na idade de 12 meses	83
Figura 17 -	Aspectos clínicos do caso 7 na idade de 5 anos e 10 meses	84
Figura 18 -	Aspectos clínicos do caso 8 na idade de 14 anos	84
Figura 19 -	Aspectos clínicos do caso 9 na idade de 5 anos e 10 meses	85
Figura 20 -	Aspectos clínicos do caso 10 na idade de 12 anos	85
Figura 21 -	Aspectos clínicos do caso 11 na idade de 11 anos	86
Figura 22 -	Aspectos clínicos do caso 12 na idade de 2 anos e 3 meses	87
Figura 23 -	Aspectos clínicos do caso 13 na idade de 11 anos	88
Figura 24 -	Aspectos clínicos do caso 14 nas idades de 7 meses (a e b) e 1	
	ano 2 meses (c e d)	89

Figura 25 -	Aspectos clínicos do caso 15 nas idades de 15 anos (a e b) e	
	18 anos. (c e d)	89
Figura 26 -	Aspectos clínicos do caso 16 na idade de 1 mês e 20	
	dias	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Prevalência de anomalias cromossômicas numéricas entre	
	neonatos	36
Tabela 2 -	Dados genético-clínicos dos indivíduos da amostra que não	
	apresentaram alterações estruturais no cariótipo de alta	
	resolução	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Α	altura			
а	ano(s)			
add	material adicional de origem desconhecida			
ADNPM	atraso do desenvolvimento neuropsicomotor			
ANPM	atraso neuropsicomotor			
С	comprimento			
CGH	comparative genomic hybridization (hibridização comparativa de			
	genomas)			
CGH a	comparative genomic hybridization array (hibridização comparativa de			
	genomas de array)			
CIA	comunicação inter-atrial			
cm	centímetro(s)			
CROMHU	Sistema Computacional para Análise de Cromossomo Humano			
d	dia(s)			
del	deleção			
DICE	distância intercantal externo			
DICI	distância intercantal interno			
DNA	ácido desoxirribonucléico			
EN	estatura ao nascimento			
F	feminino			
FISH	fluorescence in situ hybridization (hibridização in situ com fluorescência)			
g	grama (s)			

G_P_A	nº de gestações, partos e abortos
GTG	técnica de bandamento G usando tripsina
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
IMC	idade materna na concepção
IPC	idade paterna na concepção
ISCN	International System Cytogenetic Nomenclature (Sistema Internacional
	de Nomenclatura Citogenética)
KCI	cloreto de potássio
Kg	Kilograma
L1	lombar 1
L3	lombar 3
М	masculino
m	mês(es)
Mb	megabase(s)
ml	mililitro(s)
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification (amplificação de
	múltiplas sondas dependente de ligação)
NOR	regiões organizadoras do nucléolo
OAVS	espectro oculoauriculovertebral
OMIM	Online Mendelian Inherintance In Man (Herança Mendeliana no Homem
	OnLine)
Р	percentil
PC	perímetro cefálico
р	braço curto do cromossomo
PCR	polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PN	peso ao nascimento
q	braço longo do cromossomo
SPRD	síndrome de Pitt Rogers Danks
SWH	síndrome Wolf-Hirschhorn
t	translocação
USP	Universidade de São Paulo
VCF/DG	síndrome Velo-Cardio-Facial/síndrome de DiGeorge
WHSCR	região critica para síndrome de Wolf-Hirschhorn

LISTA DE SÍMBOLOS

- , separa o número de cromossomos, cromossomos sexuais e anomalias cromossômicas
- () encerra cromossomos estruturalmente alterados e pontos de quebra
- . indica sub-bandas
- \rightarrow de para, no sistema detalhado
- [] encerra o número de células
- > maior que
- < menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS	33
2.1.1	Anomalias cromossômicas numéricas	34
2.1.2	Anomalias cromossômicas estruturais	36
2.2	ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS E SÍNDROMES	
	CRANIOFACIAIS	42
2.3	TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA	47
2.3.1	Citogenética clássica	47
2.3.2	Bandamento de alta resolução	48
2.3.3	Citogenética molecular	49
2.3.3.1	Hibridização in situ com fluorescência (FISH)	49
2.3.3.2	Hibridização comparativa de genomas (CGH)	50
2.3.3.3	Hibridização comparativa de genomas de array (CGHa)	50
3	OBJETIVOS	53
4	INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA	57
4.1	INDIVÍDUOS ESTUDADOS	59
4.2	METODOLOGIA	60
4.2.1	Avaliação clínica genética dos indivíduos	60
4.2.2	Análise citogenética	60
4.2.2.1	Coleta de material	60
4.2.2.2	Cariótipo de alta resolução	61
4.2.2.3	Cultura de linfócitos	61
4.2.2.4	Coloração das lâminas	62
4.2.2.5	Análise do cariótipo	63
5	RESULTADOS	65
5.1	DESCRIÇÃO CLÍNICA DOS INDIVÍDUOS COM ALTERAÇÕES	
	ESTRUTURAIS DETECTADAS NO CARIÓTIPO DE ALTA	
	RESOLUÇÃO	67

5.2	DESCRIÇÃO CLÍNICA DOS INDIVÍDUOS SEM ALTERAÇÃO	
	ESTRUTURAL DETECTADA NO CARIÓTIPO DE ALTA	
	RESOLUÇÃO	76
5.3	ASPECTOS CLÍNICOS DOS INDIVÍDUOS DA AMOSTRA QUE	
	NÃO APRESENTARAM ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO	
	CARIÓTIPO DE ALTA RESOLUÇÃO	83
6	DISCUSSÃO	91
6.1	CASOS COM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA DETECTADA	
	PELA TÉCNICA DE ALTA RESOLUÇÃO	93
6.2	CASOS QUE NÃO APRESENTARAM ALTERAÇÃO	
	CITOGENÉTICA DETECTADA PELA TÉCNICA DE ALTA	
	RESOLUÇÃO	100
7	CONCLUSÕES	103
8	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	123



1 INTRODUÇÃO

O segmento cefálico em humanos, do ponto de vista evolutivo, representa um extraordinário processo de desenvolvimento. É composto pelo cérebro e órgãos da visão, audição, equilíbrio, paladar e olfato. Além de participar das estruturas e dos mecanismos da alimentação e da oxigenação, possibilita, ainda, a interação social através do reconhecimento facial, das expressões faciais e da fala (Morris-Kay 2006). O segmento cefálico origina-se de múltiplos tecidos embrionários, incluindo as células derivadas da crista neural, do mesoderma pré-cordal e do ectoderma craniofacial embrionário. O desenvolvimento craniofacial normal é decorrente de interações complexas entre esses tecidos embrionários e requer regulação precisa de migração, crescimento, padronização e diferenciação dos tecidos craniofaciais (Francis-West et al 1998, Wilkie e Morris-Kay 2001, Jiang, Bush e Lidral 2006 e Nie, Luukko e Kettunen 2006). Três vertentes maiores norteiam o estudo do desenvolvimento craniofacial humano: a) a descrição morfológica de embriões humanos, b) os estudos experimentais em modelos animais e c) os estudos genéticos e fenotípicos em humanos com anomalias congênitas (Morris-Kay 2006). Cerca de dois terços dessas anomalias são craniofaciais e, têm como causas fatores genéticos e/ou ambientais (Trainor e Krumlauf 2000, Stanier e Moore 2006). Dentre as causas genéticas, as alterações cromossômicas (numéricas e estruturais) são as mais frequentes, ocorrendo em cerca de 1 para cada 150 nativivos (Prescott e Wilkie 2007) e, representam, ainda, as principais causas conhecidas de atraso mental e de perda fetal. Estudos mostram que cerca de 10 a 15% das gestações clinicamente reconhecidas (a partir da sexta semana de gestação) resultam em abortamento espontâneo. Dos abortos ocorridos no primeiro e no segundo trimestre, cerca de 50% e de 20%, respectivamente, são decorrentes de alterações cromossômicas, sendo as alterações numéricas (aneuploidias) as mais frequentes (Jorde et al 1999, Warburton et al 2000, Lebedev et al 2004, Celep et al 2006). Estima-se que 10 a 30% dos óvulos humanos fertilizados têm aneuploidias (trissomia ou monossomia). Dos conceptos abortados espontaneamente, cerca de 35% têm trissomia (praticamente de todos os cromossomos) ou monossomia (cromossomos sexuais). Dentre os natimortos e nascidos vivos, cerca de 4% e 0,3%, respectivamente, têm aneuploidias, sendo as mais frequentes a trissomia do 21 e as trissomias dos cromossomos sexuais (47,XXX; 47,XXY e 47,XYY). A aneuploidia, portanto, representa uma causa importante de perda fetal, de parada do crescimento fetal e, ainda, de atraso mental (Hassold e Hunt 2001). Já, as anomalias cromossômicas estruturais não equilibradas (com perda ou ganho de material genético), tais como as duplicações e deleções cromossômicas, são responsáveis pela ocorrência de atraso mental com ou sem múltiplas anomalias associadas (Jorde et al 1999). De acordo com Cobourne (2004), 5% das deleções e duplicações que resultam em múltiplas anomalias congênitas tem a fissura orofacial como um dos achados clínicos.

Considerando o acima exposto fica evidente a relevância do estudo citogenético frente a situações de abortamento recorrente; na presença de fenótipo característico de síndromes cromossômicas clinicamente reconhecidas como a síndrome de Down, síndrome de Patau, síndrome de Edwards, síndrome de Wolf-Hirschhorn, entre outras e, ainda, frente a indivíduos com múltiplas malformações, de causas desconhecidas e que incluam déficit de crescimento pré e/ou pós-natal e/ou atraso global de desenvolvimento (Schinzel 1983, Nussbaum, McInnes e Willard 2002, Sharkey, Maher e FitzPatrick 2005, Morris-Kay 2006). O aumento da

resolução dos cromossomos proporcionado pelas novas técnicas de citogenética e citogenética molecular, incluindo o cariótipo de alta resolução (850 bandas), a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), a amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (*multiplex ligation-dependent probe amplification* - MLPA) e a hibridização de comparativa genômicas de *array* (*comparative genomic hybridization* – CGHa), tem permitido a identificação de microdeleções, microduplicações e rearranjos cromossômicos em indivíduos com atraso mental e/ou múltiplas anomalias congênitas de causas até então desconhecidas (Kriek et al 2004, Hyun-Kyung et al 2008, Shinawi e Cheung 2008). Em adição, essas novas tecnologias têm permitido, a partir da identificação de translocações e de deleções cromossômicas, o reconhecimento de regiões genômicas críticas e, em consequência, a identificação de locos gênicos e de genes responsáveis pela ocorrência de síndromes malformativas (Nussbaum, McInnes e Willard 2002, Morris-Kay 2006, Prescott e Wilkie 2007, Shaffer et al 2007, Shinawi e Cheung 2008).

O cariótipo de rotina (550 bandas) permite identificar deleções, duplicações e rearranjo de segmentos cromossômicos relativamente grandes (5-10Mb) (Balikova et al 2007, Shinawi e Cheung 2008). Com a expansão dos cromossomos obtida pela técnica de alta resolução é possível detectar alterações menores (~3-4Mb), sendo um método efetivo para identificação de alterações subteloméricas e intersticiais (Joyce et al 2001). Alterações menores que 3Mb podem ser identificadas somente com o emprego de técnicas moleculares tais como a de FISH, MLPA e CGHa (Rauch et al 2006, Shinawi e Cheung 2008). A técnica de FISH é um método indicado para identificação de rearranjos cromossômicos específicos, não permite um *screening* genômico e requer conhecimento prévio da região cromossômica envolvida, tendo como base os achados clínicos ou citogenéticos (Rauch et al 2006, Shinawi e Sectiona de Sectiona).

Shinawi e Cheung 2008). A técnica de MLPA é um método para determinar números de cópias na sequência de DNA em regiões subtelomérica ou telomérica utilizando sondas especificas. Em ambas as técnicas, não é possível precisar o tamanho do segmento cromossômico envolvido (DeScipio et al 2008).

A técnica da CGHa, também chamada de cariótipo molecular, é um método de varredura genômica que permite detectar variações no número de cópias de segmentos genômicos e precisar o tamanho do segmento cromossômico envolvido. O nível de resolução das diferentes plataformas CGHa (comercialmente adquiridas) depende da distância (1-100 Mb) e do tamanho (25 mers – 200kb) das sondas de DNA utilizadas, sendo possível detectar alterações submicroscópicas (menores que 1Mb) (Balikova et al 2007, Shao et al 2008, Shinawi e Cheung 2008). Devido à eficiência em detectar alterações submicroscópicas, à rapidez em obter resultado e à relativa simplicidade do método, o CGHa tem se tornado uma ferramenta essencial no diagnóstico clínico de rotina e, em alguns laboratórios, está, gradualmente, substituindo os métodos citogenéticos clássicos. Seu alto custo é um fator limitante para sua utilização.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

Estima-se que o genoma humano compreende cerca de 35.000 genes distintos, os quais são unidades de informações genéticas, distribuídas em locais exatos (locos), numa molécula, altamente compactada, de ácido desoxirribonucléico (DNA), denominada de cromossomo. Os genes humanos estão distribuídos em 23 pares de cromossomos, dos quais 22 pares são cromossomos autossomos e 1 par, cromossomos sexuais. Mulheres normais são representadas pela notação 46,XX, enquanto os homens normais, pela notação 46,XY (Nussbaum, McInnes e Willard 2002).

Os cromossomos desempenham papel relevante na transmissão da informação genética de uma geração para outra. Assim, quaisquer alterações no número ou na estrutura (sequência de seus genes) dos cromossomos, as quais são denominadas anomalias cromossômicas, podem produzir inviabilidade celular na formação dos gametas (durante a meiose) ou do embrião ou, então, resultar em malformações. As alterações cromossômicas podem, também, ocorrer durante a mitose nas patologias do câncer, causando desequilíbrio na formação, no desenvolvimento, no crescimento e no metabolismo das células afetadas (Hassold e Hunt 2001, Nussbaum, McInnes e Willard 2002).

As anomalias cromossômicas constituem uma das mais frequentes causas de déficit de crescimento, retardo mental e malformações, as quais incluem anomalias craniofaciais, anomalias cardíacas, anomalias esqueléticas e acometimento de outros órgãos internos (Anderlid et al 2002, Horovitz Llerena Junior e Mattos 2005,

Celep et al 2006, Jones e Franklin 2006). São subdivididas em numéricas e estruturais e são decorrentes de perda ou de ganho de quantidade significativa de material genético, podendo levar a danos graves ou letais. Os mecanismos que levam a tais alterações incluem: erro na separação dos cromossomos durante a meiose; perda de centrômero e, consequentemente, perda do braço cromossômico; quebras cromossômicas e pareamento desigual de regiões repetitivas (Schinzel 1983, Nussbaum, McInnes e Willard 2002, Prescott e Wilkie 2007). Há, ainda, casos em que pode ocorrer uma mistura de linhagens celulares, com presença de linhagens celulares normais e alteradas, evento este, denominado de mosaicismo cromossômico. Em situações mais raras, pode ocorrer herança de ambos os homólogos de um único genitor, evento denominado de dissomia uniparental (Berend et al 2000, Kotzot 2001, García-Castillo et al 2008).

2.1.1 Anomalias cromossômicas numéricas

As alterações cromossômicas numéricas são aquelas que incluem alteração no número de cromossomos. As células humanas que não contém um múltiplo de 23 cromossomos são chamadas de aneuplóides. Essas células contêm cromossomos ausentes ou adicionais sendo, em geral, apenas um cromossomo afetado. Consistem, principalmente, em monossomias (presença de apenas uma cópia de um dos cromossomos homólogos em uma célula) e em trissomias (três cópias de um dos cromossomos por célula). A causa mais comum de aneuploidia é a não-disjunção, isto é, falha na separação normal dos cromossomos durante a meiose. A maioria das monossomias e trissomias cromossômicas, em humanos, está relacionada a condições clínicas importantes e, quase sempre, são
incompatíveis com a vida, resultando em perda fetal. Em casos de abortamento espontâneo têm sido observadas frequências altas de trissomia do cromossomo 16 (33% dos casos) e de trissomias dos cromossomos 21 e 22 (20% dos casos). Dentre as anomalias envolvendo os cromossomos sexuais, a monossomia do cromossomo X (45,X) é responsável por 10% dos abortos espontâneos (Hassold e Hunt 2001, Thomas et al 2001, Morales et al 2008).

Algumas trissomias são vistas com frequências apreciáveis entre os nativivos (Tabela 1). Entre as trissomias dos cromossomos autossômicos destacam-se: a trissomia do cromossomo 21; a trissomia do cromossomo 13 e a trissomia do cromossomo 18. Essas condições apresentam alto índice de mortalidade nos primeiros anos de vida e incluem, entre seus achados clínicos: déficit de crescimento, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e anomalias maiores tais como alterações estruturais do sistema nervoso central, anomalias craniofacial, cardiopatia, entre outras. Os sinais clínicos de um indivíduo com uma determinada anomalia cromossômica podem ser expressos com maior ou menor gravidade e, em geral, formam um padrão de malformações característico que possibilita um diagnóstico clínico preliminar (Vogel e Motulsky 2000). As anomalias numéricas de cromossomos sexuais, em sua maioria, levam a características fenotípicas leves e são mais frequentes entres os nativivos do que as anomalias numéricas dos autossomos (Tabela 1) (Schinzel 1983, Gorlin, Cohen Junior e Hennekam 2001, Nussbaum, McInnes e Willard 2002).

Anomalia cromossômica	Prevalência ao nascimento
Anomalias de autossomos	
Trissomia do 21	1 em 800
Trissomia do 18	1 em 6.000
Trissomia do 13	1 em 10.000
Anomalias de cromossomos sexuais	
47,XXY	1 em 1.000 meninos
47,XYY	1 em 1.000 meninos
45,X	1 em 5.000 meninas
47,XXX	1 em 1.000 meninas

 Tabela 1 - Prevalência de anomalias cromossômicas numéricas entre neonatos.

Fonte: Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Genética Médica. 2a. ed. Tradução por Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. Tradução de: medical Genetics p.111.

2.1.2 Anomalias cromossômicas estruturais

Alterações cromossômicas estruturais resultam de quebras que interrompem a continuidade de um ou mais cromossomos e, quando ocorrem na linhagem germinativa, podem produzir anomalias cromossômicas herdáveis (Schinzel 1983, Miller e Therman 2001, Nussbaum, McInnes e Willard 2002). Estima-se que ocorram em cerca de 0,5% dos recém nascidos. Na grande maioria dos casos, as anomalias cromossômicas estruturais aparentemente equilibradas não estão associadas a fenótipos anormais, podendo ser transmitidas a algumas gerações sem serem detectadas. Entretanto, os portadores de translocações equilibradas podem produzir gametas com desequilíbrio cromossômico, resultando em falhas reprodutivas. Por outro lado, é usualmente aceito que uma alteração nova não balanceada pode resultar em fenótipo alterado. Essas alterações não equilibradas quase sempre envolvem perda ou ganho de alguns Mb de DNA, o que pode causar desequilíbrio potencial de muitos genes e resultar em fenótipo alterado (Gribble et al 2005). As alterações cromossômicas estruturais incluem:

 deleção: também conhecida como monossomia parcial, envolve quebra no segmento cromossômico e subsequente perda de material genético, podendo ocorrer uma única quebra na parte terminal do cromossomo (Figura 1a) ou duas quebras, nesse caso, com perda do material genético intermediário (deleção intersticial)(Figura 1b). Deleções maiores que 2-3 Mb são, em grande parte, visíveis microscopicamente;



Fonte: Acesso em 18 nov 2009. Imagem capturada: http://bioa2.blogspot.com/2009/03/mutacoes-e-suas-causas.html Figura 1 - a) Deleção terminal; b) Deleção intersticial.

 duplicação: também conhecida como trissomia parcial, ocorre quando um mesmo segmento cromossômico aparece em duplicata (Figura 2). Pode originar-se de *crossing-over* (troca de material genético entre as cromátides homólogas não-irmãs) desigual de regiões cromossômicas repetitivas ou, então, de segregação anormal dos cromossomos com translocação ou inversão (Schinzel 2001);



Fonte: Acesso em 18 nov 2009. Imagem capturada: http://bioa2.blogspot.com/2009/03/mutacoes-e-suas-causas.html



translocação: é uma troca de material genético entre cromossomos não homólogos. Existem dois tipos básicos de translocações: recíprocas e robertsonianas. Nas translocações recíprocas ocorrem quebras em dois cromossomos diferentes e seu material genético é mutuamente trocado, sendo OS cromossomos resultantes chamados de cromossomos derivativos (Figura 3a). Nas translocações robertsonianas ocorrem quebras nos centrômeros dos cromossomos acrocêntricos (homólogos ou não homólogos); perda dos braços curtos e fusão dos centrômeros dos braços longos (Figura 3b). Este tipo de translocação é, usualmente, observado nos cromossomos acrocêntricos: 13, 14, 15, 21 e 22 (Jorde et al, 1999). Os braços curtos dos cromossomos acrocêntricos contêm sequência de DNA repetitiva (região organizadora de nucléolos) e a perda desse material genético não causa danos ao indivíduo. As translocações 13q14q 14q21q são relativamente comuns, constituindo е aproximadamente 85% das translocações robertosonianas (Vogel e Motulsky 2000, Shaffer e Lupski 2000);



Fonte: Acesso em 18 nov 2009. Imagem capturada: http://bioa2.blogspot.com/2009/03/mutacoes-e-suas-causas.html

- Figura 3 Esquema da formação de uma translocação. a) translocação recíproca; b) translocação robertsoniana.
 - inversão: ocorre quando os cromossomos quebram-se em dois pontos diferentes e a parte intermediária une-se novamente de forma invertida, podendo ser paracêntricas (as que não incluem o centrômero)(Figura 4a) ou pericêntricas (com inclusão do centrômero)(Figura 4b). A mais recorrente em humanos é a inversão pericêntrica na região de heterocromatina do cromossomo 9, considerada como variação comum na população normal (heteromorfismo);



Fonte: Acesso em 18 nov 2009. Imagem capturada: http://bioa2.blogspot.com/2009/03/mutacoes-e-suas-causas.html

- Figura 4 Esquema da formação de uma inversão cromossômica. a) Inversão paracêntrica; b) Inversão pericêntrica.
 - anel cromossômico: deleções em ambas extremidades (região telomérica) de um cromossomo com fusão do cromossomo restante, formando um anel (Figura 5). Se o cromossomo em anel incluir um centrômero, ele poderá participar da multiplicação celular, mas, devido à sua estrutura, é geralmente perdido, em pelo menos algumas células, gerando mosaicismo para o cromossomo em anel. Embora a frequência seja baixa, já foram descritos cromossomos em anel de quase todos os cromossomos humanos (Jorde et al 1999, Schinzel 2001);



Fonte: Acesso em 18 nov 2009. Imagem capturada: http://bioa2.blogspot.com/2009/03/mutacoes-e-suas-causas.html

Figura 5 - Esquema da formação de um cromossomo em anel.

isocromossomo: ocasionalmente são encontrados cromossomos que consistem em dois braços idênticos (curtos ou longos) (Figura 6). Originam-se, em sua maioria, de uma divisão anormal de cromossomos metafásicos e, podem, ainda, se decorrentes de translocações robertsonianas de cromossomos homólogos acrocêntricos (cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22). Como o material genético está substancialmente alterado, os isocromossomos, da maioria dos autossomos, são letais. Em humanos, o isocromossomo de ambos os braços do cromossomo X tem sido observado em mulheres com fenótipo compatível com o diagnóstico de síndrome de Turner (Jorde et al 1999, Vogel e Motulsky 2000);



Fonte: Acesso em 18 nov 2009. Imagem capturada: http://bioa2.blogspot.com/2009/03/mutacoes-e-suas-causas.html **Figura 6 -** Esquema da formação de um isocromossomo.

 cromossomo marcador: marcadores são cromossomos extranumerários de origem indeterminada (Mitelman 1995), geralmente, observados em material de exame de diagnóstico pré-natal, em pacientes com múltiplas anomalias e em casais com infertilidade. Os marcadores ocorrem numa frequência de 0,05% na população e, o mecanismo responsável pela sua formação não é conhecido. A presença de um cromossomo marcador pode interferir na segregação normal dos cromossomos homólogos ou na troca de material genético entre os mesmos, resultando em inviabilidade celular ou em malformação na prole. A permanência de um marcador na célula depende da sua estabilidade no processo de divisão celular, a qual é conferida pela presença do centrômero ou de um neocentrômero. Através das técnicas de citogenética de bandamento, em combinação com técnicas moleculares, tem sido possível identificar a origem dos cromossomos marcadores (Warburton et al 1991, Starke et al 2003, Douet-Guilbert et al 2007).

2.2 ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS E SÍNDROMES CRANIOFACIAIS

As anomalias craniofaciais representam cerca de ³⁄₄ de todas as anomalias vistas ao nascimento e incluem: fissuras orofaciais típicas (fissura de lábio e/ou palato) e atípicas (fissuras complexas), craniossinostoses, defeitos de linha média craniofacial com hipotelorismo ou hipertelorismo, anomalias de primeiro e segundo arcos branquiais, entre outras. Essas alterações podem ocorrer isoladas ou associadas a outras anomalias congênitas podendo fazer parte do quadro clínico de síndromes complexas (Tolarová e Cervenka 1998, Gorlin, Cohen Junior e Hennekam 2001).

Das anomalias craniofaciais, as fissuras orofaciais típicas são as mais frequentes, com prevalência de aproximadamente 1 para cada 500 nascidos vivos (Tolarová e Cervenka 1998). Cerca de 30% dos casos são associados a outras anomalias craniofaciais ou sistêmicas (sistema cardiovascular, musculoesquelético e genitourinário), podendo representar quadros sindrômicos de etiologia genética

(monogênica ou cromossômica), ambiental ou desconhecida (Tolarová e Cervenka 1998, Gorlin, Cohen Junior e Hennekam 2001, Cobourne 2004 e Thomas et al 2008). Atualmente, aproximadamente 400 síndromes conhecidas foram descritas com fissura orofacial (Thomas et al 2008). Cerca de 4,7 a 8,7% dessas síndromes tem etiologia cromossômica, sendo as mais frequentes a trissomia do 13 (síndrome de Patau), seguida pela trissomia do 18 (síndrome de Edwards) (Tolarová e Cervenka 1998, Sárközi, Wyszynski e Czeizel 2005 e Thomas et al 2008). Trissomia de outros cromossomos, incluindo a trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down), bem como alterações cromossômicas estruturais, principalmente deleções, duplicações e translocações de diferentes cromossomos, também são descritas com frequência considerável (Tolarová e Cervenka 1998, Gorlin, Cohen Junior e Hennekam 2001, Cobourne 2004, Sárközi Wyszynski e Czeizel 2005, Utine et al 2007, Yamanishi et al 2008). Algumas dessas alterações cromossômicas estruturais contribuíram para identificação de genes ou grupos de genes candidatos às fissuras orofaciais. Recentemente, duas regiões candidatas, 2q32 e 19q13, foram identificadas em indivíduos com fissura de lábio e palato que apresentavam ao exame citogenético, translocações equilibradas. O gene SATB2, localizado na região 2q32, foi considerado candidato para fissura pela sua alta expressão no lábio e palato (Jugessur e Murray 2005).

Em relação às demais anomalias craniofaciais, frequência alta de etiologia cromossômica foi observada em indivíduos com craniossinostose sindrômica e em indivíduos com defeitos de linha média com hipotelorismo ocular, também conhecida como sequência de holoprosencefalia (OMIM % 236100)(OMIM 2009i). Estudos citogenéticos convencionais realizados por Jehee et al (2008) em indivíduos com craniossinostose sindrômica mostraram que 20% dos casos estão associados à

anomalia cromossômica, incluindo deleções dos cromossomos 2q, 7p e 9p e duplicação do cromossomo 11q. Quando os autores utilizaram técnicas moleculares tais como CGHa e MLPA, investigação de arranjos submicroscópicos e análise de segregação de polimorfismos microsatélites, a frequência de alterações cromossômicas, nesses indivíduos, aumentou consideravelmente, passando de 20% para 42%. Rearranjos cromossômicos adicionais envolvendo os cromossomos 1 e 17 também foram observados. Em indivíduos com seguência de holoprosencefalia, a frequência de etiologia cromossômica variou de 15 a 58% e incluiu, principalmente, trissomia do 13, trissomia do 18 e deleções dos cromossomos 18p, 7q36, 13q32 e 2p21 (Chen et al 2005, Orioli e Castilla 2007, Bendavid et al 2006). Já nos casos com defeito de linha média craniofacial com hipertelorismo, também conhecidos como displasia frontonasal, os relatos de alterações citogenéticas são raros (Stevens e Qumsiyeh 1995 e Wu, Vargevik e Slavotinek 2007). Da mesma forma, são raros os relatos de indivíduos com anomalias de primeiro e segundo arcos branquiais com alterações citogenéticas. As alterações detectadas incluem: trissomia 47,XXY (síndrome de Klinefelter), mosaicismo da trissomia do 7, mosaicismo da trissomia do 9, trissomia do 10p, trissomia do 22, deleção do 22q, translocação entre os cromossomos 5 e 8 [t(5;8)(p15.31;p23.1)] e marcador cromossômico derivado de translocação entre os cromossomos 11 e 22 [der(22)t(11;22)(q23;q11)] (Balci et al 2006, Engiz et al 2007, Xu, Fan e Siu 2008).

Em geral, as deleções e duplicações proporcionam perda ou ganho considerável de genes, que frequentemente resulta em fenótipo alterado. Duplicações e deleções menores que 5 Mb raramente são detectadas na citogenética convencional (Jorde et al 1999). As novas técnicas de bandamento de alta resolução e de genética molecular (FISH e CGHa) possibilitaram a identificação

mais precisa de regiões cromossômicas envolvidas em determinadas síndromes genéticas. Em alguns casos foram identificados genes específicos e, ainda, polimorfismo de DNA, os quais permitiram identificar a origem do cromossomo anormal, aumentando a compreensão da base biológica dos erros meióticos e das anomalias cromossômicas. Exemplo bem estudado é a síndrome velo-cardiofacial/síndrome de DiGeorge (VCF/DG) (OMIM #188400)(OMIM 2009c)/(OMIM #192430) (OMIM 2009b), causada por microdeleção do cromossomo 22g11.2 (Driscoll et al 1992, Scambler et al 1992). Alguns estudos recentes mostraram microduplicação dessa região cromossômica em indivíduos com diagnóstico clínico da síndrome VCF/DG (Dempsey, Schwartz e Waggoner 2007, Prescott e Wilkie 2007) o que, embora esses indivíduos tenham sido selecionados a partir da presença de sinais clínicos da síndrome VCF/DG, pode representar uma síndrome nova (Ensenauer et al 2003, Dempsey, Schwartz e Waggoner 2007). Outro exemplo bem conhecido é a síndrome Wolf-Hirschhorn (SWH) (OMIM #194190)(OMIM 2009a) causada pela deleção, de tamanho variável, na porção distal do braço curto do cromossomo 4 (4p16.3) e considerada uma síndrome de genes contíguos (Suri 2005, Battaglia e Carey 2008). Em alguns casos a síndrome é decorrente de microdeleção dessa região, não detectada na citogenética convencional (Rauch et al 2001). Aproximadamente 20% dos casos têm deleção restrita à região 4p16.3 (representando 5Mb telomérico). O restante é causado por deleção grande que pode se estender até a região 4p14. Embora a maioria seja causada por deleção nova, cerca de 20% dos casos é decorrente de translocações parentais (Bergemann, Cole e Hirschhorn 2005), sendo que as deleções menores que 3,5 Mb estão associadas a fenótipo leve, com ausência de malformações (Zollino et al 2000, Suri 2005). Battaglia et al (1999), estudando 15 indivíduos com SWH identificaram por meio do

bandamento-G (400-550 bandas), deleção no 4p em 10 indivíduos. Em outros três, a deleção do 4p pôde ser identificada com bandamento de alta resolução (850 bandas) e, ainda, em outros dois, somente por meio da técnica de FISH, com banda específica para a região. O mapeamento das deleções, em diferentes indivíduos, restringiu a região crítica da SWH para 2 Mb do telômero do 4p, a qual inclui dois genes candidatos para a condição: WHSCR1 e WHSCR2 (Wright et al 1997, Zollino et al 2003, Bergemann, Cole e Hirschhorn 2005, Concolino et al 2007, Battaglia e Carey 2008). Até o momento nenhuma deleção gênica ou mutação, nesses genes, foi associada ao fenótipo da SWH. A deleção da região 4p16.3 também tem sido observada na síndrome de Pitt Rogers Danks (SPRD) (OMIM #262350)(OMIM 2009h), fenotipicamente sobreposta à SWH. Wright et al (1998), estudando as deleções em indivíduos com SWH e SPRD encontraram sobreposição das regiões deletadas e concluíram que as duas condições resultam da ausência de segmentos genéticos similares, mas não idênticos. Os autores sugeriram que as diferenças clínicas observadas entre as duas condições resultam de variações alélicas dos homólogos restantes. Battaglia e Carey (1998), no entanto, consideraram que a SPRD é essencialmente a mesma condição que SWH, isto é, síndrome da deleção do 4p.

Em relação às translocações equilibradas, as técnicas de alta resolução têm demonstrado que cerca de 60% dos indivíduos têm rearranjos cromossômicos adicionais. Das alterações *de novo*, estima-se que 6% levam a alterações fenotípicas por causarem disrupção de gene(s) ou por introduzirem microdeleções ou microduplicações no ponto de quebra cromossômico (Gribble et al 2005). Dessa forma, o aumento da resolução cromossômica proporcionada pelas novas técnicas de citogenética tem permitido identificar deleções e duplicações em indivíduos com

atraso mental, com anomalias congênitas, ou ambos, cujo cariótipo convencional foi normal (Shaw-Smith et al 2004, Mencarelli et al 2008).

2.3 TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA

2.3.1 Citogenética clássica

As técnicas convencionais para análise cromossômica incluem o bandamento G (Giemsa), o bandamento C e o bandamento NOR (Caspersson et al 1968). Basicamente, essas técnicas incluem: digestão de proteínas associadas ao DNA ou digestão de regiões cromossômicas específicas e posterior coloração (Beiguelman 1982).

No bandamento G, a digestão parcial de proteínas cromossômicas é realizada pela enzima tripsina e a coloração pelo corante Giemsa, dando origem a padrões de coloração cromossômicos característicos e estáveis (bandas G). O nível de resolução de bandamento G para os cromossomos é da ordem de 300 a 550 bandas, sendo limitado para rearranjos cromossômicos pequenos ou complexos de aproximadamente de 5 a 10Mb. Esse é o procedimento mais indicado para exame citogenético de rotina em pacientes com múltiplas anomalias. Dependendo do resultado do bandamento G, pode ser indicada outra análise citogenética, como os bandamentos C e NOR ou, ainda, estudos moleculares.

No bandamento C, a digestão é realizada com hidróxido de bário, o qual digere regiões heterocromáticas constitutivas (centrômero), e a coloração é realizada com Giemsa. No bandamento NOR, a digestão é realizada pelo

aquecimento e a coloração das regiões de satélite (regiões organizadoras do nucléolo presentes no braço curto de cromossomos acrocêntricos) é feita com Nitrato de Prata (Beiguelman 1982).

2.3.2 Bandamento de alta resolução

O bandamento de alta resolução permite a análise de cromossomos estendidos (cromossomos profásicos e prometafásicos) com resolução de bandas maior (800 a 2.000 bandas) do que as obtidas no bandamento convencional (400 a 550 bandas) (Yunis 1981, Francke 1994). Basicamente, a técnica resume-se em digestão parcial de proteínas cromossômicas pela enzima tripsina e coloração com corante Giemsa, diferindo no tratamento adequado das culturas de linfócitos com solução de actinomicina D, a qual interrompe o ciclo celular. Essa técnica permite sincronização parcial dos ciclos celulares, selecionando um número relativamente alto de células em prófase ou prometáfase. O tratamento com colchicina (inibidor do fuso celular) ajuda a diminuir o grau de condensação e, as bandas unitárias reveladas pelos métodos padrões (metafásicos) podem ser então, divididas em subbandas (profásicos ou prometafásicos). Esse método, embora não substitua os métodos padronizados no diagnóstico de rotina, é útil para a identificação mais precisa de pontos de quebra e de pequenas anomalias não visualizadas pela citogenética convencional, tais como translocações equilibradas ou não-equilibradas, microdeleções e microduplicações de 3 até 5 Mb.

2.3.3 Citogenética molecular

2.3.3.1 Hibridização in situ com fluorescência (FISH)

Com o advento da técnica de hibridização in situ com fluorescência (FISH) surgiu um campo novo na citogenética molecular, auxiliando na identificação de rearranjos cromossômicos estruturais e na definição de pontos de quebras cromossômicas. A técnica de FISH tem como base a utilização de sondas de DNA específicas marcadas por fluorescência, as quais, hibridizadas aos cromossomos, podem ser visualizadas em microscópio de fluorescência. Essa técnica é muito utilizada como um teste complementar à análise de bandamento convencional para identificação de alterações cromossômicas pequenas ou complexas. As sondas utilizadas são de três tipos: 1) sondas para cromossomos inteiros, aplicável em cromossomos metafásicos, sendo útil na identificação de cromossomos específicos envolvidos em translocações; 2) sondas para centrômeros específicos, utilizadas para cromossomos metafásicos ou núcleos interfásicos, sendo muito útil na identificação de alterações numéricas de cromossomos específicos; e 3) sondas para genes ou locus específico, aplicada a cromossomos metafásicos ou núcleos interfásicos, permitindo a detecção de microdeleções e microduplicações e, ainda, de rearranjos estruturais guando sondas de cores diferentes são utilizadas (Wang 2000, Vianna-Morgante 2004). Embora a técnica de FISH seja eficiente para a detecção de microdeleções, microduplicações e rearranjos estruturais, os altos custos das sondas de DNA marcadas por fluorescência, dificultam seu uso em laboratórios de rotina.

2.3.3.2 Hibridização comparativa de genomas (CGH)

A hibridização comparativa de genomas (CGH) tem como base a hibridização *in situ* quantitativa, com duas cores fluorescentes ao longo de cromossomos metafásicos, o que permite estabelecer um diferencial de hibridização entre o DNA da célula do indivíduo estudado e o DNA controle. A medida é obtida através de imagem digital em um sistema de análise específico. O ganho (duplicação) e a perda (deleção) de regiões cromossômicas específicas podem ser detectados pela intensidade da coloração fluorescente da célula do indivíduo estudado e do controle. Sua resolução é de 5 a 10 Mb para deleções e 2 Mb, para duplicações. A vantagem dessa técnica é permitir a ampla varredura do genoma, identificando deleções e duplicações cromossômicas pelo número de cópias alteradas, sem a necessidade da distribuição dos cromossomos nas amostras testadas. A CGH tem resolução limitada e não pode detectar rearranjos citogenéticos que não levem a um desequilíbrio genético como translocações e inversões (Wang 2000, Prescott e Wilkie 2007).

2.3.3.3 Hibridização comparativa de genomas em array (CGHa)

A técnica de hibridização comparativa de genomas de array (CGHa) é baseada nos mesmos princípios da técnica de CGH. A diferença essencial está na plataforma usada para a hibridização do DNA teste e DNA normal marcado (controle). Enquanto a técnica de CGH é realizada em células metafásicas, no CGHa a hibridização é feita em uma placa ou lâmina formada por vários pontos contendo cada um deles clones genômicos de interesse. Uma vez que esses clones são usados como DNA alvo, a resolução da técnica varia de acordo com o tamanho dos clones e alterações. A região cromossômica a ser analisada é diferente para cada experimento e as sequências aplicadas nas lâminas devem ser escolhidas apropriadamente, de acordo com os dados preliminares de cada caso (Shaffer e Bejjani 2003).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Investigar possíveis alterações citogenéticas, através da técnica de bandamento de alta resolução, em indivíduos com anomalias craniofaciais associadas a atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e sem diagnóstico clínico-genético definido com cariótipo convencional prévio normal;
- Estabelecer possível correlação entre o fenótipo dos indivíduos e as regiões cromossômicas alteradas;
- Fornecer subsídios para a definição do diagnóstico clínico-genético e, consequentemente, para o aconselhamento genético à família.

INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

4 INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

4.1 INDIVÍDUOS ESTUDADOS

Para a realização deste estudo foram selecionados 16 indivíduos com múltiplas anomalias, cadastrados no banco de dados da Seção de Genética Clínica do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC)-USP, Bauru.

Os critérios de inclusão foram:

- Presença de anomalias craniofaciais associadas ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor;
- Diagnóstico clínico-genético não estabelecido;
- Estudo citogenético convencional (450 bandas) prévio normal;

O critério de exclusão foi:

 História positiva para exposição intra-útero a agentes infecciosos ou teratogênicos.

Todos os responsáveis foram informados dos objetivos da pesquisa e os indivíduos selecionados foram incluídos no estudo mediante a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelos respectivos responsáveis (Anexo 1). O presente estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética do HRAC-USP (Anexo 3).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Avaliação clínica-genética dos indivíduos

Os indivíduos selecionados foram avaliados, do ponto de vista genéticoclínico, por profissionais da seção de Genética Clínica. Essa avaliação seguiu a rotina dessa seção, constando de: anamnese específica com coleta de dados gestacionais, de antecedentes pessoais e de evolução; levantamento da história familial e exame físico. Após avaliação clínica foi solicitado cariótipo de alta resolução e, quando pertinente, outros exames subsidiários.

4.2.2 Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada pelo pesquisador no Laboratório de Genética e Citogenética Humana do Hospital.

4.2.2.1 Coleta de material

A coleta de sangue periférico (2 a 3 ml) foi realizada por venipunção, utilizando-se seringa heparinizada estéril.

4.2.2.2 Cariótipo de alta resolução

A técnica de alta resolução foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Barch, Knutsen e Spurbeck (1997), onde os cromossomos corados pela técnica de bandamento GTG encontram-se estendidos (prometafásicos), o que permite a visualização de 800 a 1.200 bandas.

4.2.2.3 Cultura de linfócitos

A cultura de linfócitos, para obtenção de cromossomos prometafásicos, foi realizada segundo a técnica descrita por Barch, Knutsen e Spurbeck (1997). Para cada indivíduo foram utilizados dois meios de cultura (199 e RPMI 1640 da Cultilab[®]), enriquecidos com Soro Fetal Bovino (Cultilab[®]) e acrescidos de fitohemaglutinina P (Cultilab[®]), nas seguintes quantidades: 4 ml de meio de cultura; 1 ml de Soro Fetal Bovino e 0,2 ml de Fitohemaglutinina P. Aos meios adicionou-se 0,5 ml de sangue periférico heparinizado incubando as culturas em estufa com câmara d'água (FANEM[®]) à temperatura de 37°C, por 72 horas. Após 71 horas de cultivo celular, foi adicionado 0,1 ml de actinomicina D (SIGMA[®]), mantendo-se os frascos envoltos em papel alumínio para evitar a fotodegradação da actinomicina D. Após 55 minutos foi adicionado 0,1 ml de colchicina (solução uso 0.0016% - SIGMA[®]) mantendo-se os frascos incubados por mais 5 minutos.

Após 72 horas de incubação, as culturas foram centrifugadas a 900 rpm, por 10 minutos. O meio sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo os linfócitos, foi submetido a hipotonização com solução de 2 ml de cloreto de potássio (KCI 0,075M) a 37°C. A cada 5 minutos foi adicionado mais 2 ml da solução de KCI e, ao final de 20 minutos, a hipotonização foi interrompida pela adição de 0,5 ml de fixador (3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético). A solução foi, então, centrifugada a 900 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, ao botão de células, foi adicionado 8 ml de fixador para a lavagem. Essa solução foi homogeneizada com auxílio de pipeta Pasteur e novamente centrifugada a 900 rpm, por mais 10 minutos. O procedimento de lavagem das células foi repetido por mais três vezes e, a seguir, o botão de células foi homogeneizado em 1 ml de fixador. As células lavadas foram, então, gotejadas sobre lâminas de microscopia extrafinas, limpas e desengorduradas.

4.2.2.4 Coloração das lâminas

Para coloração das lâminas, foi utilizada a técnica de bandamento GTG, na qual as sequências de proteínas não histônicas são digeridas com enzima tripsina e coradas com corante Giemsa. Essa técnica induz a formação de um padrão de bandas claras e escuras ao longo do comprimento dos cromossomos. Quando necessário, utilizou-se a técnica de bandamento G, onde a digestão de proteínas não histônicas é realizada com tampão borato e a coloração é feita com o corante Wright-Giemsa, que mantém o mesmo padrão de bandas.

a) Bandamento GTG

As lâminas foram mergulhadas em cuba contendo solução de tripsina diluída em tampão fosfato Sorënsen (pH 6,8), a 37°C, por 4 a 6 segundos. A seguir, foram lavadas em água corrente, coradas com corante Giemsa (4%) diluído em tampão fosfato Sorënsen (pH 6,8), durante 4 minutos e, novamente lavadas (água corrente) e secas em temperatura ambiente.

b) Bandamento G

As lâminas foram mergulhadas em cuba contendo solução de tampão borato (pH 9,2), a 60°C, durante 10 minutos. Decorrido esse tempo, as lâminas foram coradas com corante Wright-Giemsa, diluído em tampão borato a 50%, por cerca de 2 minutos. A seguir foram lavadas (água corrente) e secas em temperatura ambiente.

4.2.2.5 Análise do cariótipo

Para análise citogenética selecionou-se, de cada indivíduo, 12 células em fase prometafásica (resolução entre 800 a 1.200 bandas). Para tanto se utilizou o microscópio binocular (Olympus BX51), no aumento de 1250 vezes. As imagens dos cromossomos prometafásicos foram capturadas utilizando-se o Sistema Computacional para Análise de Cromossomo Humano - CROMHU (Atonus Engenharia de Sistemas Ltda.-Brasil). Para identificação das bandas foi utilizado o padrão estabelecido pelo *International System Cytogenetic Nomenclature (ISCN)* (Mitelman 1995).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Foram selecionados junto ao cadastrado do banco de dados da Seção de Genética Clínica do HRAC-USP, 16 indivíduos, sendo 5 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, os quais preencheram os critérios estabelecidos. O cariótipo de alta resolução permitiu detectar alterações citogenéticas estruturais em 25% dos indivíduos (casos 1-4). Em 3 indivíduos (casos 1-3) detectou-se deleções em regiões subteloméricas (cromossomos 4p, 9p e 18q) e, em 1 indivíduo (caso 4) detectou-se adição de segmento cromossômico na região telomérica do cromossomo 12p. A descrição clínica desses casos foi detalhada no item 5.1; os aspectos clínicos foram ilustrados nas figuras 7, 9, 11 e 13 e, os cariótipos de alta resolução, bem como os ideogramas dos cromossomos alterados, estão representados nas figuras 8, 10, 12 e 14. Os demais indivíduos (casos 5-16) tiveram cariótipo de alta resolução normal. No item 5.2 foram descritos os dados clínicos e de exames complementares desses casos (Tabela 2) e, ainda, ilustrados os aspectos clínicos (figuras 15 a 26).

5.1 DESCRIÇÃO CLÍNICA DOS INDIVÍDUOS COM ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DETECTADAS NO CARIÓTIPO DE ALTA RESOLUÇÃO

Caso 1: sexo feminino (Figura 7), primeira filha de casal normal e não consanguíneo.

Dados gestacionais, antecedentes pessoais e evolução: a gestação transcorreu sem intercorrências. A idade materna e paterna na época da concepção

eram, respectivamente, 29 e 28 anos. Nasceu de parto normal, a termo, com peso de 2,3 kg (P<3) e comprimento de 46 cm (P<3).

Levantamento da história familial: múltiplos abortos espontâneos foram referidos para os avôs maternos.

Exame físico na idade de 4 anos e 7 meses: peso 14 kg (P<3), altura 100 cm (P=3), perímetro cefálico 48 cm (P<3, corrigido para altura), distância intercantal interna 3,3 cm (75<P<97) e distância intercantal externa 9 cm (P>97). Apresentou déficit pôndero-estatural, microcefalia, frontal amplo, sobrancelhas arqueadas, olhos proeminentes, fendas palpebrais oblíquas para baixo, ptose palpebral, epicanto bilateral, obstrução do canal lacrimal, ectrópio de terço médio de pálpebra inferior discreto, coloboma de pálpebra inferior à direita, aparente hipertelorismo ocular, base nasal larga, hipoplasia de face média, fissura de lábio e palato, queixo pequeno, fosseta sacral, hipotonia, convulsão e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

Exames complementares:

- Eletroencefalograma: epilepsia
- Ultrassonografia renal: normal
- Avaliação radiológica: diminuição dos espaços vertebrais de L1-L3;
 vértebra lombar supranumerária e hipoplasia de crista ilíaca
- Ressonância nuclear magnética cranioencefálica: normal
- Estudo citogenético:
 - cariótipo convencional (450 bandas): 46, XX
 - cariótipo de alta resolução (Figura 8): 46,XX,del(4)(p16)
 - cariótipo de alta resolução dos pais: normais





Figura 7 - Aspectos clínicos do caso 1 nas idades de 3 meses (a e b) e 4 anos e 7 meses (c,d,e e).



Figura 8 - Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma.

Caso 2: sexo masculino (Figura 9), quarto filho do casal normal não consanguíneo.

Dados gestacionais, antecedentes pessoais e evolução: a gestação transcorreu sem intercorrências. A idade materna e paterna na época da concepção eram, respectivamente, 30 e 35 anos. Nasceu de parto normal, a termo, com peso de 3 kg (P=10), comprimento de 48 cm (P=25).

Levantamento da história familial: primeira e segunda gestação do casal resultou em natimortos com anencefalia.

Exame físico na idade de 1 ano e 8 meses: peso 12,7 kg (P=50), comprimento 85 cm (P=50), perímetro cefálico 48 cm (P=50). Apresentou face grosseira e hipotônica, fendas palpebrais alongadas, narinas antevertidas, micrognatia, fissura de palato, glossoptose, hérnia inguinal, criptorquidia, pregas palmares única, dígitos curtos e afilados, convulsão e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

Exames Complementares:

- Tomografia computadorizada de crânio: normal
- Ressonância nuclear magnética cranioencefálica: alterações inespecíficas de sinal na substância branca cerebral que podem estar relacionadas à desmielinização, isquemia ou gliose.
- Estudo citogenético:
 - cariótipo convencional (450 bandas): 46, XY
 - cariótipo de alta resolução (Figura 10): 46,XY,del(9)(p23)


Figura 9 - Aspectos clínicos do caso 2 na idade de 1 ano e 8 meses.



Figura 10 - Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma.

Caso 3: sexo masculino (Figura 11), filho único de casal normal e não consanguíneo.

Dados gestacionais, antecedentes pessoais e evolução: a gestação transcorreu sem intercorrências. A idade materna e paterna na época da concepção eram, respectivamente, 30 e 31 anos. Nasceu de parto normal, a termo, peso de

3.120g (P=10) e comprimento 48 cm (P=10) perímetro cefálico 34 cm (P=25), choro fraco. Cirurgia cardíaca aos 13 meses.

Levantamento da história familial: prima materna em primeiro grau com cardiopatia congênita.

Exame físico na idade de 6 anos e 2 meses: peso de 15,5 kg (P<3), altura de 103 cm (P<3), perímetro cefálico 50 cm (3<P<50). Apresentou déficit pônderoestatural, frontal estreito, sobrancelhas finas, fendas palpebrais estreitas e oblíquas para cima, aparente hipertelorismo ocular, base nasal baixa, nariz dorso-fletido, hipoplasia de face média, macrostomia, lábio superior fino, rima bucal inclinada para baixo, dentes pequenos, fissura de palato, orelha posteriormente rodada, dígitos e artelhos longos, sobreposição e clinodactilia de artelhos, cardiopatia congênita, perda auditiva condutiva bilateral, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e na aquisição da fala.

Exames complementares:

- Avaliação auditiva: perda auditiva condutiva
- Avaliação oftalmológica: normal
- Ecocardiograma: comunicação inter-atrial (CIA) e estenose pulmonar
- Ultrassonografia abdominal: normal
- Avaliação radiológica aos 5 anos: atraso na idade óssea (compatível com 4 anos)
- Ressonância nuclear magnética cranioencefálica: normal
- Estudo citogenético:
 - cariótipo convencional (450 bandas): 46,XY
 - cariótipo de alta resolução (Figura 12): 46,XY,del(18)(q22.2)





Figura 11 - Aspectos clínicos do caso 3 na idade de 6 anos e 2 meses.



Figura 12 - Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma.

Caso 4: sexo feminino (Figura 13), filha única de casal normal e não consanguíneo.

Dados gestacionais, antecedentes pessoais e evolução: a gestação transcorreu com dores abdominais e hipertensão arterial a partir do 4º mês e sangramento vaginal no final da gestação. A idade materna e paterna na época da concepção eram, respectivamente, 36 e 32 anos. Nasceu de parto normal, domiciliar, a termo e demorou a chorar.

Levantamento da história familial: fissura de lábio e palato foi referida em primo materno em terceiro grau.

Exame físico idade de 8 anos e 2 meses: peso de 14 kg (P<3) e comprimento de 95 cm (P<3). Apresentou déficit pôndero-estatural, microcefalia, frontal estreito, anoftalmia à direita, microftalmia à esquerda, lipodermóide à esquerda, nariz bulboso com hipoplasia de asa nasal, apêndice nasal, fissura de lábio e palato atípica, macrostomia, apêndices faciais e pré-auriculares, micrognatia, microtia bilateral, perda auditiva, dígitos afilados, dificuldade alimentar e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Reavaliação aos 17 anos mostrou grave atraso no desenvolvimento global: marcha ausente, sem aquisição de linguagem, ausência de contato.

Exames complementares:

- Ecocardiograma: normal
- Estudo citogenético:
 - cariótipo convencional (450 bandas): 46, XX
 - cariótipo de alta resolução (Figura 14): 46,XX,add(12)(p13.33)
 - cariótipo de alta resolução da mãe: normal



Figura 13 - Aspectos clínicos do caso 4 na idade de 8 anos e 2 meses.



Figura 14 - Cariótipo de alta resolução. a) prometáfase; b) ideograma.

5.2 DESCRIÇÃO CLÍNICA DOS INDIVÍDUOS SEM ALTERAÇÃO ESTRUTURAL DETECTADA NO CARIÓTIPO DE ALTA RESOLUÇÃO

A Tabela 2 contém os dados clínicos dos casos de 5 a 16 e, as figuras 15 a

26 ilustram os aspectos clínicos.

 Tabela 2 - Dados genético-clínicos dos indivíduos da amostra que não apresentaram alterações estruturais no cariótipo de alta resolução.

Indivíduo	Sexo	Idade	Sinais Clínicos	Dados gestacionais e perinatais/ antecedentes pessoais e familiares	Exames complementares
5 Figura 15	Μ	3a 3m	Déficit pôndero-estatural, microbraquicefalia, frontal amplo, sobrancelhas arqueadas, olhos proeminentes, cílios longos, hipertelorismo ocular, base nasal larga e alta, fissura de lábio e palato, queixo pequeno, clinodactilia de 4º artelho bilateral, hipoplasia ungueal de 2º artelho bilateralmente, distúrbio de deglutição, cardiopatia congênita, hipotonia, atraso na aquisição da fala, convulsão, ADNPM.	IMC: 21a / IPC: 35a G1P1A0 Envelhecimento precoce da placenta; oligohidrâmnio. Parto cesáreo; gestação a termo. PN=1.9g (P<3). Não há relato de casos similares ou de malformações na família. Aos 3a 3m: Peso= 8 kg (P<3) A= 79,5 cm (P<3) PC= 43 cm (P<3, corrigido para altura) DICI= 3,3 cm (P=97) DICE= 8,6 cm (P<97)	Cariótipo convencional: 46,XY Cariótipo de alta resolução: 46,XY Avaliação oftalmológica: obstrução lacrimal à esquerda. Ecocardiograma: comunicação inter-atrial.
6 Figura 16	F	12m	Déficit pôndero-estatural, microbraquicefalia, sinostose de sutura coronal, frontal plano, implantação anômala de cabelos na fronte, sobrancelhas arqueadas, ptose palpebral, fendas palpebrais estreitas e oblíquas para cima, opacidade de córnea, base nasal baixa, filtro longo, palato alto, convulsão, ADNPM.	 IMC: 22a / IPC: 28a G1P1A0 Gestação gemelar; sangramento no primeiro trimestre. Ultrassonografia no 4º mês gestacional mostrou malformação craniana. Parto cesáreo, pré-termo (8 meses) PN=2.200g (P<3). Insuficiência respiratória, permanecendo internada na Unidade de Terapia Intensiva durante 45 dias. Não há relato de casos similares ou de malformações na família. Aos 12 meses: Peso= 4,25 kg (P<3) A= 57,6 cm (P<3) PC= 33.5 cm (P<3, corrigido para altura). 	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Ultrassonografia cardíaca: normal Ultrassonografia abdominal: normal Ultrassonografia renal: normal Ressonância magnética crânio-encefálica: turricefalia; múltiplas áreas de encefalomalácea; imagem ovalar na profundidade do cérebro; ausência de imagem do corpo caloso, afilamento do tronco cerebral.

continua

7

Indivíduo	Sexo	Idade	Sinais Clínicos	Dados gestacionais e perinatais/ antecedentes pessoais e familiares	Exames complementares
7 Figura 17	F	5a10m	Déficit pôndero-estatural, frontal amplo, hemangioma frontal, fácies alongado, sobrancelhas arqueadas, sinofre, olhos grandes e proeminentes, lagoftalmia, ponte nasal alta, hipoplasia de face média, orelhas posteriormente rodadas e com hélice simplificado à esquerda, fissura de lábio e palato, queixo pequeno, dígitos longos e finos, hiperextensibilidade articular, cardiopatia congênita, dificuldade alimentar, dificuldade de sucção, hipotonia, convulsão, ADNPM.	IMC: 29a / IPC: 35a G2P2A0 Sem intercorrências gestacionais relevantes. Parto normal; a termo. PN= 2.200g (P<2) CN= 46 cm (P<5) PC= 34 cm (P=25) Genitora com micrognatia, olhos proeminentes e ponte nasal alta. Aos 5 anos e 10 meses: Peso= 12,5 kg (P) PC= 50 cm (P<50) DICI= 2,87 (P) DICE= 8,15 (P)	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Avaliação oftalmológica: estrabismo divergente em ambos os olhos e miopia baixa. Ecocardiograma: forame oval patente, insuficiência mitral de grau leve. Ultrassonografia transfontanela: normal Tomografia crânio-encefálica: disgenesia de corpo caloso.
8 Figura 18	F	14a	Déficit pôndero-estatural, fácies alongado, fendas palpebrais estreitas e inclinadas para cima, hipotonia bucal, queixo proeminente, fissura de palato, orelhas pequenas com hélice dobrado, mãos pequenas, dígitos pequenos, redução de pregas palmares, atraso na aquisição da fala, dificuldade de aprendizagem, distúrbio de comportamento, ADNPM.	IMC: 33a / IPC: 50a G5P5A0 Sem intercorrências gestacionais relevantes. Parto cesáreo, a termo. Não há relato de casos similares ou de outras malformações na família. Aos 14 anos: Peso= 37,7 kg (P=3) A= 144 cm (P<3).	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX

Indivíduo	Sexo	Idade	Sinais Clínicos	Dados gestacionais e perinatais/ antecedentes pessoais e familiares	Exames complementares
9 Figura 19	F	5a10m	Baixo ganho de peso, microcefalia, pontes supra- orbitárias rasas, sinofre, fendas palpebrais pequenas, hipertelorismo, narinas hipoplásicas, boca pequena, micrognatia, glossoptose, fissura de palato, orelhas pequenas com hélice dobrado e lobo hipoplásico, pescoço curto, dígitos longos, implantação baixa de polegar, cardiopatia congênita, pneumonia de repetição, convulsão, atraso de fala e dificuldade de aprendizagem, ADNPM.	IMC: 38a / IPC: 46a G1P1A0 Sem intercorrências gestacionais. Parto cesáreo, pré-termo (8meses), cianótico. PN= 1.800g (P<2) Não há relato de casos similares ou de malformações na família. Aos 5 anos e 10 meses: Peso= 13 kg (P<3) A= 105 cm (25 <p<50) PC= 48 cm (P<3) DICI= 2,2 cm (P<3) DICI= 6,2 cm (P<3) Fendas palpebrais= 1,9 cm.</p<50) 	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Ecocardiograma: comunicação inter-atrial. Tomografia computadorizada crânio-encefálica: normal
10 Figura 20	F	12a	Microcefalia, olhos proeminentes, fendas palpebrais alongadas e inclinadas para cima, micrognatia discreta, anquiloglossia, fissura de palato, orelhas pequenas, cardiopatia congênita, atraso de fala, distúrbio de comportamento, ADNPM.	IMC: 34a / IPC: 37a G4P4A0 Sem intercorrências gestacionais. Parto normal, a termo. PN= 2.800g (P<5) Genitora com crânio pequeno e irmã com queixo pequeno. Aos 6 anos e 10 meses: Peso= 17,2 kg (P=3) A= 108 cm (P<3) PC= 48.5cm (P=3)	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Ecocardiograma: comunicação inter-atrial . Ressonância magnética: pequena ectasia ventricular supra tentorial; cisternas basais, sulcos corticais e fissura encefálica de aspecto normal para a faixa etária; parênquima cerebral de morfologia normal; ausência de desvio das estruturas da linha média.

Indivíduo	Sexo	Idade	Sinais Clínicos	Dados gestacionais e perinatais/ antecedentes pessoais e familiares	Exames complementares
11 Figura 21	F	11a8m	Frontal estreito, olhos grandes e proeminentes, fendas palpebrais amplas e inclinadas para cima, estrabismo convergente, hipoplasia de face média, fissura de lábio e palato bilateral, prognatismo, orelhas com lobos anômalos, pregas palmares e digitais anômalas, camptodactilia de 4º e 5º dígitos à direita, artelhos longos, manchas hipocrômicas em membros, hipotonia generalizada, atraso na aquisição da fala, distúrbio de comportamento e dificuldade de aprendizagem, ADNPM.	IMC: 35a / IPC: 41a G3P3A0 Sangramento vaginal no inicio da gestação; miastemia grave. Parto normal, a termo. PN= 2.750g (P=10) CN= 49 cm (P=50) PC= 33 cm (P=10) Dificuldade alimentar ao nascimento sendo necessário uso de sonda naso-gástrica. Autismo em primos em primeiro grau; cardiopatia e pé torto congênito em prima em primeiro grau. Aos 11 anos e 8 meses: Peso= 45,7 kg (P<75) A= 151 cm (50 <p<75) PC= 54,5 cm (50<p<98) DICI= 3,1 cm (P>50) DICE= 10,1 cm (P<97)</p<98) </p<75) 	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Ecocardiograma: normal Ressonância magnética crânio-encefálico: normal
12 Figura 22	F	2a3m	Déficit pôndero-estatural, frontal estreito, implantação baixa de cabelos na fronte, sobrancelhas arqueadas, aparente hipertelorismo, olhos proeminentes, ptose palpebral, lagoftalmia direita, hipoplasia de face média, base nasal baixa, narinas hipoplásicas, , hipoplasia de pré-maxila, lábio inferior proeminente, prognatismo, fissura de palato, orelhas posteriormente rodadas, hipoplasia e displasia ungueal, obstrução respiratória, refluxo gastroesofágico, distúrbio de comportamento, ADNPM.	IMC: 32a G2P2A0 Uso de bebida alcoólica destilada durante toda a gestação. Parto normal, pré-termo. PN= 2.035g (P=10) CN=44,7 cm (P<2) PC= 30,5 cm (P<2) Choro fraco. Infecção neonatal permanecendo internada por 13 dias. Irmão com baixa estatura e distúrbio de comportamento. Aos 2 anos e 3 meses: Peso= 10,1 kg (P=3) A= 80,5 cm (P=3) PC= 45,5cm (P<3) DICI= 2.65 cm (P=50) DICE= 7,5 cm (50 <p<75).< th=""><th>Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Nasofaringoscopia: obstrução respiratória tipo II e amídalas hipertróficas.</th></p<75).<>	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Nasofaringoscopia: obstrução respiratória tipo II e amídalas hipertróficas.

Resultados

Indivíduo	Sexo	Idade	Sinais Clínicos	Dados gestacionais e perinatais/ antecedentes pessoais e familiares	Exames complementares
13 Figura 23	Μ	11a	Baixa estatura, fendas palpebrais estreitas, epicanto bilateral, hipoplasia de face média, base nasal larga, macrostomia, fissura de palato, freio lingual curto, laringotraqueomalacia, orelhas pequenas com lobos anômalos, mãos pequenas, prega palmar única bilateral, braquidactilia de dígitos e artelhos, polegares alargados, clinodactilia do 5º dígito bilateral, háluces alargados, hiperextensibilidade articular, fosseta sacral, hérnia inguinal bilateral, criptorquidia, micropênis, hipotonia, atraso de fala, distúrbio de comportamento e déficit de atenção, ADNPM.	IMC: 29a / IPC: 39a G5P5A0 Polihidrâmnio durante a gestação. Parto normal, pré-termo. PN= 3.540g (P=50) CN= 50 cm (P=50) PC= 34 cm (P=25) Fissura de lábio e palato em primos maternos (dois meninos e uma menina).	Cariótipo convencional: 46,XY Cariótipo de alta resolução: 46,XY Ecocardiograma: comunicação inter-atrial. Avaliação oftalmológica: hipermetropia e astigmatismo. Avaliação radiológica de coluna: normal.
14 Figura 24	Μ	1a2m	Déficit pôndero-estatural, frontal amplo e proeminente, sobrancelhas discretamente arqueadas, olhos encovados, fendas palpebral pequenas em S, aparente hipertelorismo, ponte nasal baixa, columela hipoplásica, narinas estreitas, filtro curto, boca pequena, fissura de palato, orelhas grandes e proeminentes, dígitos pequenos, ADNPM.	IMC: 23a / IPC: 33a G1P1A0 Infecção materna por toxoplasmose; oligoidrâmnio. Parto cesáreo, pré-termo (32 semanas). Sofrimento fetal. PN= 1.345g (P<2) CN= 38,5 cm (P<2) Não há relato de casos similares ou de malformações na família.	Cariótipo convencional: 46,XY Cariótipo de alta resolução: 46,XY Tomografia computadorizada crânio-encefálica: alteração de corpo caloso.

Conclusão

Indivíduc	Sexo	Idade	Sinais Clínicos	Dados gestacionais e perinatais/ antecedentes pessoais e familiares	Exames complementares
15 Figura 25	F	18a	Frontal estreito, cabelos abundantes, fendas palpebrais pequenas, estreitas e inclinadas para cima, hipoplasia malar, filtro curto, fissura de lábio, rima bucal inclinada para baixo, pescoço curto, dígitos pequenos, braquidactilia 5º dígito bilateral, hipoplasia e clinodactilia de háluces, encurtamento das pontas dos artelhos 2 e 3; braquidactilia acentuada de artelhos 4-5, perda auditiva, ausência de menarca, obesidade, ADNPM.	IMC: $45a / IPC$: $50a$ G3P3A0 Sem intercorrência gestacional. PA= 2.850g (10 <p<25) CN= 46 cm (P=5) PC= 34 cm (P=50) Não chorou ao nascimento. Não há relato de casos similares ou de malformações na família. Aos 18 anos: Peso= 80 kg (90<p<95) A= 1.70 cm (75<p<90) PC= 55 cm (P=50) DICI= 2,73 cm (3<p<25) DICE= 7,0 (P<3) Fendas palpebrais= 2,4 cm.</p<25) </p<90) </p<95) </p<25) 	Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Tomografia computadorizada crânio-encefálica: normal Ressonância magnética crânio-encefálica: normal Ultrassonografia pélvica: agenesia de ovário unilateral e útero infantil Avaliação audiológica: perda auditiva condutiva leve bilateral
16 Figura 26	F	1m20d	Fontanela ampla, discreto estreitamento bitemporal, implantação anômala de cabelos na fronte, olhos discretamente proeminentes, fendas palpebrais inclinadas para baixo, hipoplasia nasal, ponta nasal larga com discreta reentrância mediana, fissura de asa nasal, pré-maxila hipoplásica, fissura de lábio bilateral, discreta micrognatia, orelhas anômalas com agenesia da porção superior dos hélices e anti- hélices, estenose conduto auditivo externo bilateralmente, hipoplasia de artelhos, polidactilia pré e pós-axial de mãos, polidactilia pré e pós-axial de pés à esquerda, duplicação de polegar à esquerda, distância aumentada entre o polegar e o 2º artelho à esquerda, artelho acessório erre o polegar e 2º artelho a direita, aumento da distânci a entre o artelho acessório e o 2º artelho, agenesia ungueal de artelhos, ânus anteriorizado, ADNPM.	IMC: $36a / IPC$: $38a$ G3P2A1 Sangramento no terceiro mês gestacional. Parto cesáreo, a termo. PN= $3.970g (P<90)$ CN= $52 cm (75Aos 50 dias:Peso= 4,52 kg (P=25)C= 56,5 cm (P=50)PC= 36 cm (P=25).$	PCR (Reação em cadeia da polimerase) do líquido amniótico (aos 7 meses): Material biológico analisado não apresentou alterações nos locos analisados dos cromossomos 13 e 21. Entretanto, visualizou-se no loco MBP presença de 3 fragmentos do PCR, podendo sugerir trissomia do cromossomo 18. Resultado não confirmado pelo cariótipo convencional Cariótipo convencional: 46,XX Cariótipo de alta resolução: 46,XX Ultrassonografia (aos 5 meses): anormalidade de crânio, lábio e dígitos.

A= altura; ADNPM= atraso no desenvolvimento neuropsicomotor; a/m/d= idade em ano(s), mês (es) e dia(s) na época da avaliação; C= comprimento; CN= comprimento ao nascimento; DICE= distancia intercantal externa; DICI= distancia intercantal interna; F= feminino; g= grama (s); G_P_A_= n^o de gestações, partos e abortos; IMC= idade materna na concepção; IPC= idade paterna na concepção; M= masculino; P= percentil; PC= perímetro cefálico; PN= peso ao nascimento.

5.3 ASPECTOS CLÍNICOS DOS INDIVÍDUOS DA AMOSTRA QUE NÃO APRESENTARAM ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO CARIÓTIPO DE ALTA RESOLUÇÃO





Figura 15 - Aspectos clínicos do caso 5 nas idades de 14 meses (a) e 3 anos e 3 meses (b, c, e d).



Figura 16 - Aspectos clínicos do caso 6 na idade de 12 meses.



Figura 17 - Aspectos clínicos do caso 7 na idade de 5 anos e 10 meses.



Figura 18 - Aspectos clínicos do caso 8 na idade de 14 anos.



Figura 19 - Aspectos clínicos do caso 9 na idade de 5 anos e 10 meses.





е



Figura 20 - Aspectos clínicos do caso 10 na idade de 12 anos.



b









Figura 21 - Aspectos clínicos do caso 11 na idade de 11 anos.



f

Figura 22 - Aspectos clínicos do caso 12 na idade de 2 anos e 3 meses.





d

е



Figura 23 - Aspectos clínicos do caso 13 na idade de 11 anos.





Figura 24 - Aspectos clínicos do caso 14 nas idades de 7 meses (a e b) e 1 ano e 2 meses (c e d).



Figura 25 - Aspectos clínicos do caso 15 nas idades de 15 anos (a e b) e 18 anos (c e d).





d









Figura 26 - Aspectos clínicos do caso 16 na idade de 1 mês e 20 dias.



6 DISCUSSÃO

6.1 CASOS COM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA DETECTADA PELA TÉCNICA DE ALTA RESOLUÇÃO

No presente estudo, a análise citogenética pela técnica de alta resolução permitiu detectar alterações citogenéticas estruturais em 4 (25%) dos 16 indivíduos avaliados (casos 1-4). Essas alterações ocorreram em regiões cromossômicas terminais e, tinham, aproximadamente, 9 a 14 Mb. Sabe-se que esse tamanho de alteração pode ser identificado pelo estudo citogenético convencional. A identificação das alterações cromossômicas estruturais nos casos 1-4, somente pelo cariótipo de alta resolução, deve-se ao fato da coloração clara das bandas terminais, quando coradas pelo método do bandamento G, dificultar a visualização de rearranjos, nessas regiões, em cromossomos não distendidos (400-550 bandas). A técnica de alta resolução torna as bandas mais distendidas (800-1200 bandas) permitindo, assim, a visualização de sub-bandas. (Balikova et al 2007, Shinawi e Cheung 2008).

Do ponto de vista genômico, a região subtelomérica tem grande importância, uma vez que é rica em genes e frequentemente está envolvida em rearranjos cromossômicos (Saccone et al 1992, Joyce et al 2001, Andelid et al 2002, Balikova et al 2007). Alguns autores têm sugerido que rearranjos terminais que resultam em segmento aneuplóide e, consequentemente, em desequilíbrio da dosagem gênica podem representar uma causa importante de atraso mental associado a múltiplas anomalias congênitas (AM/MAC) (Joyce et al 2001, Anderlid et al 2002, Velagaleti et al 2005). Estima-se que cerca de 3-7% dos indivíduos com AM/MAC têm alterações

subteloméricas não balanceadas, tornando o screening de regiões terminais parte da rotina de avaliação genética desses indivíduos (Flint et al 1995, Biesecker 2002, De Vries et al 2003, Koolen 2004, Balikova et al 2007, Battaglia et al 2007). Estudos da região terminal têm mostrado que alguns rearranjos presentes nos indivíduos afetados também são vistos em indivíduos fenotipicamente normais, e, portanto, podem não estar relacionado ao fenótipo alterado (Joyce et al 2001, Balikova et al 2007). Balikova et al (2007), por meio de screening molecular (FISH, MLPA, CGHa) de regiões subteloméricas, identificaram rearranjos não balanceados, de diferentes tamanhos (>1Mb a 7,8 Mb) em 11 indivíduos que apresentavam múltiplas anomalias congênitas com, ou sem, atraso mental. Todas as alterações encontradas foram herdadas de um dos genitores, fenotipicamente normal. De acordo com os autores, é difícil supor que deleções grandes, como algumas detectadas (3,6 a 7,8 Mb), não estejam causando o fenótipo alterado, uma vez que essas regiões contem muitos genes. No presente estudo, deleções grandes (9 a 14 Mb) foram detectadas nos casos 1-3 (del 4p16, del 9p23 e 18q22.2, respectivamente) (Figuras 27-29; Anexo 2) e, portanto, podem ser consideradas responsáveis pelos respectivos fenótipos. Em relação ao caso 4, estima-se, pelo tamanho da banda, que o segmento adicional detectado (de origem desconhecida) tenha cerca de 10 Mb, e, portanto, supõe-se que esteja relacionado ao fenótipo do indivíduo.

A correlação fenotípica com os achados citogenéticos dos casos 1 a 4 foram discutidas abaixo.

Caso 1

O caso 1 apresentou deleção subtelomérica no braço curto do cromossomo 4, na região 4p16→4pter (Figura 8). Análise no programa *MapViewer* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview) mostrou que essa região tem cerca de 10 Mb de tamanho e compreende cerca de 205 genes (Anexo 2: Figura 27 e Tabela 3).

A deleção do braço curto do cromossomo 4 caracteriza a síndrome de Wolf-Hirschhorn (SWH; OMIM #194190) (OMIM 2009a). Trata-se de síndrome de genes contíguos, que cursa com atraso no crescimento pré e pós-natal, microcefalia, hipertelorismo, glabela proeminente, sobrancelhas arqueadas, epicanto, fissura de lábio ou palato, defeitos cardíacos, hipotonia, atraso mental e convulsões. Sua frequência é estimada em 1 para 50.000 nascidos vivos, com predileção feminina de 2:1 (Lurie et al 1980, Goodman e Gorlin 1983, Maas et al 2008). Em 87% dos casos, é causada por deleção intersticial *de novo*, preferencialmente de origem paterna, do braço curto do cromossomo 4. O restante, deve-se a rearranjos cromossômicos, geralmente translocações recíprocas, envolvendo essa região (Lurie et al 1980, Wieczorek et al 2000). Embora a extensão da deleção 4p seja variável, considera-se a hemizigosidade da região terminal 4p16.3 como causa do fenótipo (Concolino et al 2007). Mapeamento da deleção em diferentes indivíduos com SWH permitiu identificar dois locos candidatos: loco WHSCR e loco WHSCR-2. O loco WHSCR contém o gene WHSC2 e a parte final 3' do gene WHSC1. O loco WHSCR-2 contém o gene LETM1 e a parte final 5' do gene WHSCI. Portanto a deleção do gene WHSC1 tem sido considerada responsável pela aparência facial típica dos indivíduos com SWH. Como mostra a Figura 27 (Anexo 2), a região cromossômica deletada, no caso 1, inclui ambos os locos candidatos para SWH. Por outro lado,

clinicamente, esse indivíduo apresentou, entre outros achados, aparência facial típica, atraso mental, atraso do crescimento, hipotonia congênita e convulsões, considerados como critério mínimo para estabelecimento diagnóstico clínico da SWH (Zollino et al 2003).

Caso 2

O caso 2 apresentou deleção subtelomérica no braço curto do cromossomo 9 na região 9p23→9pter (Figura 10). Análise no programa *MapViewer* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview) mostrou que essa região tem cerca de 14 Mb de tamanho e compreende cerca de 94 genes (Anexo 2: Figura 28 e Tabela 4).

A deleção do 9p representa quadro genético conhecido como síndrome da deleção do 9p (OMIM #158170)(OMIM 2009e) que, clinicamente, cursa trigonocefalia associada a fendas palpebrais inclinadas para cima, epicanto, narinas antevertidas. filtro orelhas pequenas malformadas, longo, е cardiopatia. hipospadia/criptorquidia e atraso mental (Huret et al 1988, Jehee et al 2005). Outros achados menos frequentes incluem: hipoplasia de face média, hipertelorismo, microstomia, micrognatia, pescoco curto, hipertelorismo mamilar, anomalia unqueal e hipotonia (Alfi et al 1973, Young et al 1982, 1983, Huret et al 1988, Hou 2003). Estudos recentes têm dividido os indivíduos com a deleção 9p em dois grupos distintos: um que inclui o fenótipo típico da síndrome da deleção do 9p com trigonocefalia e o outro, sem trigonocefalia (Barbaro et al 2009). O tamanho da deleção do 9p é variável e a região crítica, para o fenótipo da síndrome, tem sido mapeada para um segmento de aproximadamente 4,7 Mb na região 9p22.2→p23 (Kawara et al 2006). Recentemente, Swinkels et al (2008), utilizando técnicas de

citogenética molecular, restringiu a região candidata para aproximadamente 300Kb no 9p22.3.No caso 2, do presente estudo, o ponto de quebra da deleção não foi definido com precisão, no entanto, envolve a banda 9p23 e estende-se até a região mais distal no 9p24. O envolvimento da região 9p23, possivelmente, justifica a presença de alguns sinais clínicos da síndrome da deleção do 9p, observados no caso 2, tais como: narinas antevertidas, filtro longo, micrognatia, hipotonia e atraso mental. Ausência de trigonocefalia, no presente caso, pode ser justificada pelo não envolvimento da região 9p22.3, considerada candidata para o fenótipo típico da síndrome da deleção do 9p, o qual inclui esse achado clínico. Criptorquidia, outro achado presente no caso 2, tem sido descrito em indivíduos com deleção mais distal do 9p e que apresentam a desordem de desenvolvimento gonadal com sexo reverso. Nesses indivíduos, o fenótipo gonadal varia desde disgenesia gonadal completa a criptorquidia/testículo hipoplásico. A região candidata para essas anomalias está localizada em 9p24.3 (Barbaro et al 2009), região essa, alterada no caso 2 do presente estudo.

E interessante notar que, o caso 2 apresentou fissura de palato, achado não observado em indivíduos com a síndrome da deleção do 9p. A fissura de palato, nesse indivíduo, está associada a micrognatia e glossoptose, caracterizando a seqüência de Robin (OMIM %261800)(OMIM 2009g). Há um consenso, entre a maioria dos autores, em considerar que a hipoplasia mandibular é a anomalia primária na sequência de Robin e, que essa leva a glossoptose que, por sua vez, interfere no fechamento do palato (Zechi 1998). É possível que a fissura de palato, no caso 2, tenha ocorrido em conseqüência da hipoplasia mandibular que é um achado pertencente ao quadro clínico da síndrome da deleção do 9p.

Caso 3

O caso 3 apresentou deleção subtelomérica no braço curto do cromossomo 18 na região 18q22.2→18qter (Figura 12). Análise no programa *MapViewer* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview) mostrou que essa região tem cerca de 14 Mb de tamanho e compreende cerca de 42 genes (Anexo 2: Figura 29 e Tabela 5).

A deleção parcial do braço longo do cromossomo 18, também conhecida como síndrome da deleção 18q (OMIM #601808)(OMIM 2009f), leva a fenótipo altamente variável que inclui déficit de crescimento, hipotonia, atraso no desenvolvimento cognitivo, microcefalia, atraso na mielinização cerebral, hipertelorismo ocular, hipoplasia da face média, fissura orofacial, rima bucal inclinada para baixo, prognatismo, estenose de conduto auditivo externo, implantação baixa de polegar, anomalia geniturinária, deformidade de pés, perda auditiva e deficiência de hormônio de crescimento (Strathdee et al 1995, Cody et al 1999 e 2009, Veltman et al 2003, Feenstra et al 2007). O tamanho das deleções terminais varia de 0,5-40 Mb (Feenstra et al 2007, Heard et al 2009) e a hemizigose de diferentes locos do 18q está associada a diferentes características fenotípicas. Por exemplo: a região 18q21.2→q21.3 é considerada crítica para microcefalia; a região 18q21.2-yter, para baixa estatura e, a região 18q22.3→q23, para fissura de palato, atresia aural congênita, deficiência do hormônio de crescimento e atraso na mielinização cerebral (Kline et al 1993, Strathdee et al 1995, Cody et al 1999, 2007,2009, Veltman et al 2003, Dostal et al 2006, Dostal, Nemeckova e Gaillyova 2009, Feenstra et al 2007). A deleção presente no caso 3, desse estudo, está localizada na região 18q22.2-yter e justifica o quadro clínico desse indivíduo. O não envolvimento da região 18q21.2

→q21.3, crítica para microcefalia, justifica a ausência desse achado. Por outro lado, embora a deleção, presente no caso 3, envolva a região crítica para atresia aural (18q22.3→18q23), esse sinal clínico estava ausente. Atraso de mielinização cerebral e deficiência de hormônio de crescimento, mapeados para a mesma região, não foram investigados no caso.

Caso 4

O caso 4 apresentou adição de um segmento cromossômico, de origem desconhecida, estimado em cerca de 10Mb, na região telomérica do cromossomo 12p13.3 (Figura 14). Clinicamente, o caso 4 apresenta alguns achados tais como anoftalmia/microftalmia, lipodermóide, apêndices faciais e pré-auriculares, fissura lateral e microtia bilateral, que fazem parte do espectro óculo-aurículo-vertebral (EOAV; OMIM %164210)(OMIM 2009d). As anomalias craniofaciais observadas nesse espectro são decorrentes de alteração no desenvolvimento normal do primeiro e do segundo arcos branquiais e apresentam expressividade variável e etiologia heterogênea. Embora raras, alterações citogenéticas envolvendo os cromossomos 5p, 6q, 7, 8q, 9,18, 21, 22q e X foram descritas (Cohen et al 1989, Gorlin et al 2001, Josifova, Patton e Marks 2004, Descartes 2006, Ala-Mello et al 2008). Em relação ao caso 4, do presente estudo, apesar da sobreposição clínica com o EOAV, a aparência facial difere da observada em indivíduos com essa condição. Em adição, o grave atraso no desenvolvimento neuropsicomotor no caso 4, não é achado comum em indivíduos com o EOAV (Cohen et al 1989, Vendramini-Pittoli e Kokitsu-Nakata 2009). Possivelmente essa diferença clínica e fenotípica entre o caso 4 e indivíduos com EOAV está relacionada ao segmento cromossômico adicional, presente no caso 4. Embora a origem do segmento não

pudesse, ainda, ser identificada é de se supor que, devido ao seu tamanho (10 Mb), contenha genes que possam estar relacionados ao desenvolvimento craniofacial e neurológico. A identificação da origem do segmento cromossômico adicional poderia auxiliar na compreensão do quadro clínico do caso 4 e, ainda, na identificação de possíveis genes candidatos relacionados ao EOAV.

6.2 CASOS QUE NÃO APRESENTARAM ALTERAÇÃO CITOGENÉTICA DETECTADA PELA TÉCNICA DE ALTA RESOLUÇÃO

Em relação ao grupo de indivíduos, aqui estudados, que apresentaram cariótipo de alta resolução normal (casos 5 a 16), é possível que, no mínimo, uma parcela tenha pequenas alterações citogenéticas não detectadas pela metodologia utilizada. Isso se deve ao fato de que deleções, duplicações e rearranjos menores que 3Mb, frequentemente relacionados a quadros malformativos, não são detectados pelo cariótipo de alta resolução (Joyce et al 2001, Anderlid et al 2002, De Vries et al 2003, Velagaleti et al 2005, Balikova et al 2007, Shinawi e Cheung 2008). Nesses casos, o emprego de técnicas moleculares, tais como FISH, MLPA e o CGHa são fundamentais na identificação dessas alterações (De Vries et al 2003, Balikova et al 2007, Jehee et al 2008 e Shinawi e Cheung 2008). Em uma amostra de indivíduos com craniosinostose sindrômica, Jehee et al (2008) detectaram alteração citogenética em 20% dos casos submetidos ao estudo citogenético convencional. Quando técnicas moleculares tais como CGHa, MLPA e análise de segregação de polimorfismos por microsatélite foram empregadas, essa frequência aumentou para 42%. Analisando os casos da presente amostra, que tiveram cariótipo de alta resolução normal, observa-se que craniosinostose é um dos

achados do caso 6 (Tabela 2; figura 16) e, portanto, a possibilidade do quadro clínico desse indivíduo estar relacionado à alteração citogenética não detectada pela técnica de alta resolução não pode ser excluída. Da mesma forma, estudo citogenético recente em indivíduos com SWH têm demonstrado que a deleção do 4p, em cerca de 50% dos indivíduos, só pode ser detectada por meio de técnicas moleculares, incluindo a técnica de FISH, com banda específica para a região candidata da SWH, e a técnica de CGHa (Battaglia, Fillippi e Carey 2008). No presente estudo, o quadro clínico e, principalmente, a aparência facial dos casos 5, 7 e 14 (Tabela 2; Figuras 15, 17 e 24), são similares à dos indivíduos com SWH. Considerando que esses indivíduos tiveram cariótipo de alta resolução normal, é possível que a análise molecular da região 4p16 auxilie no estabelecimento diagnóstico.

Os demais casos aqui estudados (casos 8-11, 13, 15 e 16) apresentaram combinações de sinais clínicos que não se enquadram em síndromes cromossômicas conhecidas. No entanto, é possível supor que, em alguns casos, o fenótipo possa estar relacionado a pequenas alterações citogenéticas não identificadas pelo cariótipo de alta resolução. Nesses casos a utilização de técnicas moleculares é de fundamental importância.



7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A frequência alta (25%) de alterações cromossômicas estruturais em regiões cromossômicas terminais (teloméricas e subteloméricas) mostra que a técnica de alta resolução é útil na identificação de alterações nessas regiões;
- Indivíduos com anomalias craniofaciais e atraso mental, sem diagnóstico genetico-clínico definido, cujo cariótipo convencional foi normal, devem ser, submetidos à análise dos cromossomos por meio do cariótipo de alta resolução antes do procedimento de CGH-array;
- Indivíduos com quadro clínico e aparência facial da SWH, que tiveram cariótipo de alta resolução normal, devem ser submetidos à análise molecular da região 4p e, de forma geral, indivíduos com anomalias craniofaciais e atraso mental, cujo cariótipo de alta resolução foi normal, devem ser submetidos à varredura cromossômicos por meio de técnicas moleculares (MLPA, CGHa);
- A técnica de cariótipo de alta resolução deve ser introduzida na rotina de investigação diagnóstica do Laboratório de Citogenética do HRAC-USP.


8 REFERÊNCIAS

Ala-Mello S, Siggberg L, Knuutila S, von Koskull H, Taskinen M, Peippo M. Further evidence for a relationship between the 5p15 chromosome region and the oculoauriculovertebral anomaly. Am J Med Genet. 2008;146A(19):2490-4.

Alfi O, Donnell GN, Crandall BF, Derencenyi A, Menon R. Delection of the short arm of chromosome n. 9 (46,9p–): a new deletion syndrome. Ann Genet. 1973;16(1):17-22.

Anderlid BM, Schoumans J, Annerén G, Sahlén S, Kyllerman M, Vujic M, et al. Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. Am J Med Genet. 2002;107(4):275-84.

Balci S, Engiz O, Yilmaz Z, Baltaci V. Partial trisomy (11;22) syndrome with manifestations of Goldenhar sequence due to maternal balanced t(11;22). Genet Couns. 2006;17(3):281-9.

Balikova I, Menten B, Ravel T, Caignec C, Thienpont B, Urbina M, et al. Subtelomeric Imbalances in Phenotypically Normal Individuals.Hum Mutat. 2007;28(10), 958-67.

Barbaro M, Balsamo A, Anderlid BM, Myhre AG, Gennari M, Nicoletti A, et al. Characterization of deletions at 9p affecting the candidate regions for sex reversal and deletion 9p syndrome by MLPA. Eur J Hum Genet. 2009; 1-9.

Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL, editors. The AGT (Association of Genetic Technologists) cytogenetics laboratory manual. 3rd. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 107-10.

Battaglia A, Carey JC, Cederholm P, Viskochil DH, Brothman AR, Galasso C. Natural history of Wolf–Hirschhorn syndrome: experience with 15 cases. Pediatrics. 1999; 103(4 pt 1): 830-6.

Battaglia A, Carey JC. Wolf-Hirschhorn syndrome and Pitt-Rogers-Danks syndrome. Am J Med Genet 1998; 75(5): 541.

Battaglia A, Carey JC. Wolf–Hirschhorn syndrome and the 4p-related syndromes. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2008; 148C (4): 241-3.

Battaglia A, Filippi T, Carey JC. Update on the clinical features and natural history of Wolf–Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. Am J Med Genet. 2008; 148C(4): 246-51.

Battaglia A, Novelli A, Ceccarini C, Bernardini L, Carey JC. Subtelomeric analysis detects a familial 10p;12p rearrangement in two relatives with a distinct syndrome. Am J Med Genet A. 2007;143(2):184-8.

Beiguelman B. Citogenética humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982.

Bendavid C, Haddad BR, Griffin A, Huizing M, Dubourg C, Gicquel I, et al. Multicolour FISH and quantitative PCR can detect submicroscopic deletions in holoprosencephaly patients with a normal karyotype. J Med Genet. 2006;43(6):496-500.

Berend SA, Horwitz J, McCaskill C, Shaffer LG. Identification of uniparental disomy following prenatal detection of Robertsonian translocations and isochromosomes Am J Hum Genet. 2000; 66 (6):1787-93.

Bergemann AD, Cole F, Hirschhorn K. The etiology of the Wolf-Hirschhorn syndrome. Trends Genet. 2005; 21(3):188-95.

Biesecker LG. The end of the beginning of chromosome ends. Am J Med Genet. 2002;107:263-266.

Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Exp Cell Res. 1968; 49(1): 219-22.

Celep F, Karagüzel A, Ozeren M, Bozkaya H. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006;127(1):106-9.

Chen CP, Chern SR, Lin SP, Lin CC, Li YC, Wang TH, et al. A paternally derived inverted duplication of distal 14q with a terminal 14q deletion. Am J Med Genet A. 2005;139(2):146–50.

Cobourne MT. The complex genetics of cleft lip and palate. Eur J. Orthod.2004;26(1): 7-16.

Cody JD, Ghidoni PD, DuPont BR, Hale DE, Hilsenbeck SG, Stratton RF, et al. Congenital anomalies and anthropometry of 42 individuals with deletions of chromosome 18q. Am J Med Genet. 1999;85(5):455-62.

Cody JD, Heard PL, Crandall AC, Carter EM, Li J, Hardies LJ, et al. Narrowing critical regions and determining penetrance for selected 18q- phenotypes. Am J Med Genet. 2009;149A:1421-30.

Cody JD, Sebold C, Malik A, Heard P, Carter E, Crandall A, et al. Recurrent interstitial deletions of proximal 18q: a new syndrome involving expressive speech delay. Am J Med GenetA. 2007;143(11):1181-90.

Cohen Jr MM, Rollnick BR, Kaye CI: Oculoauriculovertebral spectrum: an updated critique. Cleft Palate J 1989; 26: 276–86.

Concolino D, Rossi E, Strisciuglio P, Iembo MA, Giorda R, Ciccone R, et al. Deletion of a 760 kb region at 4p16 determines the prenatal and postnatal growth retardation characteristic of Wolf-Hirschhorn syndrome. J Med Genet. 2007; 44(10): 647-50.

Dempsey MA, Schwartz S, Waggoner DJ. Mosaicism del (22)(q11.2q11.2) / dup(22) (q11.2q11.2) in a patient with features of 22q11.2 deletion syndrome. Am J Med Genet. 2007;143A(10):1082-6.

Descartes M. Oculoauriculovertebral spectrum with 5p15.33-pter deletion. Clin Dysmorphol. 2006;15(3):153-4.

DeScipio C, Spinner NB, Kaur M, Yaeger D, Conlin L K, Ambrosini A, et al. Fine-Mapping Subtelomeric Deletions and Duplications by Comparative Genomic Hybridization in 42 Individuals. Am J Med Genet. 2008;146A:730-739.

De Vries BBA, Winter R, Schinzel A, Van Ravenswwaaij-Arts C: Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. J Med Genet. 2003; 40: 385-98.

Dostal A, Nemeckova J, Gaillyova R. The 18q deletion syndrome and analysis of the critical region for orofacial cleft at 18q22.3. J Craniomaxillofac Surg. 2009;37(5):272-5.

Dostal A, Nemeckova J, Gaillyova R, Vranova V, Zezulkova D, Lejska M, et al. Identification of 2.3-Mb gene locus for congenital aural atresia in 18q22.3 deletion: a case report analyzed by comparative genomic hybridization. Otol Neurotol. 2006;27(3):427-32.

Douet-Guilbert N, Marical H, Pinson L, Herry A, Le Bris MJ, Morel F, De Braekeleer M. Characterisation of supernumerary chromosomal markers: a study of 13 cases. Cytogenet Genome Res. 2007;116(1-2):18-23.

Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, et al. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. Am J Med Genet. 1992;44(2):261-8.

Engiz O, Balci S, Unsal M, Ozer S, Oguz KK, Aktas D. 31 cases with oculoauriculovertebral dysplasia (Goldenhar syndrome): clinical, neuroradiologic, audiologic and cytogenetic findings. Genet Couns. 2007;18(3):277-88.

Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, et al. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. Am J Hum Genet. 2003; 73(5):1027-40.

Evans AK, Rahbar R, Rogers GF, Mulliken JB,Volk M, Robin sequence: A retrospective review of 115 patients. Int J Ped Otorhinolaryngology. 2006;70, 973-80.

Feenstra I, Vissers LE, Orsel M, van Kessel AG, Brunner HG, Veltman JA, et al. Genotype phenotype mapping of chromosome 18q deletions by high resolution array CGH: an update of the phenotypic map. Am J Med GenetA. 2007;143(16):1858-67.

Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A. Signalling interactions during facial development. Mech Dev. 1998; 75(1-2): 3-28.

Francke U. Digitized and differentially shaded human chromosome ideograms for genomic applications. Cytogenet Cell Genet 1994; 65(3): 206-18.

Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. Nat Genet.1995;9:132-140.

García-Castillo H, Vásquez-Velásquez AI, Rivera H and Barros-Núñez P. Clinical and genetic heterogeneity in patients with mosaic variegated aneuploidy: delineation of clinical subtypes Am J Med GenetA. 2008; 146(13):1687-95.

Goodman R, Gorlin R. The Malformed Infant and Child.Oxford University Press: New York; 90. 1983.

Gorlin RJ, Cohen Junior MM, Hennekam RCM. Syndromes of the head and neck. 4 th.ed. Oxford: Oxford University Press. 2001.

Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. J Med Genet. 2005; 42(1):8-16.

Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat Rev Genet. 2001;2(4):280-91.

Heard PL, Carter EM, Crandall AC, Sebold C, Hale DE, Cody JD. High resolution genomic analysis of 18q- using oligomicroarray comparative genomic hybridization (aCGH). Am J Med Genet. 2009;149A:1431-7.

Horovitz DD, Llerena Junior JC, Mattos RA. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil:panorama atual. Cad Saude Publica. 2005;21(4):1055-64.

Hou JW. Del(9p) syndrome: report of four cases. Acta Paediatr Taiwan. 2003;44(1):50-3.

Huret JL, Leonard C, Foresteir B, Rethore M. Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. J Med Genet. 1988;25(11):741-9.

Hyun-Kyung P, Hee-Jin K, Hyun-Jun K, Sung-Hee H, Young-Jae K, and Sun-Hee K. Screening of Subtelomeric Rearrangements in 100 Korean Pediatric Patients with Unexplained Mental Retardation and Anomalies Using Subtelomeric FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). J Korean Med Sci. 2008; 23: 573-8.

Jehee FS, Johnson D, Alonso LG, Cavalcanti DP, Sá Moreira E, Alberto FL, et al. Molecular screening for microdeletions at 9p22-p24 and 11q23-q24 in a large cohort of patients with trigonocephaly. Clin Genet. 2005;67(6):503-10.

Jehee FS, Krepischi-Santos AC, Rocha KM, Cavalcanti DP, Kim CA, Bertola DR, et al. High frequency of submicroscopic chromosomal imbalances in patients with syndromic craniosynostosis detected by a combined approach of microsatellite segregation analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification and array-based comparative genome hybridisation. J Med Genet. 2008;45(7):447-50.

Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. Dev Dyn. 2006; 235(5):1152-66.

Jones GH, Franklin FC. Meiotic crossing-over: obligation and interference. Cell. 2006; 28;126(2):246-8.

Josifova DJ, Patton MA, Marks K. Oculoauriculovertebral spectrum phenotype caused by an unbalanced t(5;8)(p15.31;p23.1) rearrangement. Clin Dysmorphol. 2004;13(3):151-3.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Genética médica. 2a ed. Tradução por Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 1999. Tradução de: Medical genetics.

Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. Hum Genet. 2001;109 :440-451.

Jugessur A, Murray JC. Orofacial clefting: recent insights into a complex trait. Curr Opin Genet Dev. 2005;15(3):270-8.

Kant SG, Van Haeringen A, Bakker E, Stec I, Donnai D, Mollevanger P, et al. Pitt-Rogers-Danks syndrome and Wolf-Hirschhorn syndrome are caused by a deletion in the same region on chromosome 4p16.3. J Med Genet. 1997;34(7):569-72.

Kawara H, Yamamoto T, Harada N, Yoshiura K, Niikawa N, Nishimura A, et al. Narrowing Candidate Region for Monosomy 9p Syndrome to a 4.7-Mb Segment at 9p22.2-p23. Am J Med Genet. 2006;140A:373-7.

Kline AD, White ME, Wapner R, Rojas K, Biesecker LG, Kamholz J, Zackai E, et al Molecular analysis of the18q- syndrome-and correlation with phenotype. Am J Hum Genet.1993;52:895-906.

Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements J Med Genet. 2001;38(8):497–507.

Kotzot D, Haberlandt E, Fauth C, Baumgartner S, Scholl-Burgi S, Utermann G. Del(18)(q12.2q21.1) caused by a paternal sister chromatid rearrangement in a developmentally delayed girl. Am J Med GenetA. 2005;135(3):304-7.

Kriek M, White SJ, Bouma MC, Dauwerse HG, Hansson KBM, Nijhuis JV, et al. Genomic imbalances in mental retardation. J Med Genet. 2004;41:249-255.

Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. Eur J Hum Genet. 2004; 12(7): 513-20.

Lurie IW, Lazjuk GI, Ussova YI, Presman EB, Gurevich DB. The Wolf-Hirschhorn syndrome. I. Genetics. Clin Genet. 1980;17(6):375-84.

Maas NM, Van Buggenhout G, Hannes F, Thienpont B, Sanlaville D, Kok K, et al. Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). J Med Genet. 2008;45(2):71-80.

Mencarelli MA, Katzaki E, Papa FT, Sampieri K, Caselli R, Uliana V, et al. Private inherited microdeletion/microduplications: implications in clinical practice. Eur J Med Genet. 2008; 51(5):409-16.

Miller OJ, Therman E. Human chromosomes. 4th ed. New York: Springer; 2001.

Mitelman F, editor. ISCN 1995: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger; 1995.

Morales C, Sánchez A, Bruguera J, Margarit E, Borrell A, Borobio V, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. Am J Med Genet A. 2008; 146(1):66-70.

Morris-Kay GM. The head. In: Ferretti P, Copp A, Tickle C, Moore G, editors. Embryos, genes and birth defects. 2nd.ed. Chichester: Wiley Sons; 2006. p. 301-39.

Nie X, Luukko K, Kettunen P. BMP signalling in craniofacial development. Int J Dev Biol. 2006; 50(6): 511-21.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson e Thompson: genética médica 6a. ed. tradução Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. Tradução de: Thompson & Thompson genetics in medicine.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. #194190: Wolf-hirschhorn syndrome; WHS. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009a. [6 jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=194190.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. #192430: DiGeorge syndrome; DGS. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009b. [6 jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=192430.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. #188400: Velo-cardio-facial syndrome; VCFS. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009c. [6 jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=188400.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. %164210: Óculo-aurículo-vertebral spectro; OAVS. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009d [6 Jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=164210.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. #158170: Chromosomal 9p deletion syndrome. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009e [6 Jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=158170.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. #601808: Chromosomal 18q deletion syndrome. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009f [6 Jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601808.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. %261800: Pierre Robin syndrome; PRS. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009g [6 Jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=261800.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. #262350: Pitt Rogers Danks syndrome; PRDS. [homepage in internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009h. [6 jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=262350.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. 236100: Holoprosencephaly, familial alobar HPE, familial; HPEC arhinencephaly holoprosencephaly 1, included; HPE1, included; cyclopia, included [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009i. [6 jan 2009] Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=236100.

Orioli IM, Castilla EE. Clinical epidemiologic study of holoprosencephaly in South America. Am J Med Genet A. 2007;143(24):3088-99.

Prescott KR, Wilkie AOM. Genetic aspects of birth defects: new understandings of old problems. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2007; 92(4):308-14.

Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation, Am. J. Med. Genet. 2006;140 (19) 2063-74.

Rauch A, Schellmoser S, Kraus C, Dörr HG, Trautmanr U, Altherr MR, et al. First know microdeletion within the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. Am J Med Genet. 2001; 99(4): 338-42.

Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G.. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. Proc Natl Acad Sci.1992; 89:4913±17.

Sarkozi A, Wysynski DF, Czeizel AE. Oral crefts with associated anomalies: findings in the hungarian congenital abnormality registry. BMC Oral Health. 2005; 5:4.

Schinzel AA. Cardiovascular defects associated with chromosomal aberrations and malformation syndromes. Prog Med Genet. 1983;5:303-79.

Schinzel A. Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man. 2th ed. New York: Walter de Gruyter; 2001.

Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. Hum Reprod Update.2004;10(3): 221-6.

Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2007; 145C(4):335-45.

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

Shao L, Shaw CA, Lu X-Y, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, et al. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: A study of 5,380 cases. Am J Med Genet. 2008;146A:2242-51.

Sharkey FH, Maher E, FitzPatrick DR. Chromosome analysis: what and when to request. Arch Dis Child. 2005;90(12):1264-9.

Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation(array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. J Med Genet. 2004; 41(4):241-8.

Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. Drug Discov Today. 2008 (17-18):760-70. Review.

Stanier P, Moore G. The relationship between genotype and phenotype: some basic concepts In: Ferretti P, Copp A, Tickle C, Moore G, editores. Embryos, genes and birth defects. 2nd.ed. Chichester: Wiley & Sons; 2006. p. 1-18.

Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, et al. Small supernumerary marker chromosomes (SMCs): genotype-phenotype correlation and classification. Hum Genet. 2003;114(1):51-67.

Stevens CA, Qumsiyeh MB. Syndromal frontonasal dysostosis in a child with a complex translocation involving chromosomes 3, 7, and 11. Am J Med Genet. 1995; 55(4):494-7.

Strathdee G, Zackai EH, Shapiro R, Kamholz J, Overhauser J. Analysis of the clinical variation seen in patients with 18q terminal deletions. Am J Med Genet. 1995;59(4):476-83.

Suri M. Craniofacial syndromes. Semin Fetal Neonatal Med. 2005; 10(3): 243-57.

Swinkels MEM, Simons A, Smeets DF, Vissers LE, Veltman JA, Pfundt R, et al. Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9psyndrome: delineation of the critical region for a consensus phenotype. Am J Med Genet A. 2008;146(11):1430-8.

Thomas NS, Bryant V, Maloney V, Cockwell AE, Jacobs PA. Investigation of the origins human autosomal inversions. Hum Genet. 2008; 123(6):607-16.

Thomas NS, Ennis S, Sharp AJ, Durkie M, Hassold TJ, Collins AR, et al. Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. Hum Mol Genet. 2001; 10(3):243-50.

Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. Am J Med Genet. 1998; 75(2):126-37.

Trainor PA, Krumlauf R. Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. Nat Rev Neurosci 2000;1(2): 116-24.

Utine GE, Aktas D, Alanay Y, Gücer S, Tuncbilek E, Mrasek K, et al. Distal partial trisomy 1q: report of two cases and a review of the literature. Prenat Diagn. 2007;27(9):865-71.

Vendramini-Pittoli S, Kokitsu-Nakata NM. Oculoauriculovertebral spectrum: report of nine familial cases with evidence of autosomal dominant inheritance and review of the literature. Clin Dysmorphol. 2009;(2):67-77. Review.

Velagaleti GVN, Robinson SS, Rouse BM, Tonk VS, and Lockhart LH. Subtelomeric Rearrangements in Idiopathic Mental Retardation. Indian Journal of Pediatrics. 2005;72:679-85.

Veltman JA, Jonkers Y, Nuijten I, Janssen I, van der Vliet W, Huys E, et al. Definition of a critical region on chromosome 18 for congenital aural atresia by array CGH. Am J Hum Genet. 2003;72(6):1578-84.

Vianna-Morgante AM. FISH no estudo dos cromossomos humanos In: Guerra M, organizador. FISH: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 2004. p. 133-48.

Vogel F, Motulsky AG. Genetica humana: problemas e abordagens. 3a. ed. traduzido por Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. Tradução de: Human genetics.

Wang N. Methodologies in cancer cytogenetics and molecular cytogenetics. Am J Med Genet. 2000; 115(3):118-24.

Warburton D, Anyane-Yeboa K, Taterka P, Yu CY, Olsen D. Mosaic variegated aneuploidy with microcephaly: a new human mitotic mutant? Ann Genet. 1991;34(3/4):287-92.

Warburton PE, Dolled M, Mahmood R, Alonso A, Li S, Naritomi K, et al. Molecular cytogenetic analysis of eight inversion duplications of human chromosome 13q that each contain a neocentromere. Am J Hum Genet. 2000;66(6):1794-806.

Wieczorek D, Krause M, Majewski F, Albrecht B, Meinecke P, Riess O, et al. Unexpected high frequency of de novo unbalanced translocations in patients with Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS). J Med Genet. 2000; 37(10):798-804.

Wilkie AO, Morris-Kay GM. Genetics of craniofacial development and malformation. Nat Rev Genet. 2001; 2(6): 458-68.

Wright TJ, Clemens M, Quarrell O, Altherr MR. Wolf-Hirschhorn and Pitt-Rogers-Danks syndromes caused by overlapping 4p deletions. Am J Med Genet.1998; 75(4):345-50.

Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, et al. A transcript map of the 165 kb Wolf Hirschhorn syndrome critical region. Hum Mol Genet. 1997; 6(2):317-24.

Wu E, Vargevik K, Slavotinek AM. Subtypes of Frontonasal Dysplasia Are Useful in Determining Clinical Prognosis. Am J Med Genet. 2007; 143A:3069-78.

Xu J, Fan YS, Siu VM. A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide array CGH: is this a candidate region for the syndrome? Am J Med Genet. 2008; 146A(14):1886-9.

Yamanishi T, Nishio J, Miya S, Okamoto N, Takahashi A, Toribe Y, et al. 12q interstitial deletion with bilateral cleft lip and palate: case report and literature review. Cleft Palate Craniofac J. 2008;45(3):325-8.

Young RS, Bader P, Palmer CG, Kaler SG, Hodes ME. Brief clinical report: Two children with de novo del (9p). Am J Med Genet. 1983;14:751–7.

Young RS, Reed T, Hodes ME, Palmer CG. The dermatoglyphics and clinical features of the 9p trisomy and partial 9p monosomy syndromes. Hum Genet. 1982; 62:31-9.

Yunis JJ. Mid-prophase human chromosomes: The attainment of 2000 bands. Hum Genet. 1981; 56(3): 293-98.

Zechi RM. Estudo genético-clínico em pacientes portadores da seqüência de Pierre Robin. Botucatu, 1998. 114p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Biológicas) -Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Zollino M, Di Stefano C, Zampino G, Mastroiacovo P, Wright TJ, Sorge G, et al. Genotype–phenotype correlations and clinical diagnostic criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome. Am J Med Genet. 2000; 94(3):254-61.

Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, et al. Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. Am J Hum Genet. 2003; 72(3):590-7.



Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências o Sr. legais, (a) portador da cédula de identidade _____, responsável pelo paciente após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: "Refinamento Citogenético em Indivíduos com Anomalias Craniofaciais Sindrômicas sem Diagnóstico Definido", realizada pelo aluno Rubens Matias Rodrigues (CRBio 33736/01-D) sob a orientação da Dra. Maria Leine Guion de Almeida (CRM 30253).

Este estudo tem como objetivo realizar o estudo citogenético pela técnica de alta resolução em indivíduos com múltiplas anomalias congênitas, sem diagnóstico definido. Isso pode auxiliar no diagnóstico e no aconselhamento genético às famílias. Para realização do exame laboratorial será coletado cerca de 2 a 3 ml de sangue periférico do paciente. A coleta de sangue pode causar desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta. Cada indivíduo participante deste estudo (ou seus responsáveis) será incluído somente com sua permissão, após serem informados dos objetivos (acima citado).

Informamos que, de modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo e é pouco provável que o tratamento seja modificado. Porém, essa investigação, poderá contribuir, no futuro, para uma melhor orientação genética às famílias. Os resultados dos exames estarão disponíveis no prontuário do indivíduo participante e serão fornecidos ao paciente ou seu(s) responsável (is), em consulta previamente agendada no Ambulatório de Genética Clínica do HRAC-USP, Bauru, durante as vindas de rotina ao Hospital. Os resultados desta pesquisa poderão ser divulgados, para fins científicos, em revistas e em eventos especializados na área, incluindo o uso de imagens, desde que a identidade do indivíduo seja preservada e que a participação não é obrigatória.

"Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20 no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421".

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a gualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 20 do Código de Ética de Biologia).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de .

Assinatura do Sujeito da Pesquisa/responsável Assinatura do Pesquisador Responsável

* A SER PREENCHIDO. SE O SUJEITO DA PESQUISA NÃO FOR O PACIENTE

Nome do Pesquisador Responsável: Rubens Matias Rodrigues Endereço do Pesquisador Responsável: Rua João Scavassa, 1-55 Cidade: Bauru Estado: SP CEP: 17.033-770 Telefone: (14) 3231-1699 E-mail: rubensrodrigues@usp.br Endereco Institucional: Rua Silvio Marchione, 3-20 Cidade: Bauru Estado: SP CEP: 17.012-900 Telefone: (14) 3235-8149.







Figura A - Mapa do cromossomo 4: a) ideograma do cromossomo 4; b) ideograma da região 4p16.1→4pter.

Inicio	Final	Símbolo	Região
53227	88099	ZNF595	4p16.3
105771	107949	LOC100129037	4p16.3
123966	125449	LOC100287931	4p16.3
124420	156491	ZNF718	4p16.3
195200	199049	LOC100288172	4p16.3
206394	249445	ZNF732	4p16.3
206686	207175	LOC100288199	4p16.3
264464	299110	LOC654254	4p16.3
331596	367691	ZNF141	4p16.3
343946	344041	MIR571	4p16.3
367742	369262	LOC100288237	4p16.3
419224	467998	ABCA11P	4p16.3
433777	493442	ZNF721	4p16.3
492989	533320	PIGG	4p16.3
619363	664681	PDE6B	4p16.3
666225	668122		4p16.3
6/1/11	6/581/		4p16.3
675618 600572	082973		4p16.3
720820	704420		4p10.3
774588	775631		4p10.3 /p16.3
778745	810045	CPL X1	4p10.3 4n16 3
843065	926174	GAK	4p10.5
926262	952444	TMEM175	4n16.3
952675	967344	DGKQ	4n16.3
972861	987224	SLC26A1	4p16.3
980785	998317	IDUA	4p16.3
1005610	1020686	FGFRL1	4p16
1065266	1107582	RNF212	4p16.3
1145226	1147489	FLJ35816	4p16.3
1160720	1166980	SPON2	4p16.3
1189571	1202750	LOC100130872	4p16.3
1205228	1242908	CTBP1	4p16
1244177	1246616	C4orf42	4p16.3
1283672	1333925		4p16.3
1341104	1301037		4p10.3
1396720	1400119	NKX1-1	4p10.3
1604677	1659196	LOC100289589	4p16.3
1641608	1685718	FAM53A	4p16.3
1694527	1714030	SLBP	4p16.3
1717679	1723084	TMEM129	4p16.3
1723266	1746898	TACC3	4p16.3
1795039	1810598	FGFR3	4p16.3
1813206	1857974	LETM1	4p16.3
1873123	1983934	WHSC1	4p16.3
1976363	1976487	SCARNA22	4p16.3
1976514	1977373	LOC100289148	4p16.3
1984443	2010959	WHSC2	4p16.3
1988111	1988204	MIR943	4p16.3
2043689	2045697	C4orf48	4p16.3
2001007	2007033		4p10.3
2009193	2070616	LOC 100269625	4p10.3
2073045	2230930	FOLN HALIS3	4p10.3 /p16.3
22350350	2243636	LOC100289662	4p10.3
2249160	2263739	MXD4	4p16.3
2271325	2420369	ZFYVE28	4016.3
2427636	2452087	LOC441005	4p16.3
2451703	2464653	LOC402160	4p16.3
2470807	2517584	RNF4	4p16.3
2627159	2734302	C4orf8	4p16.3
2656498	2661397	LOC100289183	4p16.3
2743387	2758061	TNIP2	4p16.3
2794750	2842823	SH3BP2	4p16.3
2845584	2931789	ADD1	4p16.3
2932295	2935769	MFSD10	4p16.3
2937273	2952794	C4orf10	4p16.3
2939003	2902110	NUP 14	4p16.3

Tabela A	- Relação	de aenes	localizados r	na região	4p16.1→4pter.
	i itolagao	ao gonoo	100011200001	na rogiao	-pro.i / -ptoi

continua

continuação

Inicio	Final	Símbolo	Região
2965343	3042474	GRK4	4016.3
3076408	3245687	HTT	4p16.3
3080211	3080269	RNU7-33P	4p16.3
3250767	3265840	C4orf44	4p16.3
3314239	3314581	LOC100286945	4p16.3
3315874	3441640	RGS12	4p16.3
3325653	3326509	RPL7AP29	4p16.2
3443726	3451213	HGFAC	4p16
3465033	3496209	DOK7	4p16.3
3510306	3512946	LOC100289219	4p16.3
3514290	3534224	LRPAP1	4p16.3
3578596	3591045	FLJ35424	4p16.3
3643676	3644308	LOC100129786	4p16.3
3768296	3770253	ADRA2C	4p16
3891243	3891892	LOC100131415	4p16.3
3903233	3904267	OR/E162P	4p16.3
3912010	3912336	LOC100131503	4p16.3
3937173	3945154	LOC728263	4p16.3
3943669	3957148		4p16.3
3990003	3997030	LOC 100 130441	4p10.3
4076394	4079242		4p10.3 4p16.3
4100475	4109000	OR/D12P	4p10.3 4p16.3
4120303	4129537	LINC93B4	4p10.3 4n16 3
4158206	4159230	OR7E99P	4p16.3
4176126	4176778	OR7E43P	4p16.3
4190530	4228621	OTOP1	4p16.3
4237269	4249934	TMEM128	4p16.3
4269428	4291896	LYAR	4p16.3
4291924	4323513	ZNF509	4p16.3
4387983	4420785	D4S234E	4p16.3
4420695	4543775	STX18	4p16.3
4497925	4509510	LOC728015	4p16.3
4853626	4855584	LOC100289434	4
4861392	4865663	MSX1	4p16.3-p16.1
4895351	4896995	LDHAL1	4p16.2
5016313	5021197	CYTL1	4p16-p15
5053527	5502725	STK32B	4
5526883	5529528		4
5564150	5710294	EVC2	4p16.2-p16.1
5712924	5816031		4p16 4p16 1 p15
50522491	5000166	CAprf50	4p16.1-p15
6027926	6202318		4
6202466	6235083	100.285484	ч Д
6271577	6304992	WFS1	4p16
6303624	6304993	LOC100129623	4
6322305	6474326	PPP2R2C	4p16.1
6576902	6624188	MAN2B2	4
6642445	6644449	MRFAP1	4
6675677	6677774	LOC93622	4
6695566	6698897	S100P	4p16
6709428	6711606	MRFAP1L1	4
6717842	6719387	CNO	4
6784459	6885899	KIAA0232	4
6911171	7034845	TBC1D14	4
/042576	/044728	CCDC96	4
/045156	7059679		4
7061780	7069800	GKPEL1	4p16
/1943/4	//44564		4
1323838	1323909		4
1432021 7755817	7780655	FORFLI	4µ10.1 A
7760440	70/1653		+ 1p16
70/0728	7941000		4µ10 A
7967037	8160559	ABLIM2	
8201060	8242830	SH3TC1	4

continua

	. ~ .
conc	lusao

Inicio F	Final	Símbolo	Região
8271492 8	3308834	HTRA3	4
8368009 8	3442452	ACOX3	4p15.3
8456143 8	3478281	C4orf23	4
8475034 8	3477686	LOC100287044	4
8582291 8	3589520	GPR78	4p16.1
8594435 8	3621488	CPZ	4
8620970 8	3638654	LOC100287077	4
8868773 8	3873543	HMX1	4p16.1
8951477 8	3952127	LOC650293	4
8957227 8	3998383	LOC100288392	4
9002184 9	9005344	LOC100288430	4
9032000 9	9033017	LOC100286946	4
9035293 9	9042843	LOC100288460	4
9114948 9	9115121	LOC100286982	4
9155022 9	9167181	LOC100287013	4
9167906 9	9174517	LOC100288492	4
9172114 9	9178456	LOC100287045	4
9192736 9	9199930	LOC100287106	4
9212383 9	9213975	LOC100287144	4
9217131 9	9218723	LOC100287178	4
9221878 9	9223470	LOC100287205	4
9226622 9	9228214	LOC100287238	4
9231367 9	9232959	LOC100287270	4
9236111 9	9238060	LOC100288520	4
9240856 9	9242448	LOC100287302	4
9245605 9	9247197	LOC100287327	4
9250356 9	9251948	LOC100287364	4
9255104 9	9256696		4
9259650 9	9201442		4
9204090 9	9200190	LOC100287512	4
9209343 9	2270937	100728360	4
9320091 9	3320403	100728373	4
0336384 0	0337076	100728379	4
9330304 3	3342721	LISP17L5	- А
9345874 0	9347466	100728393	4
9350619	9352211	I OC728400	4
9355364	9356956	I OC728405	4
9360109	9361701	USP17	4p15
9364855 9	9366447	LOC728419	4
9369600 9	9370796	DUB4	4
9382671 9	9383119	LOC100287791	4
9385743 9	9390709	LOC728429	4
9400930 9	9405291	LOC100133128	4
9423738 9	9431428	LOC100288554	4
9446260 9	9452240	DEFB131	4
9460848 9	9462070	OR7E86P	4
9470652 9	9471875	OR7E84P	4
9485250 9	9486477	OR7E85P	4
9514472 9	9515636	OR7E83P	4
9533665 9	9534392	LOC100132613	4
9554655 9	9555747	RPS24P11	4
9557789 9	9557937	MIR548I-2	4
9564767 9	9565614	RPS3AP19	4
9651129 9	9651688	LOC100128096	4
9694721 9	9705218		4
9704468 9	9712436		4
9740300 9	9740700	OD7525D	4
0783258	0785633		+ 4p16 1
9703230 9 9827848 1	10041872	SI C2AQ	יוטיק ר 4n16-n15 3
10075963	10118573		-דיקד גטוק-טוקד ג
10168599 1	10169365	LOC100130161	ч 4
10197169 1	10239955	LOC100129344	4
10256550	10258283	RAF1P1	4
10412622	10413274	I OC100287951	4
10441504 1	10459032	ZNF518B	4
10480154 1	10480556	LOC100130072	4
10491838 1	10686386	CLNK	4

Fonte: Imagem capturada no http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview



Fonte: Imagem capturada no http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview

Figura B - Mapa do cromossomo 9: a) ideograma do cromossomo 9; b) ideograma da região 9p23→9pter.

Inicio	Final	Símbolo	Região
11987	14924	LOC100287596	9p24.3
13534	29739	LOC100287171	9p24.3
34394	35864	FAM138C	9p24.3
47489	93335	LOC100287382	9p24.3
116234	118417	FOXD4	9p24.3
121038	179075	CBWD1	9n24.3
168877	170976	0C642313	9n24.3
213108	215893	C9orf66	9n24.3
273048	465255	DOCK8	9n24.3
477781	478396	RPI 12P25	9n24 3
499448	501483	L OC100133062	9n24.3
503029	503991	LOC100289539	9p24.0
503057	518363	LOC645586	9p24.0 9p24.3
504703	746103	KANK1	9p24.0 9p24.3
706012	707008	LOC642350	9p24.0 9p24.3
8/1600	969090	DMRT1	9p24.5 9p24.3
976964	001732	DMRT3	9p24.5 9p24.3
1050620	1057554	DMRT3	9p24.5 9p24.3
1164414	1164967		3p24.3
20153/2	2103624	SMARCA2	9p24.3 9p22 3
2013342	2622272	EL 125024	9pzz.5
200002	2022373		9 0p24
2021793	2004400		9p24
2717520	2729737		9
2004152	2044130		9
2875442	2876426	LOC392281	9
2900240	2900846		9
2943562	3053404	CARMIL	9
3224645	3525983	RFX3	9
3824128	4300035	GLIS3	9
3898646	3901248	C9orf70	9
4294224	4300092	LOC100287493	9
4490444	4587469	SLC1A1	9p24
4598316	4666464	C9orf68	9
4633032	4633770	RPS6P11	9p24
4662298	4665258	PPAPDC2	9
4679566	4706594	CDC37L1	9p24.1
4711158	4741227	AK3	9p24.1-p24.3
4781417	4782149	RPS5P6	9
4792834	4861064	RCL1	9p24.1-p23
4850297	4850375	MIR101-2	9
4944346	4945962	LOC100128701	9
4944670	4986126	LOC100287533	9
4985245	5128183	JAK2	9p24
5110861	5113421	LOC100129107	9
5113452	5114909	IGHEP2	9p24.2-p24.1
5163863	5185618	INSL6	9p24
5231419	5233967	INSL4	9p24
5299868	5304580	RLN2	9p24.1
5311445	5311716	LOC645930	9
5334969	5339873	RLN1	9p24.1
5357971	5437860	C9orf46	9
5450559	5468477	CD274	9p24
5510545	5571282	PDCD1LG2	9p24.2
5629327	5776557	KIAA1432	9
5784572	5833081	ERMP1	9p24
5855723	5856426	LOC100128705	9
5890909	5909822	MLANA	9
5919008	6008003	KIAA2026	9
6011019	6015640	RANBP6	9
6196040	6196776	LOC100135064	9
6241678	6257982	IL33	9
6278596	6280392	LOC645969	9
6328375	6331900	TPD52L3	9
6413151	6507051	UHRF2	9
6532464	6645692	GLDC	9p22
6639141	6639611	RPL23AP57	9
6662366	6663797	LOC100287623	9
6669691	6670633	RNF2P	9
			e e e tierre

Tabela B - Relação de genes localizados na região 9p23→9pter.

continua

Inicio	Final	Símbolo	Região	
6675215	6675662	RPL35AP20	9	
6715892	6735076	LOC100287652	9	
6748553	6749012	SNRPEL1	9p24.1	
6757654	7175648	KDM4C	9p24.1	
6758646	6835560	LOC100287684	9	
7476951	7478376	RPL4P5	9	
7499155	7598374	LOC392285	9	
7796490	7799799	C9orf123	9	
8314246	10612509	PTPRD	9p23-p24.3	
8713276	8713893	RPL18AP11	9	
9090873	9091312	RPS26P3	9	
9441998	9442310	RN7SLP2	9	
10829629	10830308	LOC646087	9	
11011223	11040285	LOC646114	9	
12287323	12289233	LOC100049717	9	
12693386	12710266	TYRP1	9p23	
12775012	12823059	C9orf150	9	
12972559	12973504	TDPX2	9p22	
13021693	13066017	LOC100130801	9	
13105703	13250365	MPDZ	9p24-p22	
13322922	13323454	LOC100128272	9	
13406379	13431400	FLJ41200	9	
13986174	13987913	LOC347193	9	
14040656	14041886	RPL3P11	9	
14068931	14069365	LOC138864	9	
14081847	14313945	NFIB	9p24.1	

conclusão

Fonte: Imagem capturada no http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview



Fonte: Imagem capturada no http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview

Figura C - Mapa do cromossomo 18: a) ideograma do cromossomo 18; b) ideograma da região 18q22.2→18pter.

Inicio	Final	Símbolo	Região
65173819	65183967	DSEL	18
65374042	65375559	FAM32D	18g22.1
65455506	65479626	LOC100129135	18
65497729	65630982	LOC100131011	18
66123187	66124013	LOC643582	18
66340925	66382353	TMX3	18g22
66382491	66722426	CCDC102B	18
67068291	67515825	DOK6	18
67530192	67624232	CD226	18g22.3
67671040	67872962	RTTN	18
67956137	67997434	SOCS6	18
68097446	68098397	RPS2P6	18
68889092	68893957	LOC100132647	18
70203915	70211723	CBLN2	18
70285502	70286458	LOC100128044	18
70414787	70534810	NETO1	18a22-a23
70534937	70535381	LOC100289370	18
71740588	71815100	FBXO15	18
71815746	71826204	C18orf55	18
71920527	71959221	CYB5A	18a23
71983048	72026424	DKFZP781G0119	18
72057057	72057645	FAUP1	18
72102963	72124503	C18orf51	18
72163597	72188356	CNDP2	18
72201692	72252261	CNDP1	18g22.3
72259010	72265071	LOC400657	18
72342919	72777628	ZNF407	18q23
72909278	72921281	ZADH2	18
72922731	73001901	TSHZ1	18
73121827	73139589	C18orf62	18
73409365	73424358	LOC100289440	18
74071619	74175055	ZNF516	18
74207477	74210045	FLJ44313	18
74240612	74271784	LOC284276	18
74402141	74402533	FLJ44881	18
74414867	74416417	LOC100129655	18
74536116	74682683	ZNF236	18q22-q23
74546348	74546916	RPL26P35	18
74690789	74729339	LOC100131014	18
74690789	74844774	MBP	18q23
74962008	74982098	GALR1	18q23
75144013	75149205	BDP1P	18q23

Tabela C - Relação de	genes localizados na	a região 1	8q22.2→18qter.

Fonte: Imagem capturada no http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview

Anexo 3 - Aprovação do Comitê de Ética



Ofício nº 292/2007-SVAPEPE-CEP

Bauru, 18 de dezembro de 2007.

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "*Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido.*", de autoria de RUBENS MATIAS RODRIGUES desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de **17/12/2007** o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes para início da pesquisa. Solicitamos a V.S^a a gentileza de comunicar o parecer ao pesquisador e anexar o presente ofício ao projeto, pois o mesmo será necessário para futura publicação do trabalho.

O pesquisador fica responsável pela entrega no SVAPEPE - Apoio ao Projeto de Pesquisa dos relatórios semestrais, bem como comunicar ao CEP todas as alterações que possam ocorrer no projeto.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final para publicação.

Atenciosamente

"U Cawalho

PROFA. DRA. IZABEL MARIA MARCHI DE CARVALHO Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a) Dra. Maria Leine Guion-Almeida Genética – HRAC/USP

> Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil Caixa Postal 1501 CEP 17.012-900 Tel. 55 14 3235 8421 E-mail: cep@centrinho.usp.br