

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

TATIANA MOZER JOAQUIM

**CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO EM PACIENTES
PORTADORES DE TRANSLOCAÇÃO CROMOSSÔMICA
APARENTEMENTE EQUILIBRADA**

**“GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION IN APPARENTLY
BALANCED CHROMOSOME TRANSLOCATION CARRIERS”**

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2020**

TATIANA MOZER JOAQUIM

**CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO EM PACIENTES
PORTADORES DE TRANSLOCAÇÃO CROMOSSÔMICA
APARENTEMENTE EQUILIBRADA**

**“GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATION IN APPARENTLY
BALANCED CHROMOSOME TRANSLOCATION CARRIERS”**

Tese apresentada à Universidade de São Paulo,
como requisito para obtenção do título de
Doutora, pelo curso de Pós-graduação em
Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Coorientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2020**

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Joaquim, Tatiana Mozer

Correlação genótipo-fenótipo em pacientes portadores de translocação cromossômica aparentemente equilibrada. Ribeirão Preto, São Paulo, 2020.

143p: il;30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo – Área de concentração: Genética.

Orientadora: Martelli, Lucia

1. Translocação cromossômica; 2. Correlação genótipo-fenótipo; 3. a-CGH 4. Deficiência intelectual.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Tatiana Mozer Joaquim

Título: **Correlação genótipo-fenótipo em pacientes portadores de translocação cromossômica aparentemente equilibrada**

Tese apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutora, pelo curso de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli
Coorientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

Aprovada em: _____|_____|_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais,

Robinson Roberto Joaquim e Marlene Mozer Joaquim,

que sempre me incentivaram a alçar voos mais altos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, em especial à:

Deus e a NS^a Aparecida por estarem sempre ao meu lado nesta grande aventura que é a vida, e por me presentarem todos os dias colocando pessoas tão especiais no meu caminho.

À **Profa. Dra. Lucia Regina Martelli** pela generosidade com que me abriu as portas do mundo acadêmico, pelo carinho, incentivo, apoio constante e orientação dedicada. Por me ensinar a ser mais do que citogeneticista humana, uma pessoa melhor. Por acreditar e confiar em mim durante todas as etapas deste trabalho. Muito obrigada por encarar comigo mais este desafio. “Um professor cuidadoso transforma seus alunos todos os dias.”

Ao **Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire** por todas as contribuições para o desenvolvimento deste trabalho, pela convivência harmoniosa, pelas discussões e por todo apoio dedicado ao meu crescimento científico e pessoal. “O verdadeiro professor não é aquele que só ensina, mas acima de tudo é aquele que inspira.”

À **Profa. Dra. Maisa Yoshimoto** por tão carinhosamente me receber em seu laboratório na Universidade de Alberta, por todo o conhecimento compartilhado, bons momentos de convívio e por tanto enriquecer este trabalho com suas ideias valiosas. Obrigada por tornar possível a realização de um sonho.

Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela estrutura oferecida. À **Susie Adriana Penha Nalon** por toda atenção, disponibilidade e apoio prestado e aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) e Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Assistência do HCFMRP (**FAEPA**) pelo auxílio financeiro.

Ao **Dr. Carlos Henrique Paiva Grangeiro** pela dedicação e disponibilidade com que sempre atendeu os pacientes incluídos neste trabalho, por compartilhar comigo um pouco dos seus conhecimentos em Genética Médica, pelo companheirismo e amizade sincera.

Aos amigos de laboratório e grandes companheiros de trabalho **Clarissa Picanço, Carlos Henrique Grangeiro, Juliana Josahkian, Flávia Gaona de Oliveira Gennaro, Alexandra Galvão Gomes, Livia Ferreira e Thiago Vidotto** por compartilharem comigo aquilo que tinham de mais precioso, o conhecimento, por estarem sempre presentes, nos bons e nos maus momentos, por me proporcionarem tantas alegrias. Muito obrigada por me presentear com a amizade, e tornarem meus dias mais leves e divertidos.

À equipe de citogeneticistas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Sarah Melo Padilha, Rinaldo Madona Scarparo, Lucimar Aparecida Fernandes Laureano** e da Universidade de Alberta, em especial à **Georges Maire, Scott Roy, Nina Karpoff, Emiliya Demyanyuk, Julie Mabillard, Rhonda Owens, Christine Veenstra and Klara Davies** a minha mais profunda gratidão por serem sempre tão pacientes e carinhosos comigo, pelos momentos inesquecíveis de convívio, por me ensinarem tanto e por tornarem este trabalho possível. *You guys really made the difference in my life, I'll never forget it.*

Aos anjos sem asas que cruzaram meu caminho durante o período de doutorado sanduiche em Edmonton, por fazerem com que eu me sentisse em casa mesmo estando *so far from home*. A amizade e o carinho de vocês aqueceram meu coração e acreditem se quiser, fizeram-me imensamente feliz, mesmo naqueles dias em que tínhamos menos

de 3h de luz e a temperatura ultrapassava os 40 graus negativos. Mais do que especialmente agradeço a **Tammy and Darrell Pidner** que me proporcionaram muito mais do que um lar; **Raiany Andrade, Alberto Gil de La Fuente and Nikunj Patel** *the best roommates* que eu poderia ter; **Grace and Ted Veenstra** *part of my canadian family*, **Nina Karpoff** por me mostrar entre tantas novidades o que é *be wild* no país do gelo e a **Christine Veenstra**, a canadense de coração brasileiro, companheira de tantas aventuras, que por meio de tanto cuidado ensinou-me o verdadeiro significado da palavra amizade. Eu realmente não sei como agradecer tanto carinho.

Aos **docentes, médicos assistentes, residentes e funcionários** do setor de Genética Médica, por todas as contribuições para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao **Prof. Dr. Jair Huber** sempre tão solícito e disposto a colaborar com o nosso grupo de pesquisa, obrigada por todas as sugestões para enriquecer este trabalho. Aos residentes e muito mais do que isso, Amigos: **Ana Cristina Gomes Silva, Sue Ellen Pontes, Maria Paola Torres Nieto, Thereza Loureiro, Rayana Elias Maia, Deivid Calebe de Souza, Thaliane Buranello, Luissa Hikari e Fátima das Graças Carvalho** por todo auxílio com a parte clínica desse trabalho, pelos bons momentos de convívio e amizade.

A todos que fizeram e fazem parte da “Família Bloco C”, **Profª. Dra. Ester Silveira Ramos, Cristiana Libardi, Heloise Luchiari, Matheus Eiras, Murilo Soares, Grace Ruiz Lara, Carolina Verruma, Manuela Gama, Thatiane Malta, Thais Sabedot, Reginaldo Vila, Marli Galerani, Luiz Bezerra, Sebastião Paulo, Mara Aparecida, Maria e Gislaine**, pelo apoio, incentivo e convivência harmoniosa.

Aos amigos do programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP USP e aos que conquistei ao longo da vida, os velhos e os novos, sobretudo à **Karina Bezerra Salomão, Sarah Blima, Larissa Oliveira Guimarães, Ana Carolina Coelho, Simone**

Carvalho, Agnes Magri, Marcela Tsuboy, Daniele Sartori e Isabele Kazahaya, pelos conselhos, discussões científicas e mais ainda por me mostrarem que desistir nunca foi uma opção e à **Camila Martinelli, Maria Eduarda Zorovich, Aline Amaro e Elisângela Chagas** por todo apoio e por não permitirem que eu desanimasse no desespero do fim.

Ao **Prof. Dr. Wagner José Martins Paiva** por acreditar no meu potencial, proporcionar minha iniciação na carreira científica e por todo auxílio para que eu chegasse até aqui.

À **Maria Eliane Longhi Barroso** por tão carinhosamente plantar em mim a “sementinha” da Citogenética e me apresentar o mundo dos “cromossomos felizes” e a **Silvio Avelino dos Santos** pelo carinho com que me estendeu a mão desde o primeiro dia em que nos vimos, por partilhar comigo suas histórias e conhecimentos em Citogenética.

Aos membros da **banca examinadora** por todas as contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos **pacientes** e seus **familiares** que aceitaram a participar da pesquisa. Obrigada por toda confiança em nós depositada.

À minha **família**, o meu maior presente, por me apresentarem o que há de bom no mundo, me proporcionarem tantos momentos felizes e me ensinarem que o mais simples é sempre o mais importante.

Aos meus pais, **Robinson Roberto Joaquim e Marlene Mozer Joaquim**, meus exemplos de vida e maiores incentivadores, pelo apoio constante e amor incondicional. Muito obrigada por nunca permitirem que eu desistisse dos meus sonhos.

“O correr da vida embrulha tudo.

*A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e
depois desinquieta. O que ela quer da gente é CORAGEM.”*

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

JOAQUIM, T. M. **Correlação genótipo-fenótipo em pacientes portadores de translocação cromossômica aparentemente equilibrada.** 2020, 143p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Translocações aparentemente equilibradas (TAE) envolvem a troca de segmentos entre cromossomos não-homólogos sem que haja perda ou ganho de material genético detectável pelo método do cariótipo. Este tipo de rearranjo geralmente não causa nenhuma alteração fenotípica em seus portadores. No entanto, aproximadamente 7% dos casos de TAE podem estar associados a diferentes achados clínicos, principalmente devido a desequilíbrios genômicos nem sempre próximos às regiões dos pontos de quebra, disrupção de genes funcionalmente importantes ou efeito de posição. O objetivo principal deste estudo foi identificar e caracterizar possíveis desequilíbrios genômicos relacionados a alterações fenotípicas em pacientes portadores de TAE, por meio da técnica de Hibridação Genômica Comparativa em microarranjos (*array*-CGH). A análise citogenômica realizada em 12 pacientes utilizando a plataforma 2x400K (Agilent®) demonstrou que as translocações foram realmente equilibradas em 10 deles. Desequilíbrios genômicos críticos para o fenótipo foram detectados em dois pacientes, sendo um próximo ao ponto de quebra cromossômica e o outro classificado como um achado incidental. No primeiro caso, inicialmente diagnosticado como translocação complexa originada *de novo* t(2;10;12)(q33;q24;q24.3), a investigação por *array*-CGH detectou uma perda de 233.88 Kb em 10q22, a qual encontra-se aproximadamente 20 Mb distante da região rearranjada sugerida pelo cariótipo, englobando parte do gene *C10orf11*. Também foi detectada uma deleção de 140 Kb em 2q33.1, em virtude da inserção submicroscópica da região do gene *PTEN* (10q23) no cromossomo 2. O envolvimento dos 3 pares cromossômicos no rearranjo foi confirmado pela técnica de FISH. Estudos prévios incluindo o gene *C10orf11* sugerem que a haploinsuficiência do mesmo pode contribuir para as alterações cognitivas presentes em pacientes com deleção 10q22.2. A perda evidenciada neste projeto é a menor já descrita até o momento e envolve apenas o gene *C10orf11*. O segundo desequilíbrio crítico foi diagnosticado em uma paciente portadora do cariótipo 46,XX,t(3;15)(q29;q15). A análise por *array*-CGH não identificou alterações nos pontos de quebra. No entanto, uma deleção de 1.5 Mb foi detectada em 2q24.2 englobando os genes *PSMD14* e *TBR1*, já relacionados com o fenótipo de baixa estatura e deficiência intelectual, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que as translocações aparentemente equilibradas podem ser mais complexas quando avaliadas em nível genômico, detectando desequilíbrios que podem estar associados às características fenotípicas de seus portadores.

Palavras-chave: Translocação cromossômica; Correlação genótipo-fenótipo; *a*-CGH; Deficiência intelectual.

ABSTRACT

JOAQUIM, T. M. **Genotype-phenotype correlation in apparently balanced chromosome translocation carriers.** 2020, 143p. PhD Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo.

Apparently balanced translocations (ABTs) are characterized by an exchange of genomic regions between non-homologous chromosomes, without gain or loss of genetic material based on detection by classical cytogenetic methods. This type of rearrangement usually has no phenotypic consequences for the carriers. However, about 7% of ABTs are associated with an abnormal phenotype caused by cryptic imbalances that are not always close to the ABTs breakpoint regions, gene regulatory element disruption, or position effects. Our main goal was to identify and to characterize genomic imbalances correlated to phenotypic abnormalities in 12 patients with apparently balanced translocations, using array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) with the Agilent 2x400K platform. Our results showed that the translocations were truly balanced in 10 patients. Cryptic imbalances were detected in two cases, one close to the rearranged area and another classified as an incidental finding. In the first case, diagnosed as a *de novo* complex translocation $t(2;10;12)(q33;q24;q24.3)$, aCGH detected a 233.88 Kb loss at 10q22.2, which is 20 Mb distant from the rearranged area encompassing part of the *C10orf11* gene. A 140kb deletion at 2q33.1 due to a submicroscopic insertion from the 10q23 *PTEN* region was also detected. *PTEN* multicolor FISH confirmed this aberration. Previous studies of the *C10orf11* gene suggest that its haploinsufficiency could contribute to the cognitive defects presented in patients with 10q22.2 deletion. This patient has shown the smallest deletion reported in the 10q22.2 region, including only the *C10orf11* gene. The other cryptic imbalance was diagnosed in a patient with karyotype 46,XX,t(3;15)(q29;q15) with no imbalance detected at the breakpoint regions. However, an incidental 1.5 Mb deletion was seen at 2q24.2, including the *PSMD14* and *TBRI* genes, which had previously been associated with short stature and intellectual disability, respectively. Our results provide additional evidence that ABTs may be more complex at the genomic level, hiding cryptic rearrangements that can be associated with abnormal phenotypes.

Keywords: Chromosomal translocation; Genotype-Phenotype correlation; a-CGH; intellectual disabilities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Consequências dos rearranjos cromossômicos.....	24
Figura 2: Rearranjos genômicos resultantes da recombinação entre LCRs.	26
Figura 3: Três dos principais mecanismos formadores de rearranjos cromossômicos..	28
Figura 4: Formação de rearranjos genômicos complexos a partir do mecanismo como FoSTeS e Chromotripsis.....	29
Figura 5: Biogênese da translocação.....	33
Figura 6: Avaliação genômica e validação por FISH de P4 evidenciando a perda diagnosticada em 2q33.1.	57
Figura 7: (A) Cariótipo por bandamento GTG e fotos clínicas do paciente 8 (P8) portador do cariótipo 46,XY,t(3;8)(q13.2;p21).	58
Figura 8: Avaliação genômica e validação por FISH de P8 evidenciando a perda de 1.32 Mb sobrepondo-se a região 3q13.12-q13.13.	59
Figura 9: Perda de 129.83 Kb sobrepondo-se a região 8p21.2 diagnosticada em P8. ...	60
Figura 10: Fotos clínicas de P4.	61
Figura 11: Cariótipo por bandamento GTG da paciente 4	62
Figura 12: Metáfase da paciente 4 após aplicação da técnica de FISH, utilizando-se a sonda quatro cores para avaliação do gene PTEN	63
Figura 13: Avaliação genômica e validação por FISH de P4 evidenciando a perda de 233.88 Kb sobrepondo-se a região 10q22.2.	64
Figura 14: Mapa das deleções envolvendo a banda 10q22.2 já descritas na literatura .	65
Figura 15: Cariótipo por bandamento GTG e fotos clínicas da paciente 6 (P6) portadora do cariótipo 46,XX,t(3;15)(q29;q15).	66
Figura 16: Avaliação genômica e validação por FISH de P6 evidenciando a perda de 1.5 Mb em 2q24.2.....	68
Figura 17: Ideogramas mostrando os cromossomos envolvidos no rearranjo complexo diagnosticado em P4.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência de desequilíbrios submicroscópicos detectados por aCGH em portadores de rearranjos aparentemente equilibrados e fenótipo anormal.	38
Tabela 2: Sondas BAC utilizadas para a validação das deleções diagnosticadas por <i>array</i> -CGH no presente estudo.....	52
Tabela 3: Cariótipo convencional, descrição fenotípica e o tipo de herança dos rearranjos em 12 pacientes portadores de translocação aparentemente equilibrada	55

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>array</i> -CGH	Hibridação Genômica Comparativa em microarranjos
BAC	Cromossomo Artificial de Bactéria
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CNV	Variação no Número de Cópias
CO ₂	Dióxido de carbono
CpG	Citosina Fosfato Guanina
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DGV	Banco de Dados das Variantes Genômicas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FASST2	<i>Fast Adaptive States Segmentation Technique</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo
FOSTES	<i>Fork stalling and template Switching</i>
GEN3	Ambulatório de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GTG	Giemsa Tripsina Giemsa
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
LCR	Repetição de Poucas Cópias
LSI	Sonda Loco Específica
Mb	Megabase
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P4	Paciente 4
P6	Paciente 6
P8	Paciente 8
Ph	Potencial de Hidrogênio

RCC	Rearranjo Cromossômico Complexo
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Solução nutritiva para cultivo celular (Roswell Park Memorial Ins)
SNP- <i>array</i>	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SSC	Solução Salina Citrato
TAE	Translocação Aparentemente Equilibrada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEA	Transtorno do Espectro Autista

SUMÁRIO

Introdução	19
I.1 Citogenética Clínica.....	20
I.2 Técnicas de Estudo Cromossômico	21
I.3 Alterações Cromossômicas Estruturais e seus Mecanismos de Formação.....	23
I.4 Como se Formam as Translocações.....	30
I.5 Rearranjos Cromossômicos Aparentemente Equilibrados Associados a Fenótipos Alterados	34
Justificativa	39
Objetivos	42
II.1.Geral	43
II.2.Específicos.....	43
Metodologia	44
III.1 Casuística	45
III.2 Material	46
III.3 Métodos.....	46
III.3.1 Citogenética Clássica	46
III.3.2 Citogenômica	48
III.3.3 Metodologia de Análise	51
III.3.4 Validação dos resultados.....	52
Resultados	54
IV.1. Diagnóstico Citogenético.....	55
IV.2. Diagnóstico Citogenômico.....	56
IV.2.1. Translocações não equilibradas	56
IV.2.2. Desequilíbrios críticos	61
Discussão	69

Considerações Finais	81
Conclusões	84
Referências	86
Apêndice	99
Anexos	107

Introdução

I.1 Citogenética Clínica

Os cromossomos desempenham papel relevante na transmissão da informação genética de uma geração para outra. Assim sendo, a estabilidade cromossômica em qualquer organismo é fundamental para seu desenvolvimento harmonioso. Como os cromossomos contêm os genes, quaisquer mudanças em sua estrutura ou número podem alterar a expressão gênica, resultando em indivíduos inviáveis ou com fenótipo anormal (MERGENER et al., 2011).

Dentro desse contexto, a citogenética clínica assume considerável importância para o diagnóstico e entendimento das causas de várias doenças humanas, uma vez que consiste no estudo dos cromossomos, sua estrutura e herança, aplicada à prática da genética médica (THOMPSON & THOMPSON, 2016).

De acordo com a literatura, as anormalidades cromossômicas são responsáveis por mais de sessenta síndromes já identificadas, afetando, no mínimo, 7,5% das concepções. Entretanto, mesmo sendo este um número bastante expressivo, a ocorrência de nascimentos com alguma alteração cromossômica é de apenas 0,7%. A diferença entre o número de concepções afetadas e o número de nascimentos é justificada pela severidade das alterações, que podem levar a abortos espontâneos, óbitos fetais e natimortos. Os nascidos vivos, por sua vez, quase sempre apresentam fenótipo anormal e malformações congênitas (MORAES et al., 2005; GAO et al., 2012).

Tais anomalias cromossômicas podem ser subdivididas em numéricas e estruturais. As numéricas incluem alterações no número diploide de uma espécie, enquanto que as estruturais podem envolver um, dois ou mais cromossomos e resultam de quebras seguidas de reconstituição anormal. Estas podem produzir alterações herdáveis, quando ocorrem em linhagens de células germinativas, ou alterações *de novo*

quando derivadas de erros durante a divisão celular pós-zigótica (BAPTISTA et al., 2005; ROUKOS & MISTELI, 2014).

I.2 Técnicas de Estudo Cromossômico

O desenvolvimento da citogenética humana adquiriu novas proporções a partir de meados da década de 50, quando Tjio e Levan estabeleceram o número diploide da espécie humana constituído por 46 cromossomos. Desde então, tornou-se possível a associação entre anomalias cromossômicas específicas e doenças (FERGUSON-SMITH, 2015).

O método padrão mais rotineiramente empregado para o diagnóstico citogenético é o cariótipo por bandamento GTG. Essa técnica permite além do pareamento inequívoco dos pares cromossômicos, a visualização de rearranjos estruturais como inversões, deleções, duplicações, translocações e cromossomos em anel (GOUAS et al., 2008). O nível de resolução do bandamento GTG para os cromossomos humanos é da ordem de 300 a 550 bandas, dependendo do grau de condensação dos mesmos, sendo esta técnica, portanto, indicada para rearranjos cromossômicos maiores que 10 Mb (ISCN, 2016).

O desenvolvimento de técnicas moleculares aplicadas à citogenética trouxe maior precisão na caracterização desses rearranjos. A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) proporcionou um importante avanço para a citogenética clínica, uma vez que permite a identificação de microdeleções ou microduplicações não diagnosticadas pelos métodos convencionais (PINKEL et al., 1986). Em relação aos rearranjos cromossômicos equilibrados, a FISH permite refinar a localização dos pontos de quebra, além de identificar alterações nos cromossomos envolvidos nos rearranjos (NATARAJAN & BOEI, 2003).

Apesar dos avanços resultantes da citogenética molecular na resolução da análise cromossômica, ainda havia a necessidade de um estudo detalhado de todo o genoma do indivíduo, a fim de obter uma correspondência entre a possível alteração genética e o fenótipo do paciente. Tal necessidade, aliada ao desenvolvimento científico e tecnológico, impulsionou o surgimento da citogenômica, área que estuda com alta resolução, a estrutura e a composição de todos os cromossomos simultaneamente (AHN et al., 2013).

Desde então, a hibridação genômica por microarranjos (*microarrays*) tornou-se uma importante ferramenta na detecção de perdas e ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos e tem sido utilizada na elucidação de pequenos rearranjos complexos (MILLER et al., 2010). Regiões com ausência de heterozigidade também podem ser detectadas por plataformas capazes de analisar polimorfismos de nucleotídeo único, os *SNP-arrays*. O aparecimento de tais regiões pode ser indicativo da ocorrência de fenômenos como a dissomia uniparental, ou presença de regiões genômicas idênticas por descendência (SOUTH et al., 2013).

A resolução do microarranjo ou plataforma é determinada pelo tamanho e pela distância entre as sondas em sua cobertura parcial ou total do genoma. A incorporação desta técnica aumentou o poder de resolução da análise cromossômica global, do nível de megabase (Mb) para kilobase (Kb) e, conseqüentemente, alterações cromossômicas não detectáveis pelas técnicas de citogenética clássica (como o bandamento GTG) e até mesmo pela citogenética molecular (como a FISH) passaram a ser diagnosticadas (SOUTH et al., 2013).

O advento da citogenômica, além de refinar a análise de pequenas alterações cromossômicas, permitiu também a descoberta de uma ampla variação na estrutura do DNA incluindo, principalmente, deleções, duplicações e inserções. Uma classe especial

desta variação são as chamadas variações no número de cópias (CNVs - do inglês *Copy Number Variations*) (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2010). Estas caracterizam-se por envolver segmentos de DNA maiores que 1 Kb, são geralmente herdáveis e vistas como fonte de diversidade entre os indivíduos saudáveis. Estima-se que aproximadamente 12% do genoma humano seja constituído por CNVs (LEE, 2007; CLANCY & SHAW, 2008).

Embora, a ocorrência de CNVs seja vista como um fenômeno variante da normalidade capaz de causar diferenças fenotípicas entre grupos étnicos distintos ou membros de uma mesma família, elas podem ser consideradas patogênicas, dependendo do tamanho e do local onde estão inseridas. As consequências fenotípicas da maioria das CNVs ainda não estão bem caracterizadas e grande parte de seus efeitos ainda permanece desconhecidos (PARK et al., 2011; COOPER et al., 2012). Sabe-se, no entanto, que as CNVs são mais propensas a contribuir para o fenótipo se elas contiverem genes com padrões temporais e espaciais de expressão (HEHIR-KWA et al., 2010).

I.3 Alterações Cromossômicas Estruturais e seus Mecanismos de Formação

Figuram entre as alterações cromossômicas estruturais as translocações, inversões, deleções e as duplicações (Figura 1A). Dentre elas, a que mais se destaca é a translocação. Esta está potencialmente associada ao desenvolvimento de doenças genéticas devido à interrupção, inativação ou alteração da dosagem gênica (Figura 1B), e pode ser classificada como equilibrada ou não equilibrada, dependendo se ocorre ou não, a presença ou ausência de material genético adicional (ROUKOS & MISTELI, 2014).

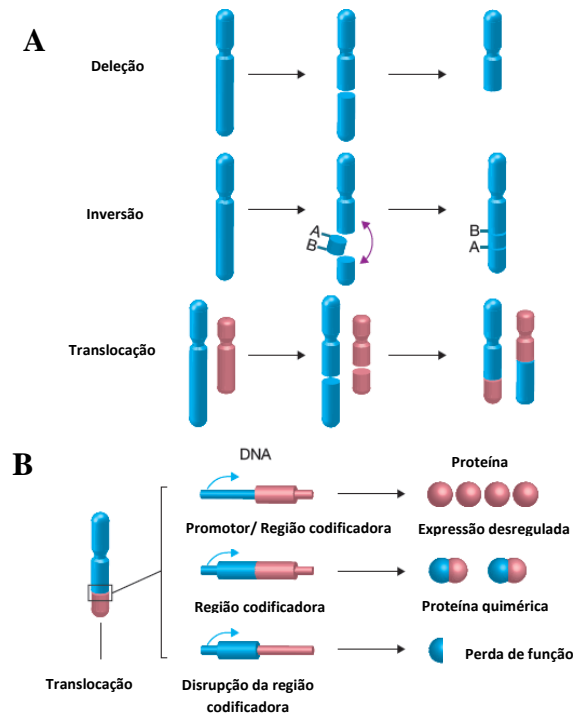


Figura 1: Consequências dos rearranjos cromossômicos. (A) Quebras cromossômicas podem resultar em perda do material genético (deleção). Quando duas quebras ocorrem no mesmo cromossomo, o segmento resultante pode ser invertido e reinserido no cromossomo (inversão), ou o material genético pode ser transferido para outro cromossomo, em um processo chamado translocação. (B) A translocação pode causar desregulação da expressão, formação de uma proteína quimérica ou perda de função gênica. Modificada de ROUKOS & MISTELI, 2014.

A grande maioria das alterações cromossômicas estruturais é originada *de novo*.

Uma vez estabelecida esta alteração, a segregação meiótica dos cromossomos envolvidos no rearranjo, bem como de seus homólogos normais, pode levar à produção de gametas com desequilíbrios estruturais, resultando em abortos espontâneos ou progênie com fenótipo anormal. Um estudo citogenético realizado em casais com histórico de abortamentos de repetição detectou que, em 3,2% desses casais, pelo menos um dos membros era portador de rearranjo estrutural equilibrado (PRIYA et al., 2018).

O crescente conhecimento da sequência e da arquitetura do genoma humano e o desenvolvimento de técnicas de alta resolução para análise cromossômica tornaram factível a elucidação dos mecanismos que levam a formação de tais rearranjos, sejam eles equilibrados ou não.

Os mecanismos classicamente considerados na formação das referidas alterações são a recombinação homóloga não alélica (NAHR), a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e o *Fork Stalling and Template Switching* (FoSTeS).

O NAHR é o mecanismo que origina a maioria das deleções e duplicações, como a duplicação do cromossomo 17, que causa a doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A, (CMT1A; OMIM: 601097) e a deleção no cromossomo 7 que resulta na Síndrome de Williams-Beuren (WBS; OMIM: 194050), além de ser visto como um importante mediador também na formação das translocações constitucionais recorrentes, principalmente aquelas que envolvem regiões subteloméricas (OU et al., 2011).

Em geral, a recombinação ocorre entre repetições de poucas cópias (*Low Copy Repeats*, LCR também conhecidas como duplicações segmentares, do inglês *segmental duplications*), que têm entre 10 e 500 Kb de extensão e compartilham mais de 95% de identidade (revisto em WATSON et al., 2014). A distância entre duas LCRs, bem como sua orientação são fatores determinantes para o produto final dos rearranjos. Quando duas LCRs estão localizadas no mesmo cromossomo e têm a mesma orientação, a NAHR entre elas resulta em duplicações ou deleções. Quando localizadas no mesmo cromossomo, mas com orientações opostas, a NAHR resulta em inversão do segmento flanqueado pelas LCRs, enquanto que se a NAHR ocorrer entre repetições de cromossomos diferentes o produto final são as translocações Figura 2 (LUPSKI, 1998; OU et al., 2011).

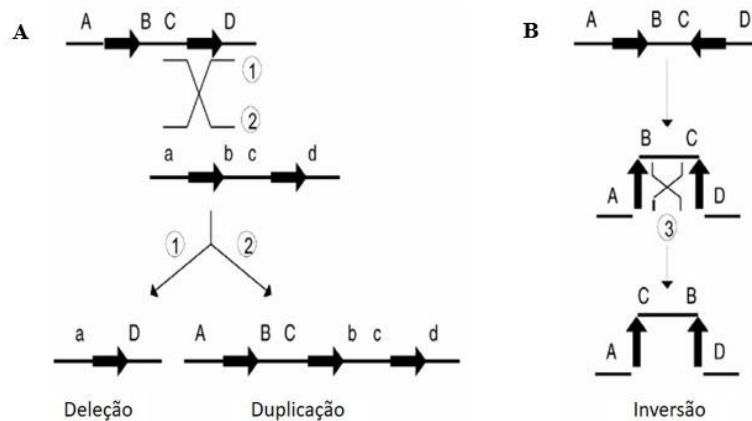


Figura 2: Rearranjos genômicos resultantes da recombinação entre LCRs. As LCRs estão representadas pelas setas pretas. As letras maiúsculas referem-se a sequência de flaqueamento. As letras minúsculas correspondem ao par homólogo. As linhas diagonais referem-se ao evento de recombinação, mostrados em 1, 2 e 3. (A) Recombinações entre repetições diretas resultam em deleção e ou duplicação. (B) Recombinação entre repetições invertidas resultam em inversão (Modificada de GU et al., 2008).

A ocorrência de NAHR em linhagens de células germinativas leva a rearranjos genômicos constitucionais que podem ser herdados ou esporádicos, dependendo se o rearranjo foi transmitido pela linhagem germinativa ou ocorreu *de novo*. Ao passo que, se a recombinação homóloga não alélica acontecer durante a mitose, esta resulta em um mosaico de células somáticas carregando o rearranjo genômico, como é observado com frequência em muitos tipos de cânceres (DARAI-RAMQVIST et al., 2008).

O NHEJ, por sua vez, pode unir extremidades que não estavam contíguas. Neste mecanismo, as extremidades quebradas emparelham-se com base na homologia de aproximadamente 70pb e sua junção ocorre após a adição ou perda de alguns poucos pares de base, tornando as fitas compatíveis. Este processo determina duas importantes características do NHEJ: primeiro as regiões de LCR não são obrigatoriamente necessárias para a ocorrência do mecanismo, como vemos na NAHR e segundo, o NHEJ deixa uma cicatriz no ponto de junção, uma vez que pode ocorrer a perda ou adição de alguns pares de base nas extremidades das fitas danificadas para que se torne possível o religamento (Figura 3) (GU et al., 2008).

Com o objetivo de caracterizar rearranjos cromossômicos equilibrados, assim como seus mecanismos geradores, Schluth-Bolard e colaboradores (2019) sequenciaram os pontos de quebra cromossômica em 55 indivíduos portadores de doenças ligadas ao desenvolvimento. Em 57,1% dos casos, NHEJ foi sugerido como o mecanismo de origem do rearranjo detectado. NHEJ também foi proposto como a causa da translocação $t(1;2)(q43;q21.1)$ em pacientes portadores de anomalias cardíacas congênitas, uma vez que a análise da arquitetura genômica próxima aos pontos de quebra, além de não demonstrar uma alta homologia entre as sequências evidenciou ainda a presença de uma “cicatriz” nos sítios de reparo (LUUKKONEN et al., 2018).

Um outro mecanismo de formação de rearranjos estruturais similar ao NHEJ, o MMEJ (Junção de Extremidades Mediadas por Micro Homologia), foi proposto como principal responsável pela formação de rearranjos cromossômicos equilibrados, nos quais foram detectadas regiões de micro homologia, variando entre 5 e 25 pb, nos intervalos dos pontos de quebra (ARISTIDOU et al., 2017). O processo de MMEJ geralmente resulta em deleções maiores que as observadas no reparo por NHEJ (30-200pb), sendo que as duplicações também podem ocorrer, embora sejam mais raras (KENT et al., 2015). A figura 3 esquematiza os três principais mecanismos responsáveis pelos rearranjos cromossômicos.

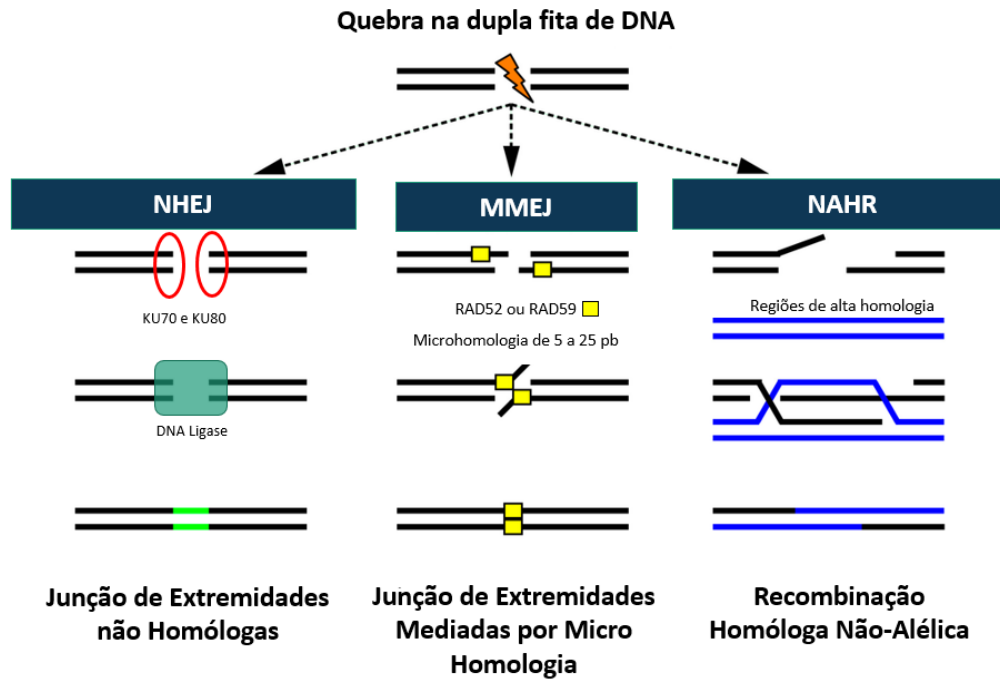


Figura 3: Três dos principais mecanismos formadores de rearranjos cromossômicos. Em **NHEJ** após a quebra da dupla fita de DNA são recrutadas proteínas (KU 70 e KU 80) que têm por função aparar as pontas danificadas gerando extremidades 3'OH livres. As extremidades reparadas emparelham-se por homologia e a DNA ligase promove o religamento das fitas. Em **MMEJ** as proteínas RAD 52 ou RAD 59, buscam por regiões de micro homologia próximas ao local da quebra. Essas proteínas então cortam os pedaços que separam as duas regiões de homologia e a DNA ligase religa as fitas. **NAHR** caracteriza-se por ocorrer em regiões que possuem alta homologia genômica. A cromátide irmã danificada serve como molde para que ocorra o reparo da região de quebra. Adaptado de KAWAHARA et al., 2016.

FoSTeS, um mecanismo fundamentado na replicação do DNA, é o mais corriqueiramente indicado como causador de rearranjos complexos, aqueles que envolvem pelo menos três quebras cromossômicas. Ele baseia-se em trocas de forquilha facilitadas pelo anelamento de sequências que compartilham homologia de 2 a 5 pares de base (Figura 4A) (OTTAVIANI et al., 2014). Os rearranjos cromossômicos originados a partir dele geralmente incluem múltiplos pontos de quebra e inserção de segmentos de DNA, que podem ser mapeados em várias regiões do genoma. A partir deste, diante da interrupção da forquilha de replicação devido a lesões ou formações de estruturas secundárias, a fita descontínua (*lagging*) invade outras forquilha próximas e completa a duplicação na forquilha original. A mudança de forquilha exige a presença de micro homologia com os sítios invadidos a fim de que a extremidade 3' consiga reiniciar a

replicação. Este processo pode se repetir várias vezes gerando regiões deletadas, duplicadas ou invertidas (GU et al., 2008).

Mais recentemente outros três mecanismos têm sido propostos na formação de rearranjos complexos, o *Chromotripsis*, o *Chromoanasyntesis* e o *Chromoplexy*. A partir destes, os cromossomos são quebrados em vários pequenos pedaços e então reconstituídos de maneira aleatória, podendo levar a ganhos ou perdas de pequenas regiões genômicas, conforme mostra a Figura 4B (STEPHENS et al., 2011; SHEN, 2013; ZHANG et al., 2013).

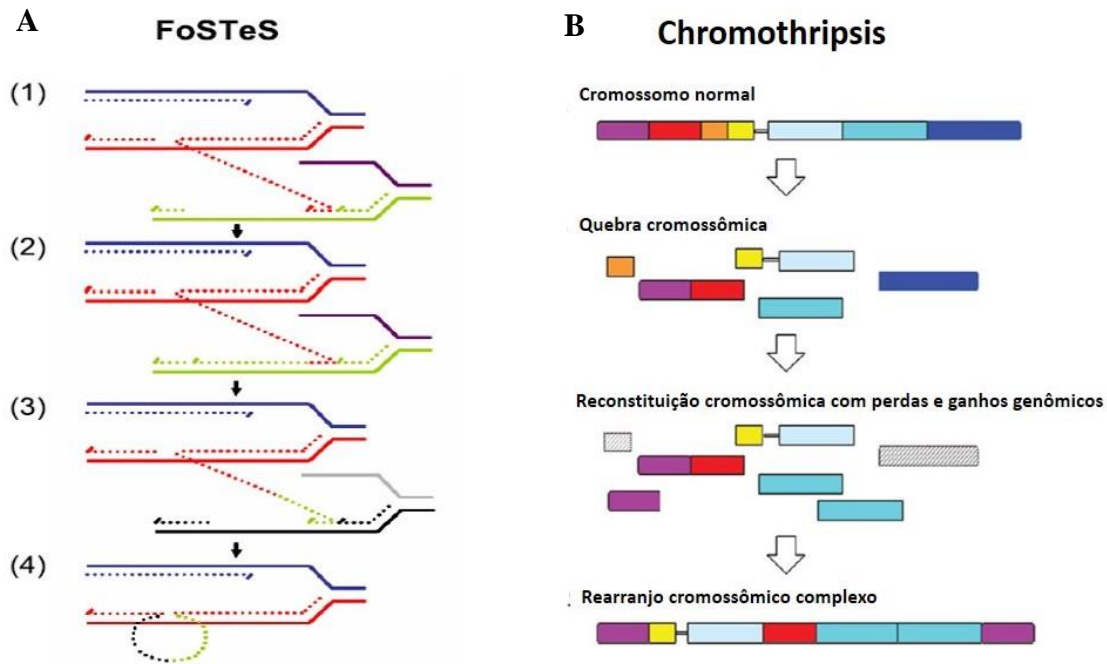


Figura 4: Representa a formação de rearranjos genômicos complexos a partir do mecanismo como FoSTeS e Chromotripsis. Em **(A) FoSTeS** a interrupção da forquilha de replicação leva a fita descontínua a invadir outras forquilha próximas até que se complete o processo de replicação na forquilha original. Já em **(B) Chromotripsis** o cromossomo é quebrado em vários pedaços a partir de um único evento e então reconstituído de maneira aleatória podendo ocorrer perdas ou ganhos genômicos nas regiões de quebra (FUKAMI et al., 2017).

Inicialmente propostos como um modelo para formação de rearranjos somáticos com múltiplas quebras em tecidos tumorais, estes mecanismos também já foram identificados em pacientes com atraso de desenvolvimento, autismo, outras síndromes

cromossômicas conhecidas e até mesmo em indivíduos saudáveis (de PAGTER et al., 2015; BURNSIDE et al., 2016; REDIN et al., 2017; FUKAMI et al., 2017; SUZUKI et al., 2017; PELLESTOR & GATINOIS, 2018; PELLESTOR, 2019).

A análise minuciosa dos pontos de quebra e junção em casos de *chromothripsis* e *chromoplexy* sugere que a reconstituição dos fragmentos de DNA se dá a partir de mecanismos de reparo clássicos como o NHEJ, podendo acontecer em qualquer etapa do ciclo celular e operando independentemente de micro homologia (JONES & JALLEPALLI, 2012), enquanto o *chromoanasythesis* é visto como um rearranjo baseado no processo de replicação e portanto, mediado por FoSTeS. Além disso, o *Chromoanasythesis* tende a envolver menos cromossomos e apresentar um número reduzido de quebras quando comparado com o *chromothripsis* e o *chromoplexy* (PELLESTOR, 2018).

A literatura sugere ser NHEJ o principal mecanismo formador de rearranjos cromossômicos equilibrados (45-57%). Uma porção substancial dos casos (25-29%) envolve mecanismos mediados por micro homologia como MMEJ e FoSTeS enquanto que uma pequena parcela dos mesmos, aproximadamente 1%, demonstram regiões de alta similaridade nos pontos de quebra, sugerindo a ocorrência de NAHR. Este último tem certamente uma frequência subestimada, tendo em vista a limitação das técnicas de nova geração atualmente empregadas para a caracterização de rearranjos equilibrados em avaliar sequências com alta homologia, como por exemplo duplicações segmentares e microssatélites (REDIN et al., 2017; SCHLUTH-BOLARD et al., 2019).

I.4 Como se Formam as Translocações

Lá se vão quase 50 anos desde que Janet Rowley em 1973 identificou um cromossomo aberrante como causador da Leucemia Mielóide Crônica. O hoje famoso

cromossomo Filadélfia, consiste na fusão de partes dos cromossomos 9 e 22 e é um exemplo clássico de que as translocações cromossômicas podem causar câncer (ROWLEY, 1973). Desde então, sabe-se que além da sua forte influência, tanto na causa quanto na progressão tumoral, as translocações também apresentam papel relevante em doenças não relacionadas ao câncer, incluindo a esquizofrenia e a infertilidade (WHALLEY et al., 2015; GRZEZIUK et al., 2016).

A formação da translocação passa por três passos básicos: a ocorrência de quebras em dois cromossomos distintos, a associação física das extremidades quebradas e finalmente o religamento dos dois cromossomos parceiros. Apesar da importância patológica indiscutível da translocação, a maneira como essas três etapas ocorrem *in vivo* ainda permanece em grande parte desconhecida (ROUKOS et al., 2013).

Sabe-se, no entanto, que o modo de organização dos cromossomos dentro do núcleo da célula exerce grande influência na formação das translocações, sejam elas raras ou recorrentes. Já é bem estabelecido que a disposição dos cromossomos não se dá de forma aleatória, e nem tampouco está sob influência do tamanho de cada cromossomo, mas sim do conteúdo gênico. Assim, cromossomos com maior quantidade de heterocromatina tendem a se posicionar em áreas mais periféricas, enquanto que aqueles ricos em genes ficam mais próximos do interior do núcleo (BOYLE et al., 2001).

Uma vez que a interação física dos cromossomos é fundamental para formação das translocações, a organização espacial dos mesmos está diretamente relacionada com a frequência que uma dada translocação ocorre. Desta maneira, entende-se a razão pela qual as translocações entre os cromossomos 4,13 e 18, todos localizados na periferia do núcleo, são mais frequentemente encontradas quando comparadas à frequência de rearranjo entre esses cromossomos e aqueles situados próximos ao interior do núcleo, e portanto sem proximidade física (BICKMORE & TEAGUE, 2002). Dentro deste quesito,

a disposição dos genes também é um fator a ser considerado. Por exemplo, a proximidade espacial entre o gene *MYC* localizado no cromossomo 8 e um de seus possíveis parceiros (*IGH-crom.14; IGK-crom.2; IGL-crom.22*) em pacientes diagnosticados com Linfoma de Burkitt, está diretamente relacionada com a frequência dessas translocações (ROIX et al., 2003).

Como abordamos anteriormente, o primeiro passo para que a translocação ocorra é a presença de quebras concomitantes em múltiplas regiões cromossômicas. Tais quebras podem surgir espontaneamente por meio de erros durante a replicação, ou fatores exógenos como a radiação ionizante ou agentes quimioterápicos. Apesar da eficiência das vias de reparo ser indiscutível, quebras ocasionalmente não reparadas podem, eventualmente, sofrer contato físico levando ao religamento ilegítimo das pontas geradas em diferentes cromossomos (ROUKOS & MISTELLI, 2014).

Quando uma quebra ocorre, a concentração de proteínas de reparo em volta da mesma resulta na formação de focos citologicamente detectáveis e passíveis de movimento (LUKAS et al., 2005). Desta maneira, a maquinaria de reparo formada ao redor da quebra, passa então a procurar por regiões que facilitem o pareamento homólogo e conseqüentemente, o reparo por recombinação. A mobilidade limitada já comprovada em células de mamíferos influencia diretamente a frequência de certas translocações (KRAWCZYK et al., 2012). Acredita-se que após encontrar outra lesão dentro do seu volume de movimento, as duas quebras passem por ciclos transitórios de pareamento, conforme mostra a Figura 5. Embora muitos desses pares se separem após o reparo, alguns tornam-se permanentes, consumando assim a formação da translocação cromossômica (ROUKOS et al., 2013).

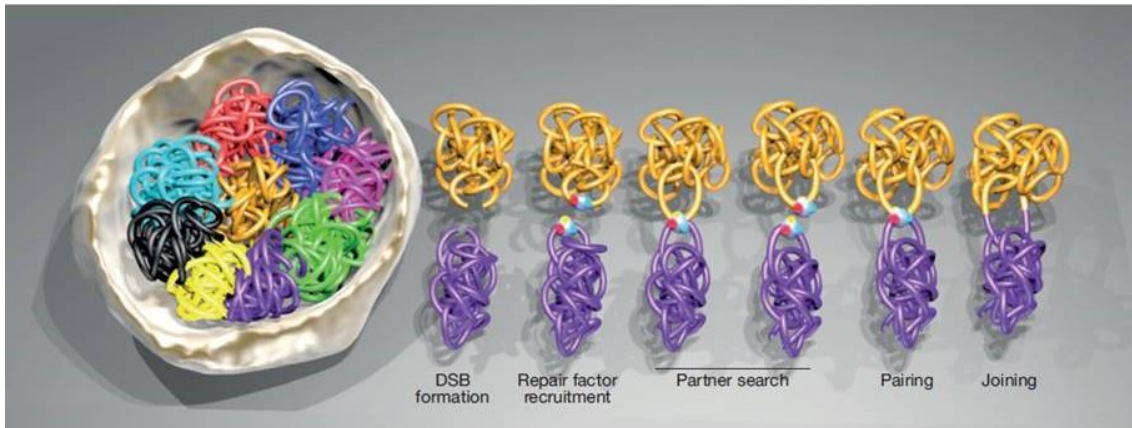


Figura 5: Biogênese da translocação. A disposição espacial dos cromossomos dentro do núcleo da célula é um fator determinante na frequência de determinadas translocações. Quando ocorre a quebra, cromossomos próximos (dourado e roxo) tem maior probabilidade de sofrerem translocação quando comparados com cromossomos mais distantes (verde e azul claro). A concentração de proteínas de reparo em volta da quebra resulta na formação de um foco de reparo. As quebras passam então por uma busca de parceiros, caso encontre as duas lesões passam por ciclos de emparelhamento e dissociação transitória. Embora na maioria das vezes os dois cromossomos se separem após o reparo, alguns envolvem-se em emparelhamento persistente, tornando-os susceptíveis a união ilegítima ocorrendo a translocação (ROUKOS & MISTELLI, 2014).

Evidências circunstanciais sugerem que determinadas características próprias da sequência do DNA, como por exemplo, a presença de ilhas CPGs, sítios frágeis, elementos repetitivos, ou ainda outros fatores como modificação de histonas e propriedades inerentes à cromatina, como sua descondensação e a ligação de fatores de transcrição, podem facilitar a susceptibilidade de quebras em certas regiões genômicas, predispondo à formação de translocações (ROUKUS et al., 2013).

Apesar de todo o avanço tecnológico alcançado durante esses quase cinquenta anos após a descrição da primeira translocação cromossômica causadora de doença, muitas questões permanecem desconhecidas. Não se sabe quanto tempo leva para uma translocação se formar; quanto tempo demora para que duas quebras se encontrem e nem tampouco, como ocorre a movimentação dentro do núcleo. Todas essas questões requerem a visualização detalhada das etapas que permeiam o processo de formação das mesmas, exigindo ferramentas experimentais ainda não disponíveis (ROUKOS & MISTELLI, 2014).

I.5 Rearranjos Cromossômicos Aparentemente Equilibrados Associados a Fenótipos Alterados

Quando um rearranjo cromossômico se estabelece, pequenos desequilíbrios genômicos podem ocorrer mesmo em indivíduos com fenótipo normal, sendo as regiões dos pontos de quebra mais complexas do que o esperado (WATSON et al., 2014). Assim sendo, o uso do termo aparentemente equilibrado é considerado o mais adequado para se referir a esse tipo de alteração.

Translocações aparentemente equilibradas (TAEs) caracterizam-se pela troca de segmentos entre cromossomos não-homólogos, sem que haja perda ou ganho de material genético detectado por métodos de citogenética clássica, como o bandamento GTG. Este rearranjo ocorre esporadicamente na população ou segrega-se em famílias com frequência aproximada de 1 em cada 600 nascimentos, e usualmente não acarreta nenhuma consequência fenotípica aos seus portadores (JACOBS et al., 1992). Entretanto, em casos mais raros, já foram descritos rearranjos cromossômicos estruturais aparentemente equilibrados relacionados a alterações fenotípicas. Os achados clínicos podem variar de acordo com a região e o cromossomo envolvido. Destacam-se entre os achados mais frequentes, a infertilidade, o atraso de desenvolvimento (AD), a deficiência intelectual (DI) e múltiplas malformações congênitas (SCHLUTH-BOLARD et al., 2012; UTAMI et al., 2014; ARISTIDOU et al., 2017).

A associação entre rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e alterações fenotípicas tem uma frequência aproximada de 7% para os casos *de novo*, podendo ser maior com o aumento do número dos pontos de quebra, como o que ocorre em rearranjos cromossômicos complexos (WARBURTON, 1991; MADAN et al., 1997). Em casos de alterações cromossômicas herdadas de indivíduos fenotipicamente normais, o risco para a prole apresentar alguma alteração de fenótipo, sendo portadora da mesma anomalia cromossômica, é muito baixo. No entanto, já foram publicados trabalhos

descrevendo este tipo de evento em pacientes aparentados (WENGER et al., 1995; RAO et al., 2010; ARISTIDOU et al., 2017).

A teoria de que o fenótipo anormal observado em pacientes portadores de TAE seja causado devido à disrupção gênica tem se tornado predominante (SCHUTH-BOLARD et al., 2012; UTAMI et al., 2014; SUZUKI et al., 2014; SCHUTH-BOLARD et al., 2019). Fonseca e colaboradores (2013) relataram dois casos de translocações aparentemente equilibradas envolvendo os cromossomos t(7;17) e t(7;20), em que o mapeamento dos pontos de quebra revelou a ocorrência de disrupção dos elementos reguladores *upstream* a *SOX9*, sugerindo alteração da expressão temporal ou espacial desse gene, podendo ser a causa do desenvolvimento de displasia campomélica acampomélica. Chen e colaboradores (2010), ao mapearem os pontos de quebra em pacientes portadores de TAE, encontraram disrupção em três genes candidatos ao desenvolvimento de deficiência intelectual, considerados como possíveis causadores desse fenótipo.

No entanto, além da disrupção gênica, vários outros mecanismos já foram propostos como possíveis responsáveis pelos achados clínicos presentes em pacientes portadores de TAE, tanto nos casos *de novo*, quanto nos casos familiares. O efeito de posição, a dissomia uniparental e a penetrância incompleta também já foram considerados (DUPONT et al., 2002; KLEINJAN & VAN HEYNINGEN, 2005; CALOUNOVA et al., 2006; SCHLUTH-BOLARD et al., 2009). As TAEs podem levar, ainda, ao desmascaramento de mutações com expressão recessiva devido a deleções ocorridas no cromossomo homólogo envolvido no rearranjo, bem como a desequilíbrios submicroscópicos diagnosticados perto ou distante dos pontos de quebra, que podem ser críticos para as alterações de fenótipo encontradas nesses pacientes (BUHLER, 1983; SISMANI et al., 2008).

Papadopoulou e colaboradores (2010) relataram um paciente diagnosticado como portador de translocação aparentemente equilibrada 46,XY,t(9;15)(q31;q26), que apresentava deficiência intelectual, face dismórfica, hipotonia, além de malformações cardíacas e renais. A investigação citogenômica feita por meio da Hibridação Genômica Comparativa em microarranjos (*array*-CGH) detectou uma duplicação de aproximadamente 5.8 Mb no braço longo do cromossomo 9 (9q34.1→9q34.3) e deleções em três regiões distintas do braço longo do cromossomo 15, além de uma inversão, confirmada por FISH, em (15q21.1→15q21.2) possivelmente relacionadas com o fenótipo do paciente.

Rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados podem ser observados apenas pelo método do cariótipo, contudo com resolução limitada. Diante disso, técnicas de maior acurácia como a FISH e o *array*-CGH têm sido aplicadas para melhor caracterização desses rearranjos em pacientes com alterações fenotípicas (SISMANI et al., 2008; BAPTISTA et al., 2008; SCHLUTH-BOLARD et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2015).

A maioria dos desequilíbrios diagnosticados em rearranjos aparentemente equilibrados são microdeleções. Isto pode ser decorrente dos mecanismos de formação dos rearranjos que, preferencialmente, levam à perda de material. Um outro fator a ser considerado seria a menor patogenicidade das duplicações, que pode influenciar na seleção amostral dos estudos (REDIN et al., 2017).

Apesar das microdeleções ou microduplicações ocorridas nas regiões dos pontos de quebra e junção figurarem entre as principais causas de alteração fenotípica em pacientes portadores de TAE, a investigação global do genoma alcançada por meio da técnica de *array*-CGH permite também o diagnóstico de desequilíbrios em cromossomos

não relacionados aos rearranjos e que podem ser críticos para a alteração fenotípica desses pacientes. Tais alterações são então classificadas como achados incidentais.

Estudos utilizando técnicas citogenômicas de alta resolução têm demonstrado que alterações submicroscópicas podem ocorrer em aproximadamente 31% dos pacientes portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e fenótipo anormal (Tabela 1). Dentre eles, alterações relacionadas aos pontos de quebra foram encontradas em aproximadamente 51%, sendo que que desequilíbrios em cromossomos não envolvidos nos rearranjos podem estar presentes em 28% dos casos. Estudos considerando apenas casos herdados são mais raros, mas também foram capazes de identificar desequilíbrios críticos, tanto nas regiões dos pontos de quebra quanto em outros locais do genoma, com uma frequência aproximada de 25% (TABET et al., 2015; ARISTIDOU et al., 2017).

Além disso, é importante considerar a possibilidade de influência do efeito de posição sob o fenótipo observado em pacientes portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados, particularmente após o *screening* genômico não ter revelado a presença de desequilíbrios críticos ou a interrupção de genes nas regiões dos pontos de quebra. O efeito de posição, definido como um mecanismo que causa alteração da expressão gênica devido à mudança de posição do gene dentro de seu ambiente cromossômico, e não estando associado à mutação ou deleção intragênica, pode estar associado a alterações fenotípicas, principalmente devido a alteração da região espacial do gene em relação a seus elementos reguladores. Exemplos do efeito de posição em humanos já foram descritos envolvendo vários genes e doenças genéticas, dentre eles *TWIST1* e *PITX2* cujas translocações e inversões estão associadas com a síndrome Saethre-Chotzen (OMIM: 101400) e a síndrome de Axenfeld-Rieger do tipo 1 (OMIM: 180500) (CAI et al., 2003; TREMBATH et al., 2004). Zapeda-Mendoza e colaboradores (2017)

sugeriram 16 genes que poderiam potencialmente estar sob o efeito de posição, responsáveis por alterações fenotípicas em 11 pacientes portadores de rearranjos equilibrados.

Tabela 1: Frequência de desequilíbrios submicroscópicos detectados por aCGH em portadores de rearranjos aparentemente equilibrados e fenótipo anormal.

Estudo	Plataforma de aCGH	Nº de Rearranjos estudados	Pacientes portadores de desequilíbrios	Desequilíbrios no ponto de quebra	Desequilíbrios em cis ao ponto de quebra	Desequilíbrios não associados aos rearranjos
Gribble et al. (2005)	BAC PAC 3500 clones/array painting	10	4	1	1	2
De Gregory et al. (2007)	Oligo 44B/244K (Agilent)	27	11	7	1	3
Baptista et al. (2008)	Sanger 30K Whole Genome Tile Path	14	4	3	0	1
Fantes et al. (2008)	1 Mb 'Cyto Chip' Blue Genome	46	6	3	3	0
Higgins et al. (2008)	2600 BAC Arrays/244 (Agilent)	11	6	2	3	1
Sismani et al. (2008)	1 Mb 'Cyto Chip' Blue Genome	12	3	1	1	1
Schluth-Bolard et al. (2009)	Oligo 44B/244K (Agilent)	33	16	7	4	5
Gijsbers et al. (2010)	262K SNP, 238K Styl SNP (Affymetrix)	9	7	2	2	3
Feenstra et al. (2011)	32K BAC, 105K ou 244K oligo (Agilent) ou 250K SNP (Affymetrix)	54	15	11	1	3
Tabet et al. (2015)	SNP Array – BeadChip (Illumina)	18	4	3	0	1
Simioni et al. (2017)	Genome Wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix)	15	3	1	0	2
Presente Estudo	<i>SurePrint G3 Human CGH Microarray 2x400K (Agilent)</i>	12	3	1	1	1
TOTAL		261	82 (31.4%)	42 (51.2%)	17 (20.73%)	23 (28.04%)

Justificativa

Alterações cromossômicas estruturais estão potencialmente associadas ao desenvolvimento de doenças genéticas devido à disrupção, inativação ou alteração da dosagem gênica. Mesmo rearranjos aparentemente equilibrados podem ser responsáveis pela manifestação de fenótipos alterados como infertilidade, atraso de desenvolvimento, deficiência intelectual e doenças neurocomportamentais (UTAMI et al., 2014).

Desde 1998, o Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) utiliza técnicas de citogenética clássica e molecular no auxílio da definição diagnóstica dos mais de 3.500 pacientes atendidos anualmente. Em média, são realizados 1.000 kariótipos anuais, sendo que em doze anos foram diagnosticados 405 rearranjos cromossômicos estruturais (MARTELLI, 2010).

A associação da técnica de Hibridação Genômica Comparativa por microarranjos (*array*-CGH) às demais metodologias já utilizadas por nosso grupo de pesquisa não apenas aumentou o poder de detecção dos rearranjos cromossômicos, bem como promoveu a identificação e a caracterização de material genético adicional, cromossomos em anel e inversões cromossômicas, elevando os índices de diagnóstico em pacientes atendidos no serviço de Genética Médica do HCFMRP-USP (GOMES, 2014).

Tendo em vista a importância da caracterização genômica de tais rearranjos para elucidação diagnóstica e maior conhecimento sobre os fatores envolvidos na correlação kariótipo-genótipo-fenótipo, nossa proposta foi realizar a investigação citogenômica em pacientes portadores de translocação aparentemente equilibrada e alteração fenotípica. A alta resolução da metodologia empregada visa não apenas determinar se tais rearranjos são realmente equilibrados ou não, bem como estabelecer a correlação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes nos quais foram diagnosticados desequilíbrios genômicos submicroscópicos. Tal investigação é considerada essencial para a definição de riscos de

recorrência contribuindo com o aconselhamento genético e conseqüentemente melhor assistência às famílias.

Nossa hipótese foi que a ocorrência de desequilíbrios genômicos, relacionados ou não com regiões de quebras cromossômicas, pudessem estar contribuindo para as alterações fenotípicas detectadas em pacientes portadores de translocação aparentemente equilibrada.

Objetivos

II.1.Geral

O objetivo principal deste trabalho foi identificar e caracterizar desequilíbrios genômicos relacionados a alterações fenotípicas presentes em pacientes portadores de translocação cromossômica aparentemente equilibrada.

II.2.Específicos

1) Refinar a localização dos pontos de quebra cromossômica e caracterizar as alterações genômicas diagnosticadas em pacientes portadores de translocação cromossômica aparentemente equilibrada, combinando técnicas de citogenética molecular (FISH) e citogenômica (*array*-CGH).

2) Determinar se o rearranjo estrutural é realmente equilibrado ou se o mesmo apresenta desequilíbrios genômicos nas regiões dos pontos de quebra cromossômica, por meio da técnica de *array*-CGH.

3) Estabelecer a correlação entre os desequilíbrios genômicos detectados e as alterações fenotípicas presentes em pacientes com translocação aparentemente equilibrada.

4) Estabelecer correlação entre cariótipo, genótipo e fenótipo dos pacientes para orientação diagnóstica e maior conhecimento sobre o efeito da dosagem dos genes mapeados nas regiões de perdas e ganhos genômicos.

Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Molecular Humana do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em parceria com os Laboratórios de Citogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) e o Laboratório de Citogenética da Universidade de Alberta, em Edmonton no Canadá.

III.1 Casuística

A amostra foi composta por 12 pacientes portadores de translocação cromossômica aparentemente equilibrada (TAE) que apresentavam alterações fenotípicas, encaminhados ao Ambulatório de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (GEN3-HCFMRP-USP) para elucidação diagnóstica. A seleção dos mesmos foi feita a partir do banco de dados de pacientes atendidos pelo setor de Genética Médica do HCFMRP até o ano de 2017, baseando-se em critérios clínicos e citogenéticos. Inicialmente foram selecionados 16 pacientes portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e achados clínicos positivos, incluindo 12 casos de translocação e 4 casos de inversão cromossômica. Embora todos os pacientes tenham sido avaliados, optamos por incluir neste trabalho apenas os casos de TAE.

Os pacientes e familiares foram informados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I) referente à participação na pesquisa, aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP-HCRP nº7491/2015) (Anexo II). A avaliação clínica dos mesmos foi realizada no Ambulatório de Genética Médica (GEN-3) por dois médicos geneticistas, sob supervisão da Prof. Dra. Lucia Regina Martelli em colaboração com os médicos assistentes e residentes do setor (Anexo III).

O delineamento experimental buscou a correlação entre o genótipo e o fenótipo, passando pelas etapas: A) seleção das amostras composta por pacientes portadores de TAE e alteração fenotípica; B) caracterização genômica pelo método de *array*-CGH; C) validação dos desequilíbrios genômicos considerados críticos para o fenótipo de cada paciente por meio da técnica de FISH.

III.2 Material

Foram coletadas duas amostras de sangue periférico de cada paciente:

- a. Uma amostra de 5mL em tubo Vacutainer[®] contendo heparina sódica para estudo citogenético convencional por bandamento GTG e estudo citogenético molecular pela técnica de FISH.
- b. Uma amostra de 5mL em tubo Vacutainer[®] contendo EDTA para caracterização genômica por meio da técnica de *array*-CGH.

III.3 Métodos

III.3.1 Citogenética Clássica

Técnica de Cultura Temporária de Linfócitos (MOORHEAD et al., 1960 modificada):

Uma alíquota de 500µL de sangue coletado foi cultivada em 5mL de meio RPMI 1640 (GIBCO[®], Invitrogen) com L-glutamina suplementado com 2% de fitohemaglutinina (GIBCO[®], Invitrogen), estreptomicina/penicilina (GIBCO[®], Invitrogen) e 20% de soro bovino fetal (GIBCO[®], Invitrogen) em estufa CO₂ a 37°C, por 72 horas. Quinze minutos antes de completar as 72 horas, foram adicionados na cultura

0,3 mL de colchicina 0,0016% (SIGMA[®]), retornando à estufa até completar o tempo de incubação.

Ao final do período de incubação (72h), o material foi centrifugado por 10 minutos a 120 x g e o sobrenadante descartado. Adicionaram-se 5 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C e o material foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 37°C por 25 minutos. Foram adicionadas 10 gotas de solução *Carnoy* (3 metanol : 1 ácido acético) para interromper a ação da solução hipotônica e após homogeneização, os tubos foram novamente levados à centrifuga por 10 minutos a 120 x g. O sobrenadante foi retirado e o material fixado pela adição de 5mL de solução fixadora de *Carnoy*. O material foi homogeneizado e mantido por 10 minutos em repouso a 25°C. Em seguida, centrifugado por 10 minutos a 120 x g e o sobrenadante descartado. A etapa de fixação foi repetida mais duas vezes, sendo que da última vez a concentração da solução fixadora foi de 1 metanol : 1 ácido acético. Parte da suspensão celular resultante foi utilizada para a preparação das lâminas e o restante mantido em freezer a – 20°C.

Técnica de Bandamento GTG (SCHERES, 1972):

Para obtenção do bandamento GTG, as lâminas preparadas a partir de suspensão celular, obtidas por meio da cultura temporária de linfócitos, foram mantidas a 25°C por três a cinco dias e mergulhadas em tripsina (DIFCO 1:250) diluída a 0,1% em tampão fosfato (0,06M pH 6,8) por um a vinte segundos, dependendo do tempo de envelhecimento da lâmina. A ação da tripsina foi neutralizada com água destilada e, em seguida, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa (MERCK[®]) (1:30) por 10 minutos. Foram analisadas 20 metáfases de cada paciente para determinação do cariótipo. A análise microscópica foi realizada em microscópio Axio Imager.D2 (ZEISS[®]), em objetiva plan APO 100x, acoplado ao sistema computadorizado de análise *MetaSystems*,

utilizando-se o *software* IKAROS para análise do padrão de bandas, montagem dos cariótipos e documentação dos resultados.

III.3.2 Citogenômica

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por meio do método *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* – Epicentre (US), a partir de 200µL de sangue total coletado dos pacientes, seguindo as recomendações do fabricante. O material obtido foi estocado a -20°C após quantificação por *NanoDrop*, utilizando-se 2µL de cada amostra.

Técnica de Hibridação Genômica Comparativa por Microarranjos (*array-CGH*)

Para realização da técnica de *array-CGH* foi utilizado o chip *Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K* (Agilent®, USA). Essa plataforma possui 420.288 sondas em regiões não-variantes do genoma, com espaçamento médio de 5,3kb, permitindo a detecção de variações de número de cópias (CNVs), bem como ganhos e perdas em todo o genoma. Nesta técnica, o DNA genômico da amostra (DNA teste) e um DNA controle (DNA referência), adquirido comercialmente, são diferentemente marcados com as cores azul e vermelha e hibridados em lâmina contendo sondas que cobrem todo o genoma humano.

A primeira etapa após a extração e quantificação do DNA foi a de fragmentação, realizada com o kit *Genomic DNA Enzymatic Labeling* (Agilent®, USA). A solução de digestão foi preparada de acordo com as instruções do fornecedor, para os DNAs dos pacientes e seus respectivos controles, masculino e feminino, adquiridos da mesma empresa (Agilent®, USA). A reação de fragmentação foi preparada contendo, além das enzimas de restrição Alu I (10 U/µL) e Rsa I (10U/µL), água nuclease-free, tampão 10x

e BSA acetilado (10 U/ μ L). Foram adicionados 5,8 μ L desta mistura a cada tubo de reação contendo 20,2 μ L de DNA genômico, completando um volume de 26 μ L. As amostras foram digeridas em termociclador segundo o protocolo: 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 20 minutos para inativação enzimática e então mantidas a 4°C até a finalização manual do programa. Para verificação do tamanho dos fragmentos gerados, utilizamos 2 μ L de cada amostra em gel de agarose 2%, devendo apresentar entre 200 a 800 pb.

Na segunda etapa, foi realizada a marcação do DNA teste e do DNA controle com os fluoróforos, *Cyanine 3*-dUTP (Cy3) e *Cyanine 5*-dUTP (Cy5). Inicialmente, foram adicionados às amostras 5 μ L de *random primer* e novamente submetidas ao termociclador, programado em dois passos: o primeiro de três minutos a 95°C e o segundo a 4°C até a finalização manual do programa. O *mix* de marcação foi preparado contendo água nuclease-free, tampão de reação 5x, dNTPs 10x e ExoKlenow, além dos fluoróforos Cy5 e Cy3. Foram então adicionados 21 μ L do *mix* de marcação em cada um dos tubos de reação contendo o DNA genômico, totalizando um volume de 50 μ L cada. As amostras foram levadas ao termociclador utilizando-se o mesmo programa da etapa de fragmentação.

A terceira etapa foi a de purificação realizada com filtros Amicon 30kDa. Primeiramente, foram adicionados a cada amostra, 430 μ L de TE 1x (pH 8.0). Os filtros foram posicionados em tubos de microcentrífuga e carregados com DNA marcado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 17.530 x g, em temperatura ambiente. Após o descarte do filtrado, foram adicionados mais 480 μ L de TE 1x, repetindo a centrifugação e o descarte do filtrado. O material retido, juntamente com o filtro, foi vertido em novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL e centrifugado por um minuto em temperatura ambiente a 358 x g, para obter a amostra purificada. O volume de cada amostra foi mensurado em pipeta e completou-se com TE 1x para um volume final de

41µl. Cada amostra foi então quantificada em *NanoDrop* para determinação do rendimento das cianinas. Finalmente, as amostras teste e controle, devidamente marcadas com *cyanine-5* e *cyanine-3*, foram combinadas em um único *mix* para análise genômica comparativa.

A etapa seguinte foi a de preparação do DNA marcado para a hibridação. Nesta etapa foi preparada uma solução de hibridação com 212,5µL de Cot-1 DNA (1,0mg/mL), 221µL de 10x aCGH Blocking Agent e 1.105µL de tampão de hibridação 2x HI-RPM. Um volume de 181µL foi adicionado em cada tubo contendo o DNA marcado totalizando 260µL. Após homogeneização por pipetagem, as amostras foram levadas ao banho seco a 95°C por 3 minutos e a 37°C por 30 minutos.

A plataforma utilizada permite a realização de dois experimentos por lâmina. Desta forma, na etapa de hibridação, 245µL do *mix* de hibridação misturados ao DNA do paciente foram aplicados em cada um dos campos da lamínula, que foi unida à lâmina de hibridação e envolvida por uma câmara de vedação. A mesma câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridação a 67°C, 20 rpm, por 40 horas.

Na etapa seguinte, foram feitas as pós-lavagens. Inicialmente, lâmina e lamínula foram separadas manualmente e mergulhadas em tampão de lavagem Oligo aCGH I em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas, sendo a primeira lavagem feita com tampão Oligo aCGH I, em temperatura ambiente por cinco minutos, com agitação magnética. A segunda lavagem foi feita com o tampão Oligo aCGH 2, a 37°C com agitação magnética por um minuto.

Após as lavagens, as lâminas foram posicionadas no suporte *SureScan* para serem escaneadas. Para o escaneamento das lâminas de *microarray*, utilizou-se o Agilent *SureScan C Scanner G2505*. O *software* “*The Feature Extraction*” v10.5, foi utilizado para a análise das imagens.

III.3.3 Metodologia de Análise

Os dados gerados foram interpretados com o auxílio do *software CytoSuretm ogt*, desenvolvido pela Oxford *gene technology*[®]. Esse *software* permite a visualização e análise de alterações no número de cópias de diversas plataformas como *array-CGH* e *SNP-array*, possuindo integração com bancos de dados externos, como o DGV, o DECIPHER e o OMIM entre outros, fato que permite uma ampla análise dos resultados.

O *software* utilizado foi configurado com o *Fast Adaptive States Segmentation Technique* (FASST2), com um limiar de significância de 1.0E-5 e um espaço máximo entre sondas adjacentes de 1.000 Kb. Sinais alterados incluíram três ou mais sondas adjacentes para serem considerados. Foi estimado para ganho, um limiar de 0,42; para alto ganho, limiar de 1,14; para perdas -0,62; e para perdas em homozigose -1,1. A interpretação dos resultados foi realizada por meio de pesquisa nos bancos de dados *online* como o *Genome Browser* (GRCh37/hg19), o *GeneCard*, o DGV, o DECIPHER v9.15, o OMIM e o PubMed.

As CNVs detectadas foram classificadas como: patogênicas; variantes de significado incerto ou benignas, seguindo os critérios descritos por RIGGS et al. 2012. Uma CNV é tida como patogênica majoritariamente se a região incluir genes com funções já bem estabelecidas que possam ter influência sobre o fenótipo observado e/ou se pelo menos três perdas ou duplicações já tiverem sido relatadas em indivíduos não relacionados apresentando fenótipo similar.

A CNV é classificada como de significado incerto majoritariamente se: a função dos genes dentro da região ainda não estiver bem estabelecida; um único relato de perda ou ganho já tiver sido relatado em um indivíduo com alteração fenotípica, ou se a mesma alteração genômica for encontrada numa série de indivíduos sem associação fenotípica bem reconhecida.

A CNV é reconhecida como benigna se perdas ou duplicações desta região já tiverem sido relatadas em indivíduos com fenótipo normal.

III.3.4 Validação dos resultados

A validação das CNVs consideradas críticas para a manifestação fenotípica foi realizada pela técnica de FISH.

Para a realização desta técnica foram utilizadas sondas *locus* específicas (LSI) ou sondas customizadas obtidas a partir de cromossomos artificiais de bactérias (BACs) marcadas com fluorocromos distintos, a fim de identificar com precisão as diferentes alterações encontradas em cada paciente. As sondas BAC foram selecionadas a partir do banco de dados UCSC *Genome browser* (GRCh37/hg19). Foram selecionadas as sondas que mostravam no mínimo 98% de identidade em relação a região de interesse no genoma humano e 100% de especificidade, ou seja, não apresentavam hibridação cruzada com nenhum outro cromossomo ou região no mesmo cromossomo de interesse. As sondas BAC utilizadas para validação dos rearranjos cromossômicos avaliados neste estudo estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sondas BAC utilizadas para a validação das deleções diagnosticadas por array-CGH no presente estudo

Paciente	Sonda BAC	Região cromossômica	Cor
4	RP11-916J15	10q22.2	Vermelha
	RP11-2C13	2q33.1	Verde
6	RP11- 355J3	2q24.2	Verde
8	RP11-452A20	3q13	Verde
	RP11-412B12	8p21.2	Vermelha

A técnica de FISH para a validação dos rearranjos foi aplicada de acordo com o protocolo do fornecedor, com pequenas modificações. As lâminas, contendo o material biológico, foram envelhecidas por no mínimo três dias, em temperatura ambiente (25°C). Após esse período, foram incubadas em solução de 2xSSC a 37°C por 30 minutos. Em

seguida, o material foi desnaturado em solução de formamida 70% a 76°C por cinco minutos e desidratado em etanol 70%, 90% e 100% a 25°C, por um minuto. Após secas as lâminas, foram então aplicados 10µl da combinação de sondas, previamente desnaturadas a 76°C por 5 minutos. As lâminas foram vedadas e a hibridação ocorreu em *ThermoBrite* (Abbot Molecular®, USA) mantendo a temperatura de 37°C, por pelo menos 16 horas.

Após hibridação, as lâminas foram submetidas à lavagem em solução de 2xSSC/0,3% Igepal CA-630 (SIGMA®) a 76°C por dois minutos, coradas com solução de DAPI/*antifade* 1:1 (Vector Laboratories CA, USA) e armazenadas a -20°C em recipiente escuro, por no mínimo duas horas antes da análise. Foram documentadas 10 metáfases analisadas em microscópio de fluorescência Axio Imager.D2 (ZEISS®), objetiva Plan APO 100x, acoplado ao sistema computadorizado de análise (MetaSystems®, Germany), por meio do *software* ISIS. Os critérios para análise dos sinais em células metafásicas foram os descritos por Bayani & Squire (2004).

Resultados

IV.1. Diagnóstico Citogenético

Os doze pacientes selecionados foram diagnosticados como portadores de TAE e alterações fenotípicas que variavam entre: atraso de desenvolvimento e da fala, deficiência intelectual, alterações de comportamento e dismorfias.

O diagnóstico citogenético, assim como os principais achados fenotípicos e o mecanismo de herança dos rearranjos cromossômicos estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Cariótipo convencional, descrição fenotípica e o tipo de herança dos rearranjos em 12 pacientes portadores de translocação aparentemente equilibrada

Nº	Diagnóstico Citogenético	Principais achados clínicos	Herança
1	46,XY,t(4;5)(q33;q12)	Atraso de desenvolvimento + Doença do nó sinusal + Cardiomiopatia hipertrófica	Herdada
2	46,XY,t(10;17)(q26.1;q21.1)	Atraso de desenvolvimento + Deficiência intelectual grave + Convulsões + Dismorfias	Herdada
3	46,XY,t(1;3)(q42;q27)	Alteração de comportamento (Heteroagressividade) + Dificuldade escolar + Alta miopia	Herdada
4	46,XX,t(2;10;12)(q33;q24;q24.3)	Atraso de desenvolvimento + Deficiência intelectual + Alterações de comportamento + Dismorfias	<i>De novo</i>
5	46,XX,t(5;18)(q15;p11.2)	Hipotonia + Atraso de desenvolvimento + Deficiência intelectual + Dismorfias	<i>De novo</i>
6	46,XX,t(3;15)(q29;q15)	Atraso de desenvolvimento + Deficiência intelectual grave + Alterações de comportamento + Dismorfias	<i>De novo</i>
7	46,XX,t(2;8)(q37;q24)	Atraso de desenvolvimento + Deficiência intelectual + Dismorfias	<i>De novo</i>
8	46,XY,t(3;8)(q13.2;p21)	Atraso de desenvolvimento + Dismorfias	<i>De novo</i>
9	46,XX,t(2;16)(p16;q24)	Atraso de desenvolvimento + Deficiência intelectual + Dismorfias	<i>De novo</i>
10	46,XX,t(X;4)(q21;q32)	Atraso de desenvolvimento e da fala + Deficiência intelectual + Dismorfias	<i>De novo</i>
11	46,XY,t(1;11)(q31;p13)	Genitália ambígua	*Indeterminada
12	46,XX,t(2;11)(p25;q13)	Atraso de desenvolvimento + Deficiência intelectual + Dismorfias	**Indeterminada

*Pai indisponível; **Um dos progenitores falecido.

IV.2. Diagnóstico Citogenômico

A avaliação citogenômica por *array*-CGH evidenciou que as translocações eram realmente equilibradas em 10 casos, excluindo a presença de alterações genômicas nas regiões dos pontos de quebra diagnosticados nesses dez pacientes.

Em dois casos, paciente 4 e paciente 8, correspondentes a 16,66% do grupo amostral, foram diagnosticados rearranjos cromossômicos não equilibrados, com detecção de perdas genômicas em regiões correspondentes aos pontos de quebra da translocação cromossômica.

Dois casos apresentaram ainda desequilíbrios genômicos possivelmente associados aos achados clínicos: a mesma paciente 4 e a paciente 6 da Tabela 3, sendo que a alteração genômica evidenciada em P6 encontrava-se em uma região não relacionada à translocação previamente detectada pelo cariótipo.

IV.2.1. Translocações não equilibradas

A paciente 4, portadora do cariótipo 46,XX,t(2;10;12)(q33;q24;q24.3), apresentou uma microdeleção de 140 Kb na banda 2q33.1, mesma região de quebra diagnosticada pelo cariótipo, envolvendo parte do gene *PLCL1*, considerada *de novo*, uma vez que a validação por FISH não revelou perda dessa região nos pais, conforme mostra a Figura 6.

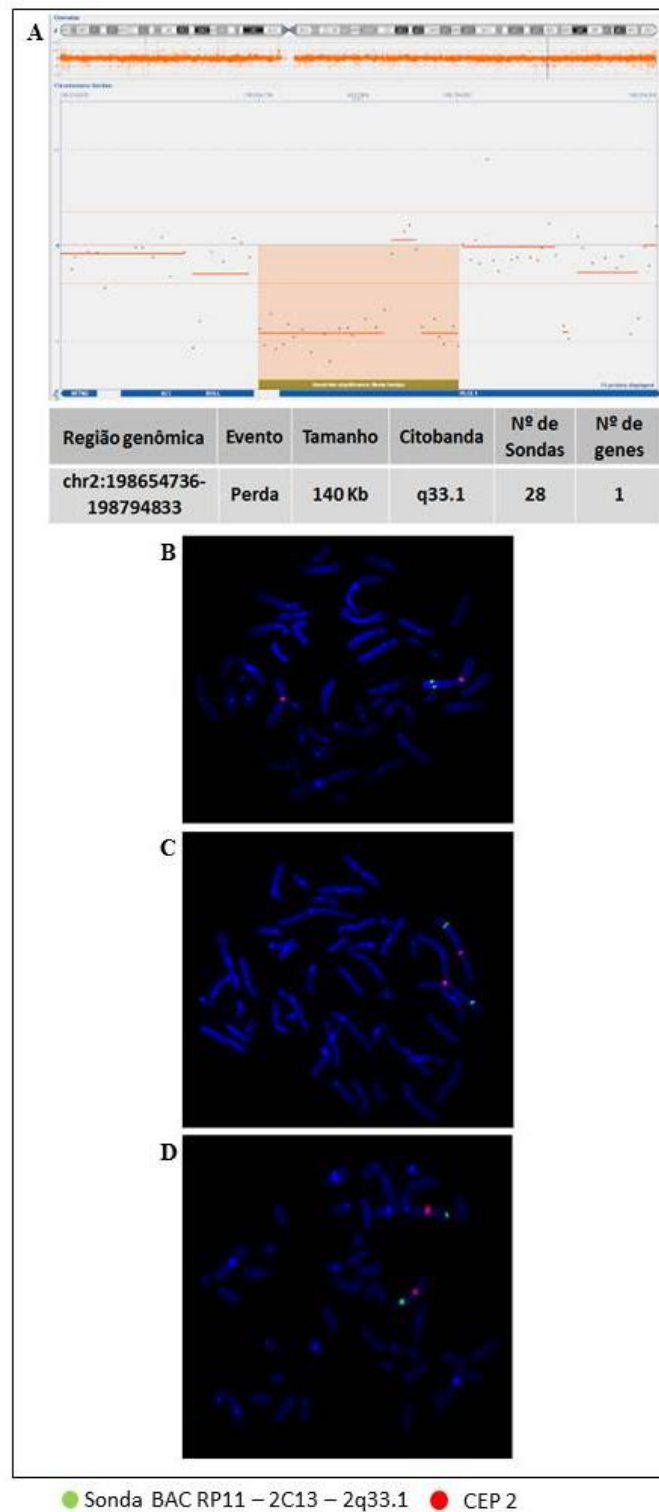


Figura 6: (A) Perda de 140 Kb sobrepondo-se a região 2q33.1 diagnosticada em P4, mesma região de quebra sugerida pelo cariótipo, classificando o rearranjo como uma translocação não equilibrada. Imagem obtida a partir do *Software* de análise Ogt. (B-D) Validação por FISH utilizando-se a sonda BAC RP11-2C13 (Spectrum Green) em associação com a sonda centromérica do cromossomo 2 (Spectrum Orange), controle. (B) Célula metafásica após aplicação da técnica de FISH em P4. A ausência de sinal verde em um dos cromossomos marcados confirma a ocorrência de deleção da região 2q33.1 em P4. (C-D) Célula metafásica da mãe de P4 (C) e do pai de P4 (D) evidenciando a presença de 2 sinais verdes e 2 sinais vermelhos, excluindo a possibilidade de deleção da região 2q33.1 nos pais da paciente, confirmando ser esta uma alteração *de novo*. Imagens obtidas a partir da objetiva de 100x com auxílio do *Software* ISIS.

O paciente 8, portador do cariótipo 46,XY,t(3;8)(q13.2;p21) (Figura 7), foi diagnosticado com uma perda em 3q13.12-q13.13 de 1.32 Mb arr[hg19] 3q13.12q13.13(107016343-108335249)x1 incluindo 14 genes (*DUBR*; *LOC649024*; *CCDC54*; *BBX*; *LINC00635*; *LINC00636*; *CD47*; *IFT57*; *HHLA2*; *HNRNPA1P17*; *MYH15*; *RPL13P8*; *CIP2A*; *DZIP3*) e uma perda de 129.83 Kb em 8p21.2 (arr[hg19] 8p21.2(26261809-26391635)x1) que englobava os genes *BNIP3L*; *LOC100289047*; *PNMA2*; *DPYSL2*. Ambas as alterações foram consideradas *de novo*, Figuras 8 e 9 respectivamente. Os diagnósticos citogenético e citogenômico de P8 foram então definidos como: 46,XY,t(3;8)(q13.12;q13.13) e arr[hg19] 3q13.12q13.13(107016343-108335249)x1;8p21.2(26261809-26391635)x1.

O fato dessas microdeleções, diagnosticadas nos pacientes 4 e 8, ocorrerem nas mesmas regiões de quebras cromossômicas sugeridas pelos seus respectivos cariótipos, permitiu classificá-las como translocações cromossômicas não equilibradas.

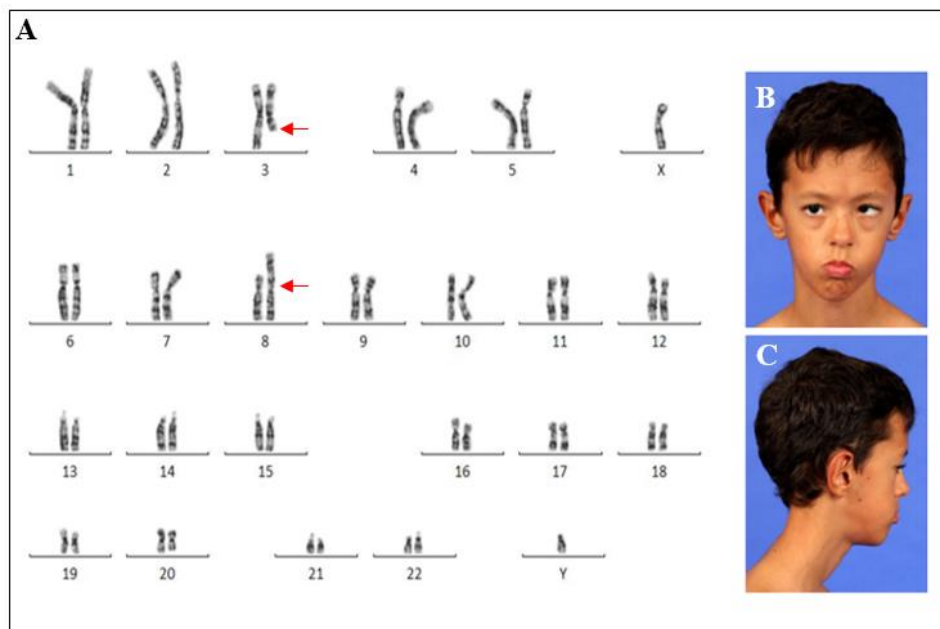


Figura 7: (A) Cariótipo por bandamento GTG do paciente 8 (P8) portador de translocação aparentemente equilibrada envolvendo os pares cromossômicos 3 e 8 com diagnóstico citogenético 46,XY,t(3;8)(q13.2;p21). As setas indicam as regiões dos pontos de quebra. Imagem obtida a partir do software Ikaros, objetiva de 100x (B-C) Fotos clínicas de P8 mostrando dismorfias craniofaciais.

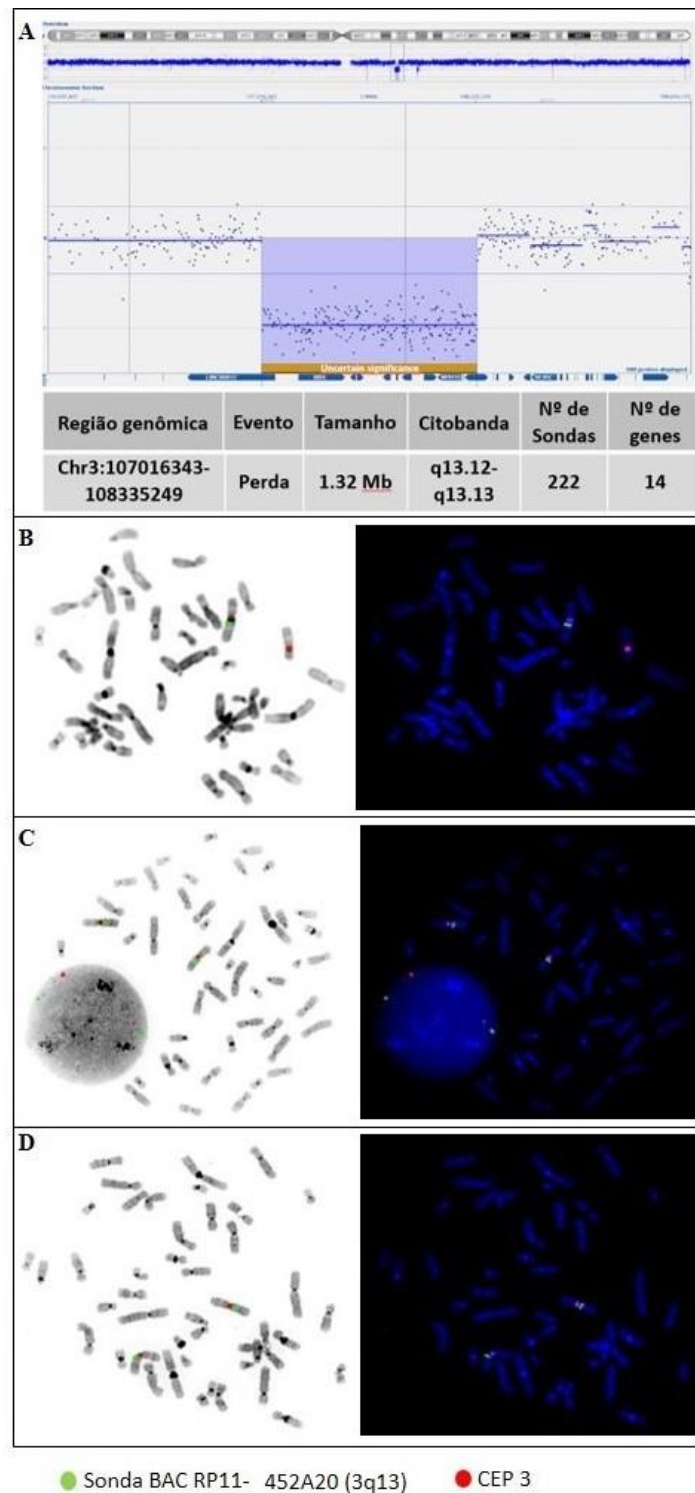


Figura 8: (A) Perda de 1.32 Mb sobrepondo-se a região 3q13.12-q13.13 diagnosticada em P8, mesma região de quebra sugerida pelo cariótipo, classificando o rearranjo como uma translocação não equilibrada. Imagem obtida a partir do *Software* de análise Ogt. (B-D) Validação por FISH utilizando-se a sonda BAC RP11-452A20 (Spectrum Green) em associação com a sonda centromérica do cromossomo 3 (Spectrum Orange), controle. (B) Célula metafásica após aplicação da técnica de FISH em P8. A ausência de sinal verde em um dos cromossomos marcados confirma a ocorrência de deleção da região 3q13 em P8. (C-D) Célula metafásica da mãe de P8 (C) e do pai de P8 (D) evidenciando a presença de 2 sinais verdes e 2 sinais vermelhos, excluindo a possibilidade de deleção da região 3q13 nos pais do paciente, confirmando ser esta uma alteração de novo. Imagens obtidas a partir da objetiva de 100x com auxílio do *Software* ISIS.

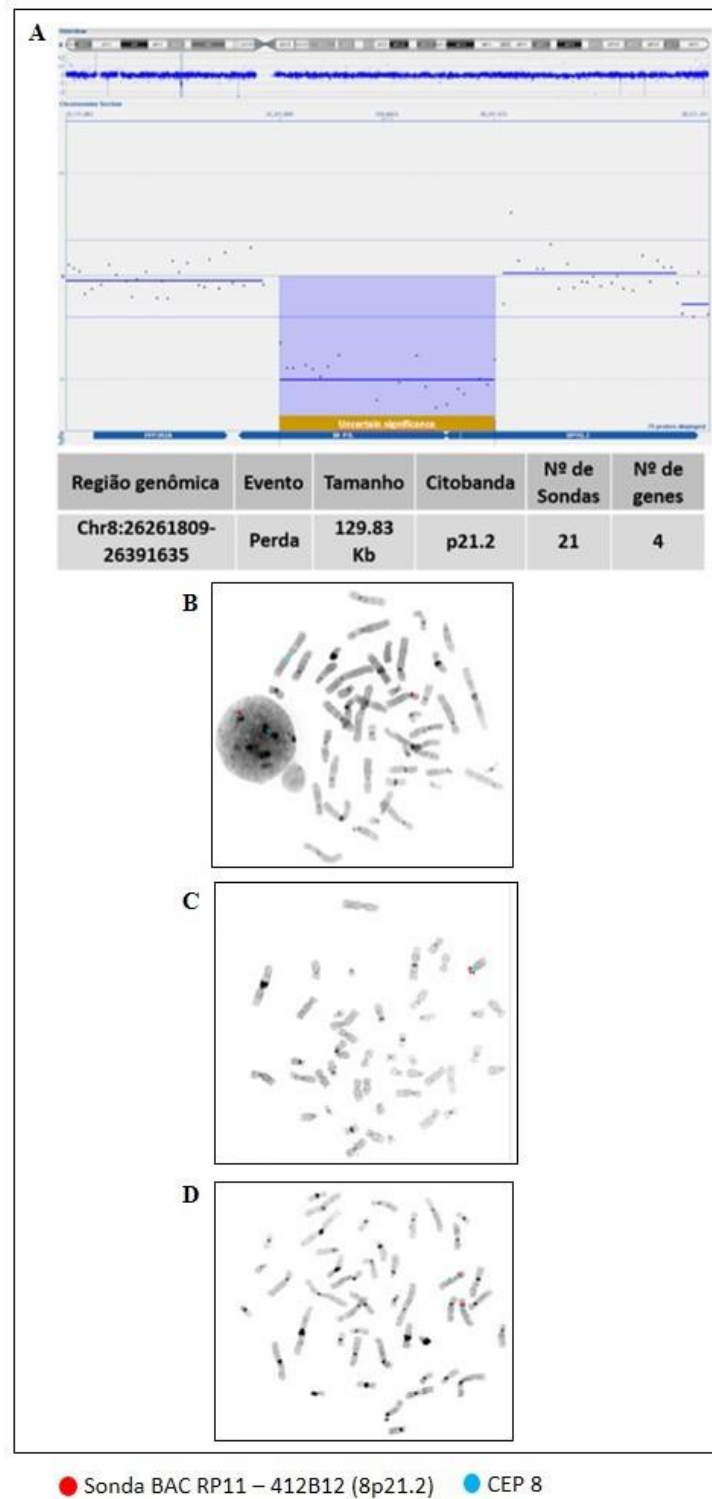


Figura 9: (A) Perda de 129.83 Kb sobrepondo-se a região 8p21.2 diagnosticada em P8, mesma região de quebra sugerida pelo cariótipo, classificando o rearranjo como uma translocação não equilibrada. Imagem obtida a partir do *Software* de análise Ogt. (B-D) Validação por FISH utilizando-se a sonda BAC RP11-412B12 (Spectrum Orange) em associação com a sonda centromérica do cromossomo 8 (Spectrum Aqua), controle. (B) Célula metafásica após aplicação da técnica de FISH em P8. A ausência de sinal vermelho em um dos cromossomos marcados confirma a ocorrência de deleção da região 8p21.2 em P8. (C-D) Célula metafásica da mãe de P8 (C) e do pai de P8 (D) evidenciando a presença de 2 sinais vermelhos e 2 sinais azuis, excluindo a possibilidade de deleção da região 8p21.2 nos pais do paciente, confirmando ser esta uma alteração de novo. Imagens obtidas a partir da objetiva de 100x com auxílio do *Software* ISIS.

IV.2.2. Desequilíbrios críticos

Adicionalmente, foram detectados desequilíbrios genômicos considerados críticos para a manifestação fenotípica em dois casos: um deles em região próxima ao rearranjo cromossômico, detectado na paciente 4, descrita acima com diagnóstico de translocação cromossômica $t(2;10;12)(q33;q24;q24.3)$ não equilibrada, e o outro detectado na paciente 6, com cariótipo $46,XX,t(3;15)(q29;q15)$, este classificado como achado incidental (Tabela 3).

Paciente 4 (P4)

Paciente do sexo feminino encaminhada para avaliação genético-clínica por atraso na fala, evoluindo com deficiência intelectual associada à alterações de comportamento, tanto auto quanto heteroagressividade, além de dismorfias craniofaciais como frontal amplo, telecanto, filtro nasal curto, micrognatia, orelhas rodadas com cruz da hélix horizontal, braquidactilia e encurtamento do quarto metatarso, representadas na Figura 10.



Figura 10: Fotos clínicas de P4 evidenciando os principais achados clínicos. (A-B) Vista anterior e lateral, evidenciando as dismorfias craniofaciais. (C) Imagem em destaque da orelha da paciente mostrando cruz da hélix horizontal. (D) Vista posterior das mãos indicando braquidactilia (E) Vista superior do pé mostrando encurtamento do 4º metatarso.

A avaliação citogenética por bandamento GTG revelou a presença de translocação complexa originada *de novo* com cariótipo, 46,XX,t(2;10;12)(q33;q24;q24.3), conforme Figura 11.

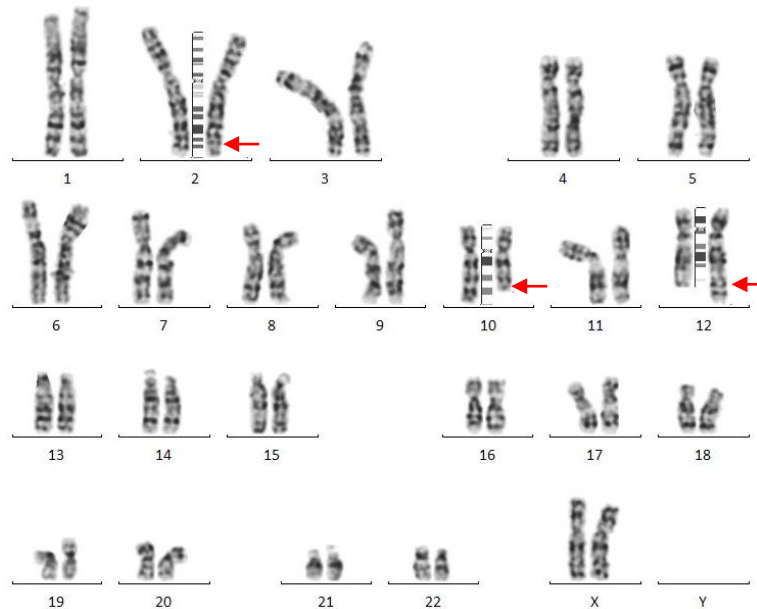


Figura 11: Cariótipo por bandamento GTG da paciente 4 (P4) revelando rearranjo cromossômico complexo inicialmente descrito como: 46,XX,t(2;10;12)(q33;q24;q24.3), as setas indicam as regiões dos pontos de quebra. Imagem obtida a partir do *software* Ikaros, objetiva de 100x.

A investigação citogenética molecular por FISH, utilizando-se a sonda de 4 cores para avaliação de deleção do gene *PTEN* (10q23) (PFR7032A – CymoGen) em associação com a sonda específica para região subtelomérica do braço longo do cromossomo 12 (LPT12QR – Cytocell), confirmou o envolvimento dos três pares cromossômicos (2,10 e 12) no rearranjo conforme mostra a Figura 12.

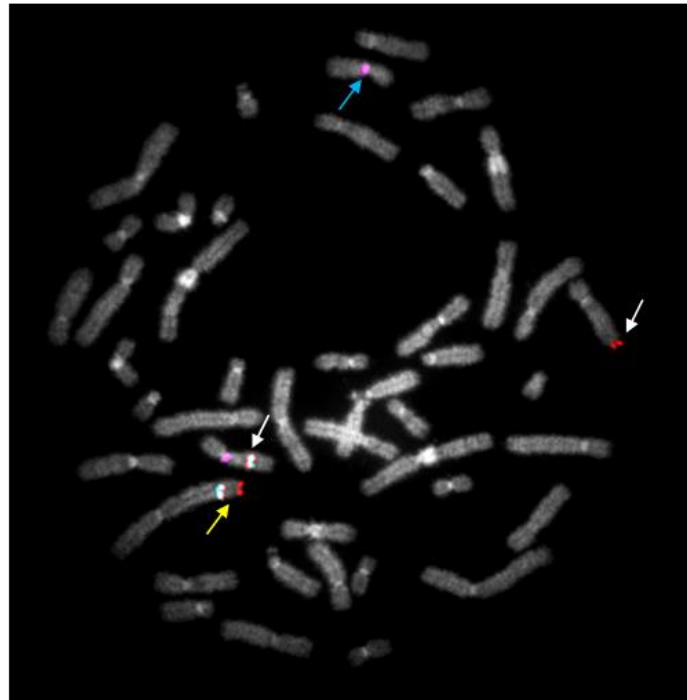


Figura 12: Metáfase da paciente 4 após aplicação da técnica de FISH, utilizando-se a sonda quatro cores para avaliação do gene *PTEN* (região 10q23 - (PFR7032A – CymoGen) em associação com a sonda 12qter (12q24.33 – LPT12QR) marcada em vermelho. A seta amarela indica o cromossomo 2 derivativo com a inserção de 10q23 e 12qter. A seta azul indica o cromossomo 10 com a deleção de 10q23, sendo observado apenas o sinal rosa que se sobrepõe ao centrômero. As setas brancas indicam os cromossomos 10 e 12 normais, com as marcações rosa, verde, laranja e azul para o cromossomo 10 e vermelho para o cromossomo 12. Imagem obtida a partir do *software* Isis, objetiva de 100x

A análise citogenômica por *array*-CGH detectou uma perda de 233.88 Kb em 10q22.2 arr[hg19] 10q22.2(77437446-77671331)x1 confirmada por FISH (Figura 13). Esta alteração, caracterizada como a menor deleção intersticial envolvendo a banda 10q22.2 já descrita na literatura até o momento, está localizada aproximadamente 20 Mb distante do ponto de quebra sugerido pelo cariótipo (10q24) e engloba parte do gene *C10orf11* (Figura 14).

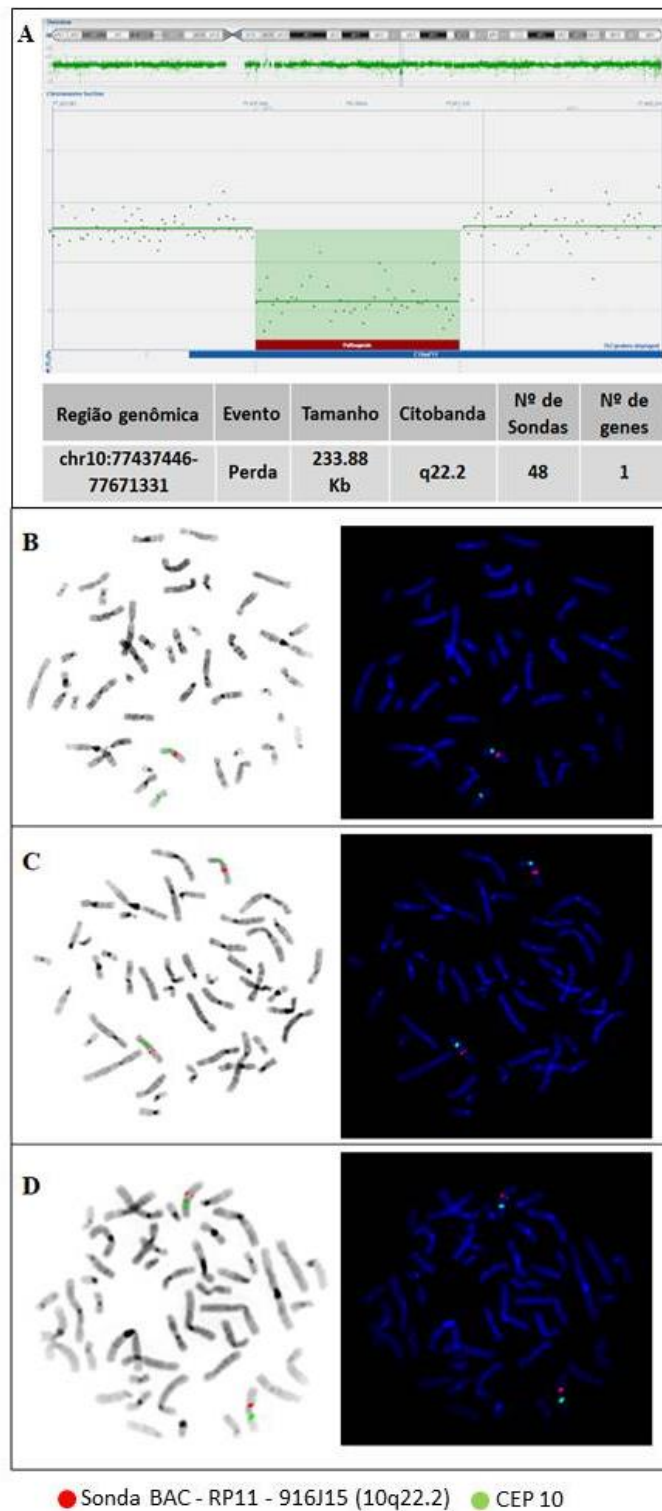


Figura 13: (A) Perda de 233.88 Kb sobrepondo-se a região 10q22.2 diagnosticada em P4 envolvendo parte do gene *C10orf11*. Imagem obtida a partir do *Software* Ogt. (B-D) Validação por FISH utilizando-se a sonda BAC RP11- 916J15 (Spectrum Orange) em associação com a sonda centromérica do cromossomo 10 (Spectrum Green), controle. (B) Célula metafásica após aplicação da técnica de FISH em P4. A ausência de sinal vermelho em um dos cromossomos marcados confirma a ocorrência de deleção da região 10q22.2 em P4. (C-D) Célula metafásica da mãe de P4 (C) e do pai de P4 (D) evidenciando a presença de 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes, excluindo a possibilidade de deleção da região 10q22.2 nos pais da probanda, confirmando ser esta uma alteração de novo. Imagens obtidas a partir da objetiva de 100x com auxílio do *Software* ISIS.

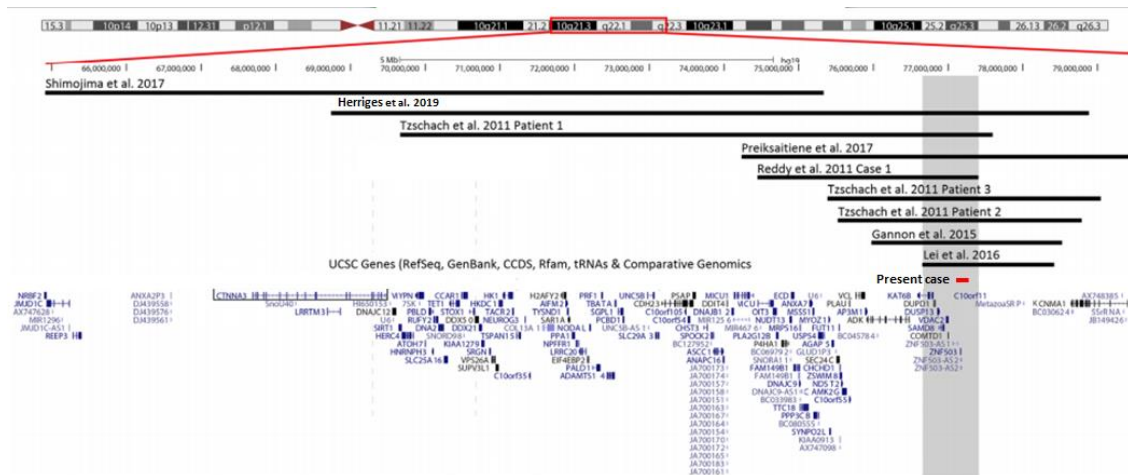


Figura 14: Mapa das deleções envolvendo a banda 10q22.2 descritas na literatura até o momento. A região hachurada em cinza demonstra a menor região de sobreposição entre os rearranjos previamente avaliados por aCGH. Note que a perda diagnosticada em nossa paciente (P4) é a menor já descrita e inclui apenas o gene *C10orf11* (barra vermelha).

A inserção submicroscópica do cromossomo 10 em 2q33.1, mesma região sugerida pelo cariótipo, levou à ocorrência de uma segunda perda de região genômica diagnosticada nesta paciente. Esta perda, também confirmada por FISH, abrange o intervalo de 140 Kb incluindo parte do gene *PLCL1* arr[hg19] 2q33.1(198654736-198794833)x1 (Figura 6). O estudo por FISH também demonstrou que ambas as alterações descritas na paciente 4 eram *de novo*, conforme mostram as Figuras 6 e 13.

A aplicação da técnica de *array*-CGH permitiu a definição do diagnóstico citogenético: 46,XX,t(2;10;12)(q33.1;q22.2;q24.3) e citogenômico:

arr[hg19] 2q33.1(198654736-198794833)x1;10q22.2(77437446-77671331)x1 de P4.

Paciente 6 (P6)

O segundo desequilíbrio genômico considerado crítico para a manifestação fenotípica observada foi diagnosticado na paciente portadora do cariótipo 46,XX,t(3;15)(q29;q15) (Figura 15A), que possuía atraso global de desenvolvimento neuropsicomotor, evoluindo com deficiência intelectual grave e alterações de

comportamento como baixa interação social e agressividade, além de outras dismorfias como frontal amplo, enoftalmia com estrabismo, hipoplasia das falanges distais e prega de hockey stick, conforme mostra a Figura 15 B-C.

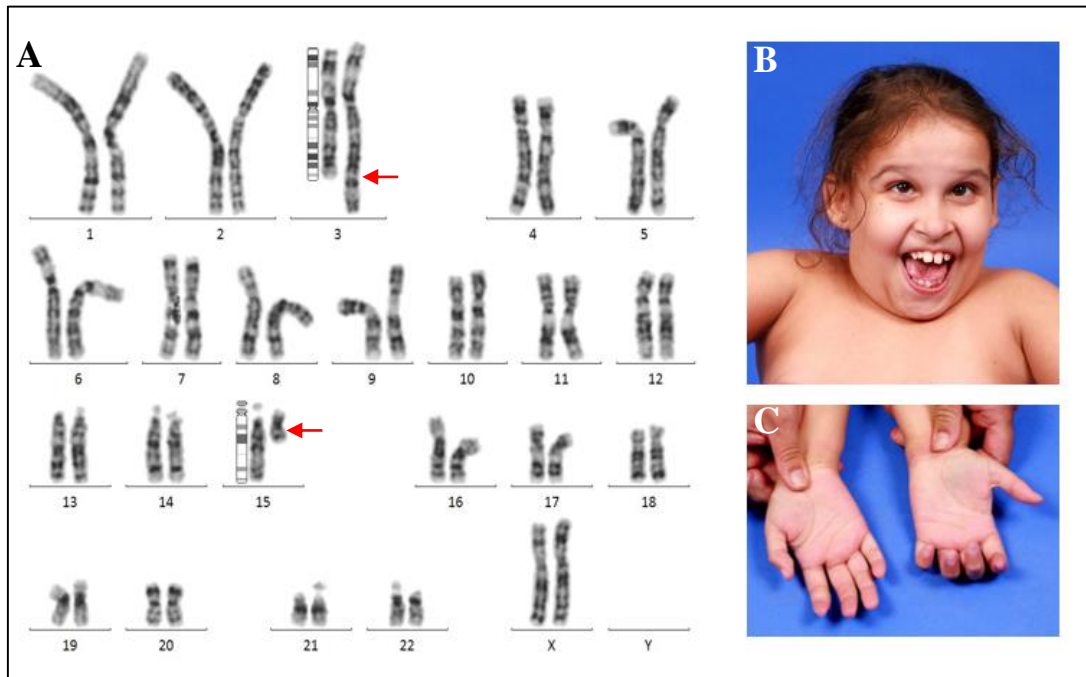


Figura 15: (A) Cariótipo por bandamento GTG da paciente 6 (P6) portadora de translocação aparentemente equilibrada envolvendo os pares cromossômicos 3 e 15 com diagnóstico citogenético 46,XX,t(3;15)(q29;q15). As setas indicam as regiões dos pontos de quebra. Imagem obtida a partir do *software* Ikaros, objetiva de 100x (B-C). Fotos clínicas de P6 mostrando dismorfias craniofaciais em (B) e prega de hockey stick em (C).

A análise por *array*-CGH não revelou nenhuma alteração nas regiões dos pontos de quebra cromossômica (3q;15q), entretanto, uma perda de 1.56 Mb na banda 2q24.2 arr[hg19] 2q24.2(161127069-162691169)x1 incluindo 12 genes (*RBMS1*; *MIR4785*; *LOC100419108*; *LOC100131736*; *TANK*; *PSMD14*; *LOC100506055*; *TBR1*; *AHCTF1P1*; *LOC100132762*; *KRT18P46*; *SLC4A10*) foi diagnosticada (Figura 16 A). Esta alteração confirmada por FISH foi considerada *de novo*, uma vez que a mesma não foi detectada nos pais da paciente, conforme mostra a Figura 16 B-D. Tendo em vista que tal desequilíbrio considerado crítico para o fenótipo da paciente não está relacionado aos

cromossomos envolvidos no rearranjo mostrado a partir da análise do cariótipo, esta alteração foi classificada como um achado incidental.

A interpretação das técnicas utilizadas permitiu a definição dos diagnósticos citogenético: 46,XX,t(3;15)(q29;q15) e citogeômico: arr[hg19] 2q24.2(161127069-162691169)x1 da paciente.

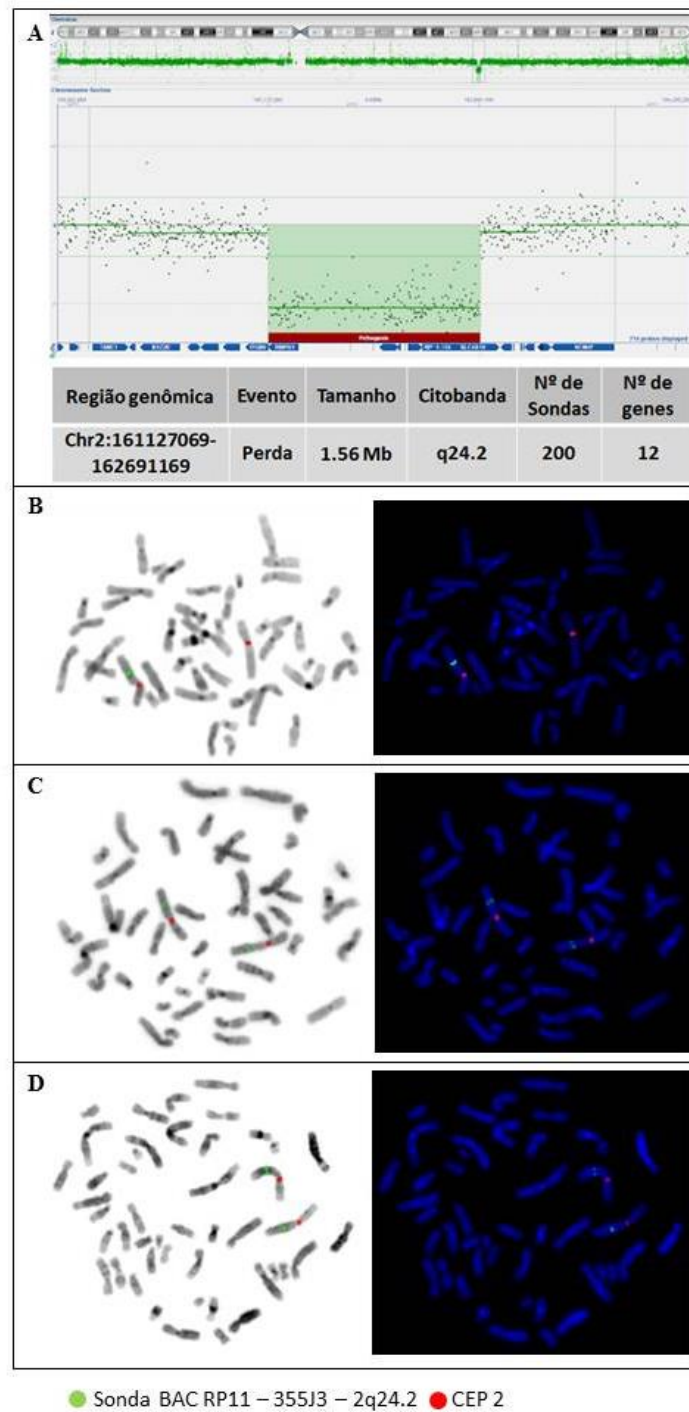


Figura 16: A: Perda diagnosticada em P6 na citobanda 2q24.2 englobando os genes (*RBMS1*; *MIR4785*; *LOC100419108*; *LOC100131736*; *TANK*; *PSMD14*; *LOC100506055*; *TBR1*; *AHCTF1P1*; *LOC100132762*; *KRT18P46*; *SLC4A10*). Imagem obtida a partir do *software* Ogt. (B-D): Validação por FISH da alteração diagnosticada na probanda, mãe e pai respectivamente, utilizando-se sonda BAC RP11-355J3 (sinal verde) em conjunto com a sonda centromérica do cromossomo 2 (Cytocell-LPE002R) (sinal vermelho). Imagens obtidas a partir do *software* Isis, objetiva de 100x.

Discussão

Nos últimos anos, devido ao crescente desenvolvimento das tecnologias para avaliação genômica, tem-se alcançado muito progresso na identificação de genes candidatos para doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento (UTAMI et al., 2014).

Desde a histórica descoberta do gene causador da Distrofia Muscular de Duchene (*DMD*; OMIM: 310200), a partir do mapeamento dos pontos de quebra em mulheres portadoras de translocação X;autossomo (KENWRICK et al., 1987), é inegável que as alterações fenotípicas presentes em portadores de rearranjos cromossômicos equilibrados podem ser causadas pela disrupção de genes sensíveis a dosagem ou pelo efeito de posição (LETTICE et al., 2011). Contudo, a possibilidade de desequilíbrios genômicos, próximos ou distantes às regiões dos pontos de quebra, não deve nunca ser excluída (GREGORY et al., 2007).

Dois grandes estudos realizados com pacientes portadores de atraso de desenvolvimento descreveram a presença de perdas e ou ganhos genômicos possivelmente relacionadas com o fenótipo em 15% dos casos, além de destacarem a presença de desequilíbrios adicionais que coexistiam com síndromes de microdeleção primária em 10%, atuando como um fator aditivo para a manifestação fenotípica mais acentuada (COOPER et al., 2011; GIRIRAJAN et al., 2012).

Gregory e colaboradores (2007) investigaram pacientes portadores de TAE e fenótipo alterado e detectaram perdas genômicas em 40% dos pacientes avaliados, sugerindo que os efeitos fenotípicos sejam mais provavelmente causados pelas deleções, ao invés da interrupção gênica. Assim sendo, recomenda-se a triagem por CNVs com o auxílio de técnicas genômicas como primeiro passo na avaliação de pacientes portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e alterações fenotípicas.

No presente estudo, a avaliação por *array*-CGH revelou desequilíbrios genômicos considerados críticos em 2 dos 12 casos avaliados (16.66%). O primeiro foi

diagnosticado próximo à região rearranjada, enquanto o segundo foi classificado como um achado incidental, oriundo de um cromossomo não previamente relacionado com o rearranjo estrutural.

No primeiro caso (P4), diagnosticado como uma translocação complexa aparentemente equilibrada envolvendo os pares 2, 10 e 12, foi encontrada uma deleção de 233.88 Kb no cromossomo 10, região q22.2, englobando parte do gene *C10orf11*.

De acordo com a literatura, deleções intersticiais envolvendo a banda 10q22 são bastante raras e foram descritas até o momento em apenas 10 casos (COOK et al., 1999; TZSCHACH et al., 2006; 2010; REDDY et al., 2011; GANNON et al., 2015; LEI et al., 2016; PREIKSAITIENE et al., 2017; SHIMOJIMA et al., 2018; HERRIGES et al., 2019). Os pacientes portadores dessa deleção apresentam principalmente, atraso de desenvolvimento e linguagem, deficiência intelectual, baixa estatura, hipotonia e dismorfias craniofaciais como telecanto, hipertelorismo, estrabismo, narinas antevertidas e orelhas baixo implantadas.

Nossa paciente é portadora da menor deleção intersticial envolvendo a banda 10q22.2 até o momento e compartilha vários achados clínicos com os demais pacientes previamente relatados na literatura. Estas alterações de fenótipo incluem: atraso de desenvolvimento evoluindo para deficiência intelectual 10/10; atraso de linguagem 10/10 e alterações de comportamento 2/10, bem como outras anomalias menores como orelhas rodadas posteriormente 3/10 e alterações dentárias 3/10.

Cook e colaboradores (1999) foram os primeiros a descrever um paciente portador da deleção intersticial 10q22-10q22.3, com características fenotípicas como atraso de crescimento e desenvolvimento, hipertelorismo ocular, orelhas rodadas posteriormente, retrognatia e clinodactilia de 5º quirodáctilo. A alteração diagnosticada por bandamento GTG se estendia por toda a banda 10q22 contendo aproximadamente

11.4 Mb. Os outros 9 casos descritos foram caracterizados por *array*-CGH mostrando deleções que variavam em tamanho de 1.77 Mb a 10.4 Mb (LEI et al., 2016; SHIMOJIMA et al., 2018). Apesar da extensa variação de tamanho, todos os pacientes descritos compartilhavam várias das características primeiramente descritas por COOK em 1999.

O caso mais recente de deleção intersticial do cromossomo 10 envolvendo a banda 10q22 foi descrito por HERRIGES e colaboradores (2019), no qual um paciente primeiramente diagnosticado com atraso global de desenvolvimento, hipotonia, baixa estatura e dificuldades com a alimentação apresentava uma perda de 10.2 Mb que se sobrepunha às bandas 10q21.3-22.2 envolvendo 92 genes.

Oito dos 10 casos descritos compartilham uma região de perda de 754Kb se sobrepondo à banda 10q22.2 (Figura 13). Tal região comum inclui 8 genes codificadores de proteínas (*KAT6B*, *DUPD1*, *DUSP13*, *SAMD8*, *VDAC2*, *COMTD1*, *ZNF503* e *C10orf11*), seis dos quais estão descritos no banco de dados OMIM como possíveis causadores de doenças (HERRIGES et al., 2019).

Pouco se sabe sobre a contribuição individual dos genes deletados dentro da região 10q22 para os achados clínicos em humanos. No entanto, estudos realizados em modelo animal mostraram que todos os oito genes deletados dentro dessa região de compartilhamento encontram-se evolutivamente conservados, sugerindo ter papel importante durante o desenvolvimento (REN et al., 2009; DING et al., 2015). A perda do gene *Kat6b* em ratos foi associada com baixo ganho pondero-estatural, malformações craniofaciais, dificuldades com a alimentação, fechamento atrasado das suturas cranianas e desenvolvimento anormal do cérebro (THOMAS et al., 2000; MERSON et al., 2006).

Em humanos, por sua vez, apenas dois desses genes (*KAT6B* e *C10orf11*) já foram associados a alterações de fenótipo. Sabe-se que o gene *KAT6B* é expresso durante todo o período de desenvolvimento do feto. A primeira associação desse gene com

achados clínicos se deu a partir de sua interrupção devido a um rearranjo cromossômico diagnosticado em um paciente com fenótipo sugestivo da síndrome de Noonan (*Noonan syndrome-like phenotype*) apresentando deficiência intelectual, baixa estatura, microcefalia e dismorfias faciais (KRAFT et al., 2011). Mais recentemente, mutações nesse gene foram associadas a fenótipos já descritos na síndrome Genitopatelar (OMIM: 606170) e em uma variante da síndrome de Ohdo conhecida como síndrome de Barber/Biesecker/Young-Simpson (OMIM: 603736) (CAMPEAU et al., 2012; GANNON et al., 2015; VLCKOVA et al., 2015).

A perda do gene *C10orf11*, por sua vez, já foi relacionada com o atraso de desenvolvimento em pacientes com a deleção 10q22. Tal proposta foi baseada na menor região de sobreposição entre os três pacientes primeiramente descritos. Além disso, o relato de um paciente com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual grave e cariótipo 46,XY,t(10;13)(q22.3;p13) com interrupção do gene *C10orf11*, sugeriu que a haploinsuficiência desse gene contribuía para as alterações cognitivas diagnosticadas em pacientes com a deleção 10q22 (TZSCHACH et al., 2010).

O gene *C10orf11* foi pela primeira vez correlacionado com alterações cognitivas a partir dessa publicação de Tzschach e colaboradores em 2010 e desde então, apresenta-se como um potencial candidato para alterações como atraso de desenvolvimento e da fala, além de deficiência intelectual (LEI et al., 2016). Mutações nesse gene foram também associadas ao albinismo (OMIM: 614537) (GRONSKOV et al., 2013). Quando portadores desta condição, os pacientes apresentam principalmente, pele clara, nistagmo, transiluminação da íris, fotofobia e cabelos claros.

Vale frisar, que apesar da variabilidade fenotípica resultante das particularidades de cada caso, como diferentes tamanhos e conteúdo gênico, 9 dos 10 pacientes já descritos com alterações cognitivas e deleção da região 10q22, incluem a perda de *C10orf11*

(COOK et al., 1999; TZSCHACH et al., 2006; 2010; REDDY et al., 2011; GANNON et al., 2015; LEI et al., 2016; PREIKSAITIENE et al., 2017; HERRIGES et al., 2019). Ressaltamos que a deleção detectada em nossa paciente é a menor já descrita na literatura e inclui apenas o gene *C10orf11*, fato que corrobora com as especulações sobre o envolvimento desse gene e as alterações cognitivas presentes em pacientes portadores da deleção 10q22. Estudos adicionais incluindo análises funcionais desse gene são necessários para maiores esclarecimentos.

A análise por *array*-CGH da paciente 4 também revelou uma perda de 140 Kb diagnosticada em 2q33.1, mesma banda onde foi sugerido o ponto de quebra diagnosticado pelo cariótipo devido à inserção submicroscópica da região 10q23.31. Esta segunda alteração encontrada em P4 inclui parte do gene *PLCLI*. Embora a literatura ainda seja escassa com relação a este gene, sabemos que ele é predominantemente expresso no cérebro atuando como um regulador dos receptores GABA, contribuindo para a manutenção da inibição sináptica. Por esta razão este gene tem sido associado à algumas doenças como epilepsia e câncer, tanto em modelos animais como em humanos (LIU et al., 2008; ZHU et al., 2012).

Em um estudo de associação fenotípica (PheWAS) envolvendo 5049 pacientes, Namjou e colaboradores (2014) sugeriram alta relação entre o gene *PLCLI* e achados descritos na paciente 4 de nossa amostra, como por exemplo atraso de desenvolvimento e da fala. Contudo, não encontramos na literatura estudos relacionando essa deleção ou até mesmo outros mecanismos que pudessem levar à perda de função desse gene com alterações de quadro clínico.

Rearranjos cromossômicos complexos constitucionais (RCC) como o aqui descrito são raros, com aproximadamente 250 casos descritos até o momento (ARISTIDOU et al., 2018). Estes caracterizam-se pelo envolvimento de pelo menos dois

cromossomos e no mínimo três pontos de quebra (PAI et al., 1980). Sendo que um único cromossomo ainda pode apresentar mais de uma aberração, como por exemplo, uma inversão e uma translocação (GARDNER & SUTHERLAND 2004).

O fenótipo de portadores de RCC varia de normal a anormal, dependendo se tal rearranjo causou disrupção de genes importantes, ou ainda, ganho ou perda de material genético. De acordo com a literatura, 20 a 25% dos casos de RCC ocorrem em pacientes com alterações congênicas e/ou deficiência intelectual, sendo que a probabilidade de um fenótipo anormal ocorrer aumenta com o número de pontos de quebra associados a RCCs, tanto *de novo* quanto herdados (PELLESTOR et al., 2011). O risco estimado de abortamento para casais portadores de RCC é de 53.7% (GORSKI et al., 1988).

Os rearranjos cromossômicos complexos são classificados dentro de 4 grupos (I-IV) de acordo com o número de cromossomos e ou quebras envolvidas (MADAN, 2012). A alteração descrita em nossa paciente foi considerada do tipo IV, uma vez que o número de quebras é maior do que o número de cromossomos envolvidos e um dos cromossomos apresenta um seguimento intermediário entre outros dois fragmentos provenientes de cromossomos diferentes, ou seja, pelo menos um cromossomo derivativo é formado a partir de 3 cromossomos distintos (Figura 17).

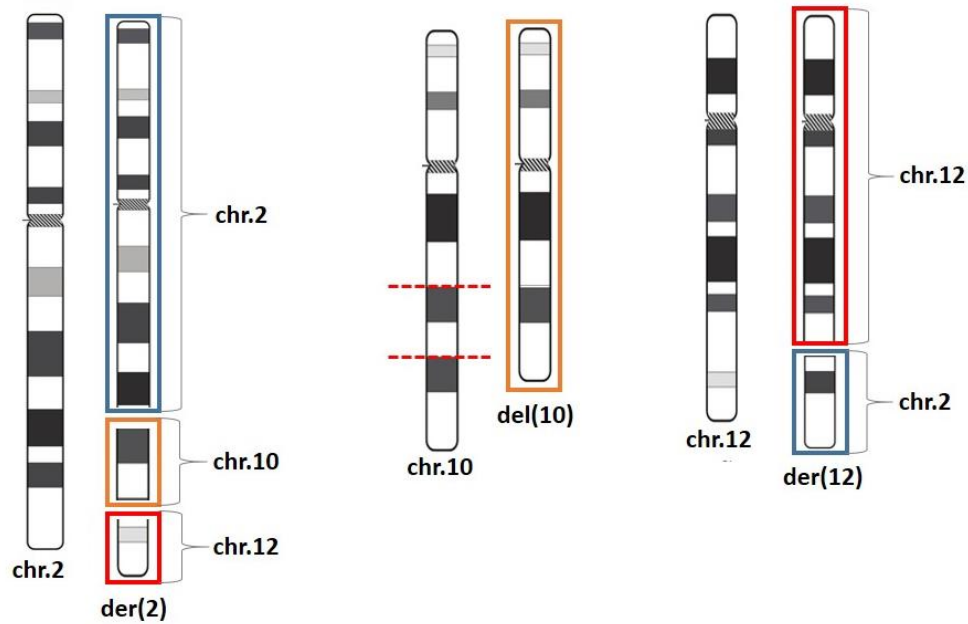


Figura 17: Ideogramas mostrando os cromossomos envolvidos no rearranjo complexo diagnosticado em P4. Estão representados os cromossomos normais e derivativos 2 (Azul), 10 (laranja) e 12 (vermelho) (sem escala). As linhas pontilhadas no cromossomo 10 indicam a deleção intersticial em 10 incluindo o gene *PTEN* (10q23.31) (Adaptado de ISCN 2016). Devido a presença de um segmento intermediário, localizado entre fragmentos de dois outros cromossomos diferentes, como representado no cromossomo derivativo 2 o rearranjo complexo foi classificado como de tipo IV.

Acreditamos que a presença de LCRs também conhecidas como duplicações segmentares (do inglês *segmental duplications*) localizadas próximas ao gene *PTEN* (10q23.3) (YOSHIMOTO et al., 2012) tenham tornado essa região mais susceptível a ocorrência de rearranjos cromossômicos e portanto, contribuído para a instabilidade genômica diagnosticada em nossa paciente. Além disso, não descartamos a possibilidade do efeito de posição envolvendo o gene *PTEN* ter também influenciado seu fenótipo. Embora inicialmente descrito como um gene supressor tumoral, vários estudos vêm destacando a importância de *PTEN* durante o desenvolvimento do cérebro, mostrando também a sua importância em várias doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento (WORBY & DIXON, 2014; KURATA et al., 2018; SHIOHAMA et al., 2018).

A segunda paciente (P6) em que a avaliação citogenômica detectou desequilíbrio crítico para o fenótipo, foi primeiramente diagnosticada como portadora de TAE, sendo

descrito o cariótipo 46,XX,t(3;15)(q29;q15). A investigação por *array*-CGH não revelou nenhuma alteração próxima aos pontos de quebra, sugerindo ser um rearranjo equilibrado. No entanto, detectamos uma perda de 1.56 Mb no cromossomo 2, região q24.2, inicialmente não relacionada com o rearranjo e portanto, classificada como um achado incidental. A região deletada inclui 12 genes (*RBMS1*; *MIR4785*; *LOC100419108*; *LOC100131736*; *TANK*; *PSMD14*; *LOC100506055*; *TBR1*; *AHCTF1P1*; *LOC100132762*; *KRT18P46*; *SLC4A10*) dos quais dois, *PSMD14* e *TBR1* podem ser relevantes para os achados clínicos da paciente.

Deleções intersticiais envolvendo a banda 2q24.2 são consideradas raras, sendo descritas até o momento em apenas 18 casos (ONO et al., 2017; KAROGLAN et al., 2019). Os achados clínicos que acometem tal alteração são variáveis, incluindo deficiência intelectual, alterações de comportamento, baixa estatura, microcefalia entre outras dismorfias (KREPISCHI et al., 2010; MAGRI et al., 2011; TRAYLOR et al., 2012; PALUMBO et al., 2014; KAROGLAN et al., 2019).

Chen e colaboradores (2010) foram os primeiros a sugerir que deleções envolvendo a banda 2q24.2 pudessem estar relacionadas com a deficiência intelectual, e desde então vários outros casos foram relatados. Devido à variação de tamanho e diferentes localizações dessas deleções, é difícil estabelecer um único gene ou um conjunto de genes que possam ser responsáveis pelo fenótipo característico observado em pacientes com deleção em 2q24.2.

Ao descrever uma perda de 422 Kb incluindo apenas os genes *TANK*, *PSMD14* e *TBR1*, Burrage e colaboradores (2013) sugeriram que a ocorrência de achados comuns em pacientes diagnosticados com esta deleção, como atraso de desenvolvimento, deficiência intelectual e baixa estatura pudessem estar diretamente relacionados à haploinsuficiência desses 3 genes. Os autores enfatizaram ainda, que o candidato mais

plausível para a deficiência intelectual seria o gene *TBR1* seguido por *PSMD14* e por último *TANK*. Esta hipótese foi mais tarde corroborada por Palumbo e colaboradores (2014) ao descreverem um paciente com deficiência intelectual, atraso de crescimento e algumas dismorfias, relacionadas à deleção exclusiva do gene *TBR1*.

O gene *TBR1* (OMIM: 604616) é membro de uma família de genes conservados que exercem importante função na corticogênese (BEDOGNI et al., 2010a). É também conhecido por compor vias que desempenham papel relevante para o desenvolvimento e migração neuronal (*PAX6-TBR2-NEUROD-TBR1*; *CASK-TBR1-RELN*) (HEVNER et al., 2006; MENDEZ-GOMEZ et al., 2011). Mutações nesse gene em humanos já foram associadas com alterações cerebrais ocorridas durante o desenvolvimento embrionário (MITCHELL et al., 2003), bem como com doenças relacionadas ao impedimento da migração neuronal (HONG et al., 2000).

TBR1 também já foi sugerido como gene candidato para autismo, uma vez que o nocaute desse gene em camundongos não apenas confirmou sua importância durante os primeiros estágios de desenvolvimento do córtex, mas também levou a alterações de comportamento que se assemelhavam aos encontrados em pacientes com TEA, como baixa interação social e redução da vocalização (BEDOGNI et al., 2010b; NAGAMANI et al., 2013; LEE et al., 2015). A hipótese de que alterações no gene *TBR1* pudessem ter um papel relevante em pacientes com autismo se fortaleceu ainda mais a partir do estudo publicado por Notwell e colaboradores (2016). Após realizar uma série de análises funcionais, os autores concluíram que vários dos genes já correlacionados com TEA, incluindo *AUTS2*, são regulados por *TBR1* durante o desenvolvimento do neocórtex.

O entrelaçamento de tais evidências, tanto funcionais quanto clínicas e moleculares, confirmam o papel de *TBR1* no desenvolvimento neurológico humano.

Sendo assim, é possível correlacionar a haploinsuficiência desse gene com o fenótipo de deficiência intelectual em pacientes portadores de deleção envolvendo a banda 2q24.2.

O gene *PSMD14* (OMIM: 607173) já foi considerado como um possível candidato para o fenótipo de baixa estatura em portadores de tal deleção, visto que em linhagens celulares de carcinoma e até mesmo em tecidos não tumorais, o silenciamento desse gene resultou em aumento da senescência e parada do ciclo celular (BYRNE et al., 2010). Com base nesses dados de comprometimento da mitose foi sugerido um vínculo entre a haploinsuficiência de *PSMD14* e os defeitos de crescimento observados em alguns pacientes com a deleção 2q24.2 (BURRAGE et al., 2013; YOKOYAMA et al., 2014).

Este mesmo gene também foi proposto como um possível candidato para deficiência intelectual em pacientes com perda dessa região, uma vez que quando silenciado em linhagens de células nervosas, culminou em apoptose de neurônios pós-mitóticos (STAROPOLI & ABELIOVICH, 2005). Este fato levou alguns autores a sugerirem uma possível relação entre *PSMD14* e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (GALLERY et al., 2007; PUTHIYEDTH et al., 2016).

Em relação à perda de 1.32 Mb sobrepondo-se a região 3q13.12-q13.13, diagnosticada no paciente 8 (Tabela 3), optamos por não classificá-la como um achado crítico, uma vez que não foi estabelecida uma relação direta entre a função até então conhecida para os genes situados dentro da região de perda e o fenótipo do paciente. Sabe-se, entretanto, que deleções intersticiais envolvendo a região proximal do braço longo do cromossomo 3 são bastante raras, descritas até o momento em poucos pacientes. O banco de dados DECIPHER mostra 18 casos em que a região de perda se sobrepõe à do nosso paciente, variando em tamanho de 504 Kb a 24.13 Mb. Catorze delas foram classificadas como variantes de significado incerto.

De acordo com a literatura, deleções diagnosticadas na banda 3q13.31 e, portanto, próximas à que nós descrevemos, podem predispor a fenótipos como atraso de desenvolvimento e deficiência intelectual, atraso de linguagem, autismo e até mesmo transtornos de déficit de atenção e hiperatividade (MOLIN et al., 2012; VUILLAUME et al., 2013; LOWTHER et al., 2014). Dessa forma, não descartamos a possibilidade de que a deleção diagnosticada em nosso paciente possa ter contribuído para o fenótipo por meio de outros mecanismos moleculares como, por exemplo, o efeito de posição.

No que diz respeito à detecção de CNVs, vários outros estudos já encontraram alterações nem sempre próximas às regiões dos pontos de quebra, consideradas críticas para o fenótipo dos pacientes (HIGGINS et al., 2008; TABET et al., 2015; MANDAL et al., 2016; ARISTIDOU et al.; 2017). Segundo Higgins e colaboradores (2008) é possível que tais desequilíbrios diagnosticados em cromossomos não relacionados com o rearranjo, como o observado na paciente 6, não tenham realmente nenhuma relação com a alteração cromossômica em questão, ou reflitam mecanismos mais complexos de instabilidade genômica, podendo promover tanto efeitos intercromossômicos quanto deleções intracromossômicas. Enquanto que as CNVs detectadas dentro ou próximas às regiões rearranjadas, como a que demonstramos nos pacientes 4 e 8 deste estudo, podem ocorrer durante a formação dos rearranjos cromossômicos ou, ainda, ser reflexo da diferença de resolução entre as técnicas utilizadas.

De acordo com a análise realizada a partir do banco de dados DGV, todos os demais desequilíbrios genômicos diagnosticados nos pacientes avaliados, se sobrepõem a regiões de CNVs não patogênicas e, portanto, consideradas variantes da normalidade.

Considerações

Finais

Vale ressaltar que embora os métodos empregados neste estudo apresentem alta resolução genômica, eles não são capazes de caracterizar alterações a nível molecular, e podem falhar na identificação de desequilíbrios que incluam poucos pares de bases (CHEN et al., 2010; LE SCOUARNEC & GRIBLE, 2012). Diante de tal limitação, não descartamos a possibilidade de que alterações menores do que as que fomos capazes de identificar ou até mesmo neutras estejam de alguma maneira influenciando o fenótipo observado nos pacientes que tiveram a avaliação genômica por *array*-CGH considerada normal.

Assim como o nosso, outros trabalhos que buscaram mapear os pontos de quebra em rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados a fenótipos alterados, também não encontraram desequilíbrios considerados críticos a partir da avaliação prévia por métodos citogenômicos. Contudo, o emprego de técnicas com resolução em nível de pares de base foi capaz de evidenciar alterações na estrutura de genes possivelmente relacionados com o fenótipo descrito em cada caso (SCHUTH-BOLARD et al., 2012; UTAMI et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2015; ARISTIDOU et al., 2017). Deste modo, o sequenciamento de nova geração (NGS) tem se tornado um importante aliado no mapeamento das variações genômicas estruturais. Por ser capaz de identificar mesmo alterações neutras com inigualável resolução, o NGS é considerado hoje, um grande facilitador na identificação dos mecanismos e genes candidatos ao desenvolvimento de doenças genômicas (SCHLUTH-BOLARD et al., 2012; SUZUKI et al., 2014; UTAMI et al., 2014).

Um recente trabalho publicado por Schluth-Bolard e colaboradores (2019) demonstrou que 89% dos pacientes avaliados eram portadores de variações estruturais críticas, não detectáveis por *array*-CGH. A partir da utilização da técnica de NGS os autores foram capazes de evidenciar, ainda, que o nível de complexidade dos rearranjos

era muito maior que o esperado, aumentando o número dos pontos de quebra detectados em 83.2%. Um outro estudo realizado em larga escala, também utilizando plataformas de NGS mostrou que em 93% dos casos a quebra cromossômica ocorreu em localizações diferentes das diagnosticadas pelo cariótipo, variando em pelo menos uma sub-banda (REDIN et al., 2017).

Diante de tais achados, reforça-se a necessidade do emprego de técnicas com resolução molecular na investigação de pacientes portadores de TAE e anormalidades fenotípicas.

Dentro deste contexto, tem se dedicado muito esforço no aprimoramento de técnicas que possam combinar alta resolução e baixo custo, a fim de implementá-las como o primeiro teste a ser empregado no rastreamento de alterações genômicas em pacientes portadores de deficiência intelectual e ou alterações congênitas, bem como aqueles portadores de doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento (DONG, et al., 2018; SCHUTH-BOLARD et al., 2019).

Um estudo utilizando uma nova ferramenta analítica foi capaz de identificar oito portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados (4 translocações e 4 inversões) em amostras que compõe o projeto 1000 genomas, que não haviam passado por uma análise citogenética prévia (<http://www.internationalgenome.org/data/>). Segundo os autores do estudo, tais resultados demonstram mais um passo dado para o emprego em larga escala da técnica de sequenciamento em pacientes portadores de alterações fenotípicas (DONG et al., 2017).

Conclusões

- ❖ A investigação citogenômica realizada por técnica de *array*-CGH permitiu a detecção de perdas genômicas em dois pacientes com diagnóstico citogenético de translocação cromossômica equilibrada, estabelecendo assim o diagnóstico definitivo e o aconselhamento genético para esses pacientes.

- ❖ A avaliação por *array*-CGH demonstrou que dez dos doze pacientes avaliados eram portadores de translocações realmente equilibradas, uma vez que não foram diagnosticados desequilíbrios genômicos nas regiões dos pontos de quebra cromossômica.

- ❖ A análise por *array*-CGH permitiu a identificação de CNVs possivelmente relacionadas com o fenótipo em dois dos doze pacientes avaliados, totalizando 16,66% do número amostral.

- ❖ A alteração genômica caracterizada como perda de 233.88 Kb na região 10q22.2 e envolvendo o gene *C10orf11*, foi correlacionada com alterações cognitivas.

- ❖ A perda genômica de 1,5Mb, correspondente à banda 2q24.2, envolvendo os genes *PSMD14* e *TBR1*, foi correlacionada com o fenótipo de baixa estatura e deficiência intelectual, respectivamente.

Referências

AHN, J. W.; BINT, S.; BERGBAUM, A.; MANN, K.; HALL, R. P.; OGILVIE, C. M. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals – results from four years' clinical application for over 8,700 patients. **Molecular Cytogenetics**, vol.6, p.1-6, 2013.

ARISTIDOU, C.; KOUFARIS, C.; THEODOSIOU, A.; BAK, M.; MEHRJOUY, M. M.; BEHJATI, F.; TANTELES, G.; CHRISTOPHIDOU-ANASTASIADOU, V.; TOMMERUP, N.; SISMANI, C. Accurate Breakpoint Mapping in Apparently Balanced Translocation Families with Discordant Phenotypes Using Whole Genome Mate-Pair Sequencing. **PLoS ONE** vol.12, p.1-18, 2017.

ARISTIDOU, C.; THEODOSIOU, A.; KETONI, A.; BAK, M.; MEHRJOUY, M. M.; TOMMERUP, N.; SISMANI, C. Cryptic breakpoint identified by wholegenome mate-pair sequencing in a rare paternally inherited complex chromosomal rearrangement. **Molecular Cytogenetics**, vol.11 p. 1-8, 2018.

BAPTISTA, J.; MERCER, C.; PRIGMORE, E.; GRIBBLE, S. M.; CARTER, N. P.; MALONEY, V.; THOMAS, M. S.; JACOBS, P. A.; CROLLA, J. A. Breakpoint Mapping and Array CGH in Translocations: Comparison of a Phenotypically Normal and an Abnormal Cohort. **American Journal of Human Genetics**, vol.82, p. 927-936, 2008.

BAPTISTA, J.; PRIGMORE, E.; GRIBBLE, S.; JACOBS, P.; CARTER, N.; CROLLA, J. Molecular cytogenetic analyses of breakpoints in apparently balanced reciprocal translocation carried by phenotypically normal individuals. **European Journal of Human Genetics**, vol.13, p.1205-1212, 2005.

BAYANI, J.; SQUIRE, J. A. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). **Current Protocols in Cell Biology**, 2004.

BEDOGNI, F.; HODGE, R. D.; ELSEIN, G. E.; NELSON, B. R.; DAZA, R. A.; BEYER, R. P.; BAMMLER, T. K.; RUBENSTEIN, J. L.; HEVNER, R. F. Tbr1 regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol.107, p.13129–13134, 2010a.

BEDOGNI, F.; HODGE, R. D.; NELSON, B. R.; FREDERICK, E. A.; SHIBA, N.; DAZA, R. A.; HEVNER, R. F. Autism susceptibility candidate 2 (Aut2) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. **Gene Expression Patterns**, vol.10, p.9-15, 2010b.

BICKMORE, W. A.; TEAGUE, P. Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. **Chromosome Res**, vol.10, p.707-715, 2002.

BOYLE, S.; GILCHRIST, S.; BRIDGER, J. M.; MAHY, N. L.; ELLIS, J. A.; BICKMORE, W. A. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. **Hum. Mol. Genet.** vol.10, p.211–219, 2001.

BYRNE, A.; MCLAREN, R. P.; MASON, P.; CHAI, L.; DUFAULT, M. R.; HUANG, Y.; LIANG, B.; GANS, J. D.; ZHANG, M.; CARTER, K.; GLADYSHEVA, T. B.; TEICHER, B. A.; BIEMANN, H. P.; BOOKER, M.; GOLDBERG, M. A.; KLINGER, K. W.; LILLIE, J.; MADDEN, S. L.; JIANG, Y. Knockdown of human deubiquitinase PSMD14 induces cell cycle arrest and senescence. **Experimental Cell Research**, vol.316, p.258–271, 2010.

BUHLER, E. M. Unmasking of heterozygosity by inherited balanced translocations. Implications for prenatal diagnosis and gene mapping. **Annual Review of Genetics**, vol.26, p.133-137, 1983.

BURNSIDE, R. D.; HARRIS, A.; SPEYER, D.; SCOTT-BURGIN, W.; ROSE, D. Z.; SANCHEZ-VALLE, A. Constitutional Chromoanagenesis of Distal 13q in a Young Adult with Recurrent Strokes. **Cytogenetic and Genome Research**, vol.150, p.46-51, 2016.

BURRAGE, L. C.; EBLE, T. N.; HIXSON, P. M.; RONEY, E. K.; CHEUNG, S. W.; FRANCO, L. M. A mosaic 2q24.2 deletion narrows the critical region to a 0.4Mb interval that includes TBR1, TANK, and PSMD14. **American Journal of Medical Genetics Part A**, vol.161A, p.841–844, 2013.

CAI, J.; GOODMAN, B. K.; PATEL, A. S.; MULLIKEN, J. B.; VAN MALDERGEM, L.; HOGANSON, G. E.; PAZNEKAS, W. A.; BEN-NERIAH, Z.; SHEFFER, R.; CUNNINGHAM, M. L. Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. **Journal of Human Genetics**, vol.114, p.68–76, 2003.

CALOUNOVA, G.; NOVOTNA, D.; SIMANDLOVA, M.; HAVLOVICOVA, M.; ZUMROVA, A.; KOCAREK, E.; SEDLACEK, K. Prader-Willi syndrome due to uniparental disomy in a patient with a balanced chromosomal translocation. **Neuroendocrinology Letter**, vol.27, p.579-585, 2006.

CAMPEAU, P. M.; LU, J. T.; DAWSON, B. C.; FOKKEMA, I. F.; ROBERTSON, S. P.; GIBBS, R. A. The KAT6B-related disorders genitopatellar syndrome and Ohdo/SBBYS syndrome have distinct clinical features reflecting distinct molecular mechanisms. **Human Mutation**, vol.33 p.1520-1525, 2012.

CHEN, W.; ULLMANN, R.; LANGNICK C.; MENZEL, C.; WOTSCHOFSKY, Z.; HU, H.; DO`RING, A.; HU, Y.; KANG, H.; TZSCHACH, A.; HOELTZENBEIN, M.; NEITZEL, H.; MARKUS, S.; WIEDERSBERG, E.; KISTNER, G.; RAVENSWAAL-ARTS, C.; KLEEFSTRA, T.; KALSCHEUER, V.; HANS-HILGER R. Breakpoint analysis of balanced chromosome rearrangements by next generation paired-end sequencing. **European Journal of Human Genetics**, vol.18, p.539–543, 2010.

CLANCY, S.; SHAW, K. DNA deletion and duplication and the associated genetic disorders. **Nature Education**, vol.1, 2008.

COOK, L.; WEAVER, D. D.; HARTSFIELD, J. J.; VANCE, G. H. De novo 10q22 interstitial deletion. **Journal of Medical Genetics**, vol.36, p.71–72, 1999.

COOPER, G. M.; COE, B. P.; GIRIRAJAN, S.; ROSENFELD, J. A.; VU, T. H.; BAKER, C.; WILLIAMS, C.; STALKER, H.; HAMID R.; HANNIG, V.; ABDEL-HAMID, H. BADER, P.; MCCRACKEN, E.; NIYAZOV, D.; LEPPIG, K.; THIESE, H.; HUMMEL, M.; ALEXANDER, N.; GORSKI, J.; KUSSMANN, J.; SHASHI, V.; JOHNSON, K.; REHDER, C.; BALLIF, B. C.; SHAFFER, L. G.; EICHLER, E. E. A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay. **Nature Genetics**, vol.43, p838–846, 2012.

DARAI-RAMQVIST, E.; SANDLUND, A.; MÜLLER, S.; KLEIN, G.; IMREH, S.; KOST-ALIMOVA, M. Segmental duplications and evolutionary plasticity at tumor chromosome break-prone regions. **Genome Research**, vol.18 p.370-379, 2008.

DE PAGTER, M. S.; VAN ROOSMALEN, M. J.; BAAS, A. F.; RENKENS, I.; DURAN, K. J.; VAN BINSBERGEN, E.; TAVAKOLI-YARAKI, M.; HOCHSTENBACH, R.; VAN DER VEKEN, L. T.; CUPPEN, E.; KLOOSTERMAN, W. P. Chromothripsis in healthy individuals affects multiple protein-coding genes and can result in severe congenital abnormalities in offspring. **American Journal of Human Genetics**, vol.96 p.651-656, 2015.

DING, T.; KABIR, I.; LI, Y.; LOU, C.; YAZDANYAR, A.; XU, J.; DONG, J.; ZHOU, H.; PARK, T.; BOUTJDIR, M.; LI, Z.; JIANG, X. C. All members in the sphingomyelin synthase gene family have ceramide phosphoethanolamine synthase activity. *Journal of Lipid Research*, vol.56 p. 537-545, 2015.

DONG, Z.; YE, L.; YANG, Z.; CHEN, H.; YUAN, J.; WANG, H.; GUO, X.; LI, Y.; WANG, J.; CHEN, F.; CHEUNG, S. W.; MORTON, C. C.; JIANG, H.; CHOY, K. W. Balanced chromosomal rearrangement detection by low-pass whole-genome sequencing. **Current Protocols in Human Genetics**, vol.96, p.1-16, 2018.

DONG, Z.; WANG, H.; CHEN, H.; JIANG, H.; YUAN, J.; YANG, Z.; WANG, W. J.; XU, F.; GUO, X.; CAO, Y.; ZHU, Z.; GENG, C.; CHEUNG, W. C.; KWOK, Y. K.; YANG, H.; LEUNG, T. Y.; MORTON, C. C.; CHEUNG, S. W.; CHOY, K. W. Identification of balanced chromosomal rearrangements previously unknown among participants in the 1000 Genomes Project: implications for interpretation of structural variation in genomes and the future of clinical cytogenetics. **Genetics in Medicine**, vol.00, p1-11, 2017.

DUPONT, J. M.; CUISSET, L.; CARTIGNY, M.; LE TESSIER, D.; VASSEUR, C.; RABINEAU, D.; JEANPIERRE, M. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. **American Journal of Medical Genetics**, vol. 111, p.405-408, 2002.

FERGUSON-SMITH, M. A.; History and evolution of cytogenetics. **Molecular Cytogenetics**, vol.8, p.1-8, 2015.

FONSECA, A. C. S.; BONALDI, A.; BERTOLA, D. R.; KIM, C. A.; OTTO, P. A.; VIANNA-MORGANTE, A. M. The clinical impact of chromosomal rearrangements with breakpoints upstream of the SOX9 gene: two novel de novo balanced translocations associated with acampomelic campomelic dysplasia. **Biological Medical Genetics**, vol.14, p.2-10, 2013.

FUKAMI, M.; SHIMA, H.; SUZUKI, E.; OGATA, T.; MATSUBARA, K.; KAMIMAKI, T. Catastrophic cellular events leading to complex chromosomal rearrangements in the germline. **Clinical Genetics**, vol.91, p.653-660, 2017.

GALLERY, M.; BLANK, J. L.; LIN, Y.; GUTIERREZ, J. A.; PULIDO, J. C.; RAPPOLI, D.; BADOLA, S.; ROLFE, M.; MACBETH, K. J. The JAMM motif of human deubiquitinase Poh1 is essential for cell viability. **Molecular Cancer Therapeutics**, vol.6, p.262-268, 2007.

GANNON, T.; PERVEEN, R.; SCHLECHT, H.; RAMSDEN, S.; ANDERSON, B.; KERR, B.; DAY, R.; BANKA, S.; SURI, M.; BERLAND, S.; GABBETT, M.; MA, A.; LYONNET, S.; CORMIER-DAIRE, V.; YILMAZ, R.; BORCK, G.; WIECZOREK, D.; ANDERLID, B. M.; SMITHSON, S.; VOGT, J.; MOORE-BARTON, H.; SIMSEK-KIPER, P. O.; MAYSTADT, I.; DESTREE, A.; BUCHER, J.; ANGLE, B.; MOHAMMED, S.; WAKELING, E.; PRICE, S.; SINGER, A.; SZNAJER, Y.; TOUTAIN, A.; HAYE, D.; NEWBURY-ECOB, R.; FRADIN, M.; MCGAUGHRAN, J.; TUYSUZ, B.; TEIN, M.; BOUMAN, K.; DABIR, T.; VAN DEN ENDE, J.; LUK, H. M.; PILZ, D. T.; EASON, J.; DAVIES, S.; REARDON, W.; GARAVELLI, L.; ZUFFARDI, O.; DEVRIENDT, K.; ARMSTRONG, R.; JOHNSON, D.; DOCO-FENZY, M.; BIJLSMA, E.; UNGER, S.; VEENSTRA-KNOL, H. E.; KOHLHASE, J.; LO, I. F.; SMITH, J.; CLAYTON-SMITH, J. Further delineation of the KAT6B molecular and phenotypic spectrum. **European Journal of Human Genetics**, vol.23 p.1165-1170, 2015.

GAO, J.; LIU, C.; YAO, F.; HAO, N.; ZHOU, J.; ZHOU, Q.; ZHANG, L.; LIU, X.; BIAN, X.; LIU, J. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. **Molecular Cytogenetics**, vol.5, p.33, 2012.

GARDNER, R. J. M. AND SUTHERLAND, G. R. Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling, Oxford University Press, **Oxford,UK**, 2004.

GIRIRAJAN, S. ROSENFELD, J. A.; COE, B. P.; PARIKH, S.; FRIEDMAN, N.; GOLDSTEIN, A.; FILIPINK, R. A.; MCCONNELL, J. S.; ANGLE, B.; MESCHINO, W. S.; NEZARATI, M. M.; ASAMOAH, A.; JACKSON, K. E.; GOWANS, G. C.; MARTIN, J. A.; CARMANY, E. P.; STOCKTON, D. W. SCHNUR, R. E.; PENNEY, L. S.; MARTIN, D. M.; RASKIN, S.; LEPPIG, K.; THIESE, H.; SMITH, R.; ABERG, E.; NIYAZOV, D. M.; ESCOBAR, L. F.; EL-KHECHEN, D.; JOHNSON, K. D.; LEBEL, R. R.; SIEFKAS, K.; BALL, S.; SHUR, N.; MCGUIRE, M.; BRASINGTON, C. K.; SPENCE, J. E.; MARTIN, L. S.; CLERICUZIO, C.; BALLIF, B. C.; SHAFFER, L. G.; EICHLER, E. E. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. **New England Journal of Medicine**, vol.367, p. 1321-1331, 2012.

GORSKI, J. L.; KISTENMACHER, M. L.; PUNNETT, H. H.; ZACKAI, E. H.; EMANUEL, B. S.; OPTIZ, J. M. Reproductive risks for carriers of complex chromosome rearrangements: analysis of 25 families. **American Journal of Medical Genetics**, vol.29 p.247-261, 1988.

GOUAS, L. ; GOUMY, C.; VÉRONÈSE, A.; TCHIRKOV, A.; VAGO, P. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. **Pathologie Biologie**, vol.56, p.345-353, 2008.

GREGORY, M.; CICCONE, R.; MAGINI, P.; PRAMPARO, T.; GIMELLI, S.; MESSA, J.; NOVARA, F.; VETRO, A.; ROSSI, E.; MARASCHIO, P.; BONAGLIA, M. C.; ANICHINI, C.; FERRERO, G.

B.; SILENGO, M.; FAZZI, E.; ZATTERALE, A.; FISCHETTO, R.; PREVIDERÉ, C.; BELLI, S.; TURCI, A.; CALABRESE, G.; BERNARDI, F.; MENEGHELLI, E.; RIEGEL, M.; ROCCHI, M.; GUERNERI, S.; LALATTA, F.; ZELANTE, L.; ROMANO, C.; FICHERA, M.; MATTINA, T.; ARRIGO, G.; ZOLLINO, M.; GIGLIO, S.; LONARDO, F.; BONFANTE, A.; FERLINI, A.; CIFUENTES, F.; VAN ESCH, H.; BACKX, L.; SCHINZEL, A.; VERMEESCH, J. R.; ZUFFARDI, O. Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: A study of 59 patients. **Journal of Medical Genetics**, vol.44, p.750–762, 2007.

GRZESIUK, J. D.; PEREIRA, C. S.; GRANGEIRO, C. H.; PICANÇO-ALBUQUERQUE, C. G.; OLIVEIRA-GENNARO, F. G.; MACHADO, F. B.; COSTA, E. M.; RAMOS, E. S.; YOSHIMOTO, M.; MARTELLI, L. Familial chromosomal translocation X; 22 associated with infertility and recurrent X mosaicism. **Molecular Cytogenetics** vol.9 p.1-7, 2016.

GRONSKOV, K.; DOOLEY, C. M.; OSTERGAARD, E.; KELSH, R. N.; HANSEN, L.; LEVESQUE, M. P.; VILHELMSSEN, K.; MOLLGARD, K.; STEMPLE, D. L.; ROSENBERG, T. Mutations in C10orf11, a melanocyte-differentiation gene, cause autosomal-recessive albinism. **American Journal of Human Genetics**, vol.92, p.415–421, 2013.

GU, W.; ZHANG, F.; LUPISKI, J. R. Mechanisms for human genomic rearrangements. **Pathogenetics** 1:4, 2008.

HEHIR-KWA, J. Y.; WIESKAMP, N.; WEBBER, C.; PFUNDT, R.; BRUNNER, H. G.; GILISSEN, C.; VRIES, B. B. A.; PONTING, C. P.; VELTMAN, J. A. Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. **PLoS ONE**, vol.6, 2010.

HERRIGES, J. C.; DUGAN, S. L.; LAMB, A. N. Clinical and molecular cytogenetic characterization of a novel 10q interstitial deletion: a case report and review of the literature. **Molecular Cytogenetics**, vol.12, p.1-8, 2019.

HEVNER, R. F.; HODGE, R. D.; DAZA, R. A.; ENGLUND, C. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: Conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. **Neuroscience Research**, vol.55, p.223–233, 2006.

HIGGINS, A. W.; ALKURAYA, F. S.; BOSCO, A. F.; BROWN, K. K.; BRUNS, G. A. P.; DONAVAN, D. J.; EISENMAN, R.; FAN, Y.; FARRA, G. C.; FERGUSON, H. L.; GUSELLA, J. F.; HARRIS, D. J.; HERRICK, S. R.; KELLY, C.; KIN, H-G; KISHIKAWA, S.; KORF, B. R.; KULKAMI, S.; LALLY, E.; LEACH, N. T.; LEMYRE, E.; LEWIS, J.; LIGON, A. H.; LU, W.; MAAS, R. L.; MACDONALD, M. E.; MOORE, S. D. P.; PETERS, R. E.; QUADE, B. J.; QUINTERO-RIVERA, F.; SAAD, I.; SHEN, Y.; SHENDURE, J.; WILLIAMSON, R. E.; MORTON, C. C. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. **American Journal of Human Genetics**, vol.82, p.712-722, 2008.

HONG, S. E.; SHUGART, Y. Y.; HUANG, D. T.; SHAHWAN, S. A.; GRANT, P. E.; HOURIHANE, J. O.; MARTIN, N. D.; WALSH, C. A. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. **Nature Genetics**, vol.26, p.93–96, 2000.

ISCN 2016: **an international system for human cytogenetic nomenclature** (2016). Basel; Unionville, CT: Karger, cop. 2016.

JACOBS, P. A.; BROWNE, C.; GREGSON, N.; JOYCE, C.; WHITE, H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. **Journal of Medical Genetics**, vol.29, p.103-108, 1992.

JONES, M. J. K.; JALLEPALLI, P. V. Chromothripsis: chromosomes in crisis. **Developmental Cell**, vol.23 p.908–917, 2012.

KAROGLAN, A.; SCHANZE, D.; BÄR, C.; MUSCHKE, P.; ZENKER, M.; SCHANZE, I. A 2q24.2 microdeletion containing TANK as novel candidate gene for intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics Part A**, vol.139, p.832-836, 2019.

- KAWAHARA, A.; HISANO, Y.; OTA, S.; TAIMATSU, K. Site-Specific Integration of Exogenous Genes Using Genome Editing Technologies in Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, vol.17, p.1-10, 2016.
- KRAFT, M.; CIRSTEAN, I. C.; VOSS, A. K.; THOMAS, T.; GOEHRING, I.; SHEIKH, B. N.; GORDON, L.; SCOTT, H.; SMYTH, G. K.; AHMADIAN, M. R.; TRAUTMANN, U.; ZENKER, M.; TARTAGLIA, M.; EKICI, A.; REIS, A.; DÖRR, H. G.; RAUCH, A.; THIEL, C. T. Disruption of the histone acetyltransferase MYST4 leads to a Noonan syndrome-like phenotype and hyperactivated MAPK signaling in humans and mice. **Journal of Clinical Investigation**, vol.121 p.3479–3491, 2011.
- KRAWCZYK, P. M.; BOROVSKI, T.; STAP, J.; CIJSOUW, T.; TEM CATE, R.; MEDEMA, J. P.; KANAAR, R.; FRANKEN, N. A.; ATEN, J. A. Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. **Journal of Cell Science** vol.125, p.2127–2133, 2012.
- KENWRICK, S.; PATTERSON, M.; SPEER, A.; FISCHBECK, K.; DAVIES, K. Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy region using pulsed field gel electrophoresis. **Cell**, vol.48, p.351-357, 1987.
- KLEINJAN, D. A.; VAN HEYNINGEN, V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. **American Journal of Human Genetics**, vol.76, p. 8-32, 2005.
- KREPISCHI, A. C.; KNIJNENBURG, J.; BERTOLA, D. R.; KIM, C. A.; PEARSON, P. L.; BIJLSMA, E.; SZUHAI, K.; KOK, F.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; ROSENBERG, C. Two distinct regions in 2q24.2–q24.3 associated with idiopathic epilepsy. **Epilepsia**, vol.51, p.2457–2460, 2010.
- KURATA, H.; SHIRAI, K.; SAITO, Y. Neurodevelopmental disorders in children with macrocephaly: A 9 prevalence study and PTEN gene analysis. **Brain Development**, vol. 40 p.36 – 41, 2018.
- LEE, E. J.; LEE, H.; HUANG, T. N.; CHUNG, C.; SHIN, W.; KIM, K.; KOH, J. Y.; HSUEH, Y. P.; KIM, E. Trans-synaptic zinc mobilization improves social interaction in two mouse models of autism through NMDAR activation. **Nature Communication**, vol.7168 p.1-13, 2015.
- LEE, J.; C. A. DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. **Cell**, vol.131, p.1235–1247, 2007.
- LE SCOUARNEC, S. & GRIBBLE, S. M. Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity*, vol.108, p.75-85, 2012.
- LEI, T. Y.; WANG, H. T.; LI, F.; CUI, Y. Q.; FU, F.; LI, R.; LIAO, C. De Novo 1.77-Mb Microdeletion of 10q22.2q22.3 in a Girl With Developmental Delay, Speech Delay, Congenital Cleft Palate, and Bilateral Hearing Impairment. **The Cleft Palate Craniofacial Journal**, vol.54, p.343-350, 2016.
- LETTICE, L. A.; DANIELS, S.; SWEENEY, E.; VENKATARAMAN, S.; DEVENNEY, P. S.; GAUTIER, P.; MORRISON, H.; FANTES, J.; HILL, R. E.; FITZPATRICK, D. R. Enhancer-adoption as a mechanism of human developmental disease. **Human Mutation**, vol.32, p.1492–1499, 2011.
- LIU, Y. Z.; WILSON, S. G.; WANG, L.; LIU, X. G.; GUO, F.; LI, J.; YAN, H.; DELOUKAS, P.; SORANZO, N.; CHINAPPEN-HORSLEY, U.; CERVINO, A.; WILLIAMS, F. M.; XIONG, D. H.; ZHANG, Y. P.; JIN, T. B.; LEVY, S.; PAPASIAN, C. J.; DREES, B. M.; HAMILTON, J. J.; RECKER, R. R.; SPECTOR, T. D.; DENG, H. W. Identification of PLCL1 gene for hipbone size variation in females in a genome-wide association study. **PLoS ONE**, vol.4 2008.
- LOWTHER, C.; COSTAIN, G.; MELVIN, R.; STAVROPOULOS, D. J.; LIONEL, A. C.; MARSHALL, C. R.; SCHERER, S. W.; BASSETT, A. S. Adult expression. of a 3q13.31 microdeletion. *Molecular Cytogenetics*, vol.7, p.1-7, 2014.
- LUKAS, C.; BARTEK, J.; LUKAS, J. Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. **Chromosoma**, vol.114, p.146–154, 2005.

- LUUKKONEN, T. M.; MEHRJOUY, M. M.; PÖYHÖNEN, M.; ANTTONEN, A. K.; LAHERMO, P.; ELLONEN, P.; PAULIN, L.; TOMMERUP, N.; PALOTIE, A.; VARILLO, T. Breakpoint mapping and haplotype analysis of translocation t(1;12)(q43;q21.1) in two apparently independent families with vascular phenotypes. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, vol.6, p.56–68, 2018.
- LUPSKI, J. R. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. **Trends in Genetics**, vol.14 p.417-422. 1998.
- MADAN K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, vol.158, p.947–963, 2012.
- MADAN, K.; NIEUWINT, A. W.; VAN-BEVER, Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. **Human Genetics**, vol.99, p.806-815, 1997.
- MANDAL, K.; AGARWAL, M.; BOGGULA, V. R.; PATIL, S. J.; PHADKE, S. R. Complex chromosomal rearrangement involving five chromosomes: deciphering genomic imbalances in an apparently balanced chromosomal translocation. **Clinical Dysmorphology**.vol.25, p.63-67, 2016.
- MAGRI, C.; PIOVANI, G.; PILOTTA, A.; MICHELE, T.; BUZI, F.; BARLATI, S. De novo deletion of chromosome 2q24.2 region in a mentally retarded boy with muscular hypotonia. **European Journal of Medical Genetics**, vol.54, p.361–364, 2011.
- MENDEZ-GOMEZ, H. R.; VERGAN, O-VERA, E.; ABAD, J. L.; BULFONE, A.; MORATALLA, R. DE PABLO, F.; VICARIO-ABEJON, C. The T-box brain 1 (Tbr1) transcriptionfactor inhibits astrocyte formation in the olfactory bulb and regulatesneural stem cell fate. **Molecular Cell Neuroscience**, vol.46, p.108–121, 2011.
- MERGENER, R.; LUDWING, L. B.; MALUF, S. W. Alterações cromossômicas estruturais, in: MALUF, S. W.; RIEGEL, M. et al., (Org.). **Citogenética Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- MERSON, T. D.; DIXON, M. P.; COLLIN, C. RIETZE, R. L.; BARTLETT, P. F.; THOMAS, T.; VOSS, A. K. The transcriptional coactivator Querkopf controls adult neurogenesis. **Journal of Neuroscience**, vol.26, p.11359–11370, 2006.
- MILLER, D. T.; ADAM, M. P.; ARADHYA, S.; BIESECKER, L. G.; BROTHMAN, A. R.; CARTER, N. P.; CHURCH, D. M.; CROLLA, J. A.; EICHLER, E. E.; EPSTEIN, C. J.; FAUCETT, W. A.; FEUK, L.; FRIEDMAN, J. M.; HAMOSH, A.; JACKSON, L.; KAMINSKY, E. B.; KOK, K.; KRANTZ, I. D.; KUHN, R. M.; ROSENBERG, C. SHERER, S. W.; SPINNER, N. B.; THORLAND, E. C.; WAGGONER, D. J.; WATSON, M. S.; MARTIN, C. L.; LEDBETTER, D. H. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **American Journal of Human Genetics**, vol.86, p.749-764, 2010.
- MITCHELL, T. N.; FREE, S. L.; WILLIAMSON, K. A.; STEVENS, J. M.; CHURCHILL, A. J.; HANSON, I. M.; SHORVON, S. D.; MOORE, A. T.; VAN HEYNINGEN, V.; SISODIYA, S. M. Polymicrogyria and absence of pineal gland due to PAX6 mutation. **Annals of Neurology**, vol.53 p.658–663, 2003.
- MOLIN, A. M.; ANDRIEUX, J.; KOOLEN, D. A.; MALAN, V.; CARELLA, M.; COLLEAUX, L.; CORMIER-DAIRE, V.; DAVID, A.; DE LEEUW, N.; DELOBEL, B.; DUBAN-BEDU, B.; FISCHETTO, R.; FLINTER, F.; KJAERGAARD, S.; KOK, F.; KREPISCHI, A. C.; LE CAIGNEC, C.; OGILVIE, C. M.; MAIA, S.; MATHIEU-DRAMARD, M.; MUNNICH, A.; PALUMBO, O.; PAPADIA, F.; PFUNDT, R.; REARDON, W.; RECEVEUR, A.; RIO, M.; DARLING, L.; ROSENBERG, C.; SA, J. A novel microdeletion syndrome at 3q13.31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features. **Journal of Medical Genetics**, vol.49 p.104–109, 2012.
- MORAES, A. C.; MORON, A. F.; HASHIMOTO, E. M.; SILVA, I. D. C. G.; TORLONI, M. R.; SOUZA, M. M.; PATRICIO, F. R. Abordagem citogenética e molecular em material de abortos espontâneos. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetricia**, 2005.

- MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, vol.20, p.613-616, 1960.
- NAGAMANI, S. C.; EREZ, A.; BEN-ZEEV, B.; FRYDMAN, M.; WINTER, S.; ZELLER, R.; EL-KHECHEN, D.; ESCOBAR, L.; STANKIEWICZ, P.; PATEL, A.; CHEUNG, S. W. Detection of copy-number variation in AUTS2 gene by targeted exon array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders. **European Journal of Human Genetics**, vol.21, p.343–346, 2013.
- NAMJOU, B.; MARSOLO, K.; CAROLL, R. J.; DENNY, J. C.; RITCHIE, M. D.; VERMA, S. S.; LINGREN, T.; POROLLO, A.; COBB, B. L.; PERRY, C.; KOTTYAN, L. C.; ROTHENBERG, M. E.; THOMPSON, S. D.; HOLM, I. A.; KOHANE, I. S.; HARLEY, J. B. Phenome-wide association study (PheWAS) in EMR-linked pediatric cohorts, genetically links PLCL1 to speech language development and IL5-IL13 to eosinophilic esophagitis. **Frontiers in Genetics**, vol.5, p.1-12 2014.
- NATARAJAN, A.; BOEI, J. J. W. A. Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. **Mutation Research**, vol. 544, 2003.
- NOTWELL, J. H.; HEAVNER, W. E.; DARBANDI, S. F.; KATZMAN, S.; MCKENNA, W. L.; ORTIZ-LONDONO, C. F.; TASTAD, D.; ECKLER, M. J.; RUBENSTEIN, J. L.; MCCONNELL, S. K.; CHEN, B.; BEJERANO, G. TBR1 regulates autism risk genes in developing neocortex. **Genome research**, vol.26, p.1013-1022, 2016.
- NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. (2016) **Thompson & Thompson – Genética Médica**. Oitava Edição. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 525 p.
- ONO, H.; KUROSAWA, K.; WAKAMATSU, N.; MASUDA, S. Hearing impairment in a female infant with interstitial deletion of 2q24.1q24.3. **Congenital anomalies (Kioto)**, vol.57, p.118-121, 2017.
- OTTAVIANI, D.; LE CAIN, M.; SHEER, D. The role of microhomology in genomic structural variation. **Trends in Genetics**, vol.30 p.85-94, 2014.
- OU, Z.; STANKIEWICZ, P.; XIA, Z.; BREMAN, A. M.; DAWSON, B.; WISZNIEWSKA, J.; SZAFRANSKI, P.; COOPER, M. L.; RAO, M.; SHAO, L.; SOUTH, S. T.; COLEMAN, K.; FERNHOFF, P. M.; DERAY, M. J.; ROSENGREN, S.; ROEDER, E. R.; ENCISO, V. B.; CHINAULT, A. C.; PATEL, A.; KANG, S. H.; SHAW, C. A.; LUPSKI, J. R.; CHEUNG, S. W. Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between nonhomologous chromosomes. **Genome Research**, vol.21 p.33-46, 2011.
- PAI, G. S.; THOMAS, G. H.; MAHONEY, W.; MIGEON, B. R. Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. **Clinical Genetics** vol.18 p.436–44, 1980.
- PALUMBO, O.; FICHERA, M.; PALUMBO, P.; RIZZO, R.; MAZZOLLA, E.; COCUZZA, D. M.; CARELLA, M.; MATTINA, T. TBR1 is the Candidate Gene for Intellectual Disability in Patients With a 2q24.2 Interstitial Deletion. **American Journal of Medical Genetics**, vol.164, p.828–833, 2014.
- PAPADOPOULOU, E.; SISMA, C.; CHRISTODOULOU, C.; LOANNIDES, M.; KALMANTI, M.; PATSALIS, P. Phenotype–Genotype Correlation of a Patient With a “Balanced” Translocation 9;15 and Cryptic 9q34 Duplication and 15q21q25 Deletion. **American Journal of Medical Genetics**, vol.152, p.1515-1522, 2010.
- PARK, S-J.; JUNG, E. H.; RYU, R-S.; KANG, H. W.; KO, J-M.; KIM, H. J.; CHEON, C. K.; HWANG, S-H.; KANG, H-Y. A Multi-Sample Based Method for Identifying Common CNVs in Normal Human Genomic Structure Using High-Resolution aCGH Data. **PLoS ONE**, vol.6, 2011.
- PELLESTOR, F.; ANAHORY, T.; LEFORT, G.; PUECHBERTY, J.; LIEHR, T.; HÉDON, B.; SARDA, P. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. **Human Reproduction**, vol.17 p.476–94, 2011.

PELLESTOR, F. Chromoanagenesis: cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. **Molecular Cytogenetics**, vol.12 p.3-12, 2019.

PELLESTOR, F. Chromothripsis – **Methods and Protocols**. New York: Human Press, 2018.

PELLESTOR, F.; GATIONIS, V. Chromoanasythesis: another way for the formation of complex chromosomal abnormalities in human reproduction. **Human Reproduction**, Vol.33, p.1381–1387, 2018.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol.83, p.2934-2938, 1986.

PREIKSAITIENE, E.; TUMIENĖ, B.; MALDŽIENĖ, Ž.; PRANCKEVIČIENĖ, E.; MORKŪNIENĖ, A.; UTKUS, A.; KUČINSKAS, V. Features of KAT6B-related disorders in a patient with 10q22.1q22.3 deletion. **Ophthalmic Genetics**, vol.38 p.383–6, 2017.

PRIYA, P. K.; MISHRA, V. V.; ROY, P.; PATEL, H. A study on balanced chromosomal translocations in couples with recurrent pregnancy loss. **Journal of Human Reproduction**, vol.11 p.337-42, 2018.

PUTHIYEDTH, N.; RIVEROS, C.; BERRETTA, R.; MOSCATO, P. Identification of Differentially Expressed Genes through Integrated Study of Alzheimer’s Disease Affected Brain Regions. **PLOS ONE**, vol.11, p.1-29, 2016.

RAO, L.; KANAKAVALLI, M.; PADMALATHA, V.; NALLARI, P.; SINGH, L. Paternally derived translocation t(8;18)(q22.1;q22)pat associated in a patient with developmental delay: Case report and review. **Journal of Pediatric Neurosciences**, vol.5, p.64-67, 2010.

REDDY, K. S.; MARDACH, R.; BASS, H. Oligoarray (105K) CGH Analysis of Chromosome Microdeletions within 10q22.1q24.32. **Cytogenetics and Genome Research**, vol.132, p.113-120, 2011.

REDIN, C.; BRAND, H.; COLLINS, R. L.; KAMMIN, T.; MITCHELL, E.; HODGE, J. C.; HANSCOM, C.; PILLALAMARRI, V.; SEABRA, C. M.; ABBOTT, M. A.; RAHMAN, O. A.; ABERG, E.; ADLEY, R.; ALCARAZ-ESTRADA, S. L.; ALKURAYA, F. S.; AN, Y.; ANDERSON, M. A.; ANTOLIK, C.; ANYANE-YEBOA, K.; ATKIN, J. F.; BARTELL, T.; BERNSTEIN, J. A.; BEYER, E.; BLUMENTHAL, I.; BONGERS, E. M.; BRILSTRA, E. H.; BROWN, C. W.; BRÜGGENWIRTH, H. T.; CALLEWAERT, B.; CHIANG, C.; CORNING, K.; COX, H.; CUPPEN, E.; CURRALL, B. B.; CUSHING, T.; DAVID, D.; DEARDORFF, M. A.; DHEEDENE, A.; D’HOOGHE, M.; DE VRIES, B. B.; EARL, D. L.; FERGUSON, H. L.; FISHER, H.; FITZPATRICK, D. R.; GERROL, P.; GIACHINO, D.; GLESSNER, J. T.; GLIEM, T.; GRADY, M.; GRAHAM, B. H.; GRIFFIS, C.; GRIPP, K. W.; GROPMAN, A. L.; HANSON-KAHN, A.; HARRIS, D. J.; HAYDEN, M. A.; HILL, R.; HOCHSTENBACH, R.; HOFFMAN, J. D.; HOPKIN, R. J.; HUBSHMAN, M. W.; INNES, A. M.; IRONS, M.; IRVING, M.; JACOBSEN, J. C.; JANSSENS, S.; JEWETT, T.; JOHNSON, J. P.; JONGMANS, M. C.; KAHLER, S. G.; KOOLEN, D. A.; KORZELIUS, J.; KROISEL, P. M.; LACASSIE, Y.; LAWLESS, W.; LEMYRE, E.; LEPPIG, K.; LEVIN, A. V.; LI, H.; LI, H.; LIAO, E. C.; LIM, C.; LOSE, E. J.; LUCENTE, D.; MACERA, M. J.; MANAVALAN, P.; MANDRILE, G.; MARCELIS, C. L.; MARGOLIN, L.; MASON, T.; MASSER-FRYE, D.; MCCLELLAN, M. W.; MENDOZA, C. J.; MENTEN, B.; MIDDELKAMP, S.; MIKAMI, L. R.; MOE, E.; MOHAMMED, S.; MONONEN, T.; MORTENSON, M. E.; MOYA, G.; NIEUWINT, A. W.; ORDULU, Z.; PARKASH, S.; PAUKER, S. P.; PEREIRA, S.; PERRIN, D.; PHELAN, K.; AGUILAR, R. E.; PODDIGHE, P. J.; PREGNO, G.; RASKIN, S.; REIS, L.; RHEAD, W.; RITA, D.; RENKENS, I.; ROELEN, F.; RULIERA, J.; RUMP, P.; SCHILIT, S. L.; SHAHEEN, R.; SPARKES, R.; SPIEGEL, E.; STEVENS, B.; STONE, M. R.; TAGOE, J.; THAKURIA, J. V.; VAN BOM, B. W.; VAN DE KAMP, J.; VAN DER BURGT, I.; VAN ESSEN, T.; VAN RAVENSWAAIJ-ARTS, C. M.; VAN ROOSMALEN, M. J.; VERGULT, S.; VOLKER-TOUW, C. M.; WARBURTON, D. P.; WATERMAN, M. J.; WILEY, S.; WILSON, A.; YERENA-DEVEGA, M. C.; ZORI, R. T.; LEVY, B.; BRUNNER, H. G.; DE LEEUW, N.; KLOOSTERMAN, W. P.; THORLAND, E. C.; MORTON, C. C.; GUSELLA, J. F.; TALKOWSKI, M. E. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. **Nature Genetics**, vol. 49, p.36-45, 2017.

REN, D.; KIM, H.; TU, H. C.; WESTERGARD, T. D.; FISHER, J. K.; RUBENS, J. A. The VDAC2-BAK rheostat controls thymocyte survival. **Science Signaling**, vol.2 p.48, 2009.

RIGGS, E. R.; CHURCH, D. M.; HANSON, K.; HORNER, V. L.; KAMINSKY, E. B.; KUHN, R. M.; WAIN, K. E.; WILLIAMS, E. S.; ARADHYA, S.; KEARNEY, H. M.; LEDBETTER, D. H.; SOUTH, S. T.; THORLAND, E. C.; MARTIN, C. L. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. **Clinical Genetics**, vol.81 p.403–412, 2012.

ROIX, J. J.; MCQUEEN, P. G.; MUNSON, P. J.; PARADA, L. A.; MISTELI, T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. **Nature Genetics**, vol.34 p.287–291, 2003.

ROUKOS V, BURMAN B, MISTELI T. The cellular etiology of chromosome translocations. **Current Opinion in Cell Biology**, vol.25 p.357–364, 2013.

ROUKOS, V.; MISTELI, T. The biogenesis of chromosome translocations. **Nature Cell Biology**, vol.16, p.293–300, 2014.

ROWLEY, J. D. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, vol.243, p.290–293, 1973.

SCHERES, J. M. J. C. Human chromosome banding. **Lancet**, vol.1, p.849, 1972.

SCHLUTH-BOLARD. C.; DIGUET, F.; CHATRON, N.; ROLLAT-FARNIER, P. A.; BARDEL, C.; AFENJAR, A.; AMBLARD, F.; AMIEL, J.; BLESSON, S.; CALLIER, P.; CAPRI, Y.; COLLIGNON, P.; CORDIER, M. P.; COUBES, C.; DEMEER, B.; CHAUSSENOT, A.; DEMURGER, F.; DEVILLARD, F.; DOCO-FENZY, M.; DUPONT, C.; DUPONT, J. M.; DUPUIS-GIROD, S.; FAIVRE, L.; GILBERT-DUSSARDIER, B.; GUERROT, A. M.; HOULIER, M.; ISIDOR, B.; JAILLARD, S.; JOLY-HÉLAS, G.; KREMER, V.; LACOMBE, D.; LE CAIGNEC, C.; LEBBAR, A.; LEBRUN, M.; LESCA, G.; LESPINASSE, J.; LEVY, J.; MALAN, V.; MATHIEU-DRAMARD, M.; MASSON, J.; MASUREL-PAULET, A.; MIGNOT, C.; MISSIRIAN, C.; MORICE-PICARD, F.; MOUTTON, S.; NADEAU, G.; PEBREL-RICHARD, C.; ODENT, S.; PAQUIS-FLUCKLINGER, V.; PASQUIER, L.; PHILIP, N.; PLUTINO, M.; PONS, L.; PORTNOÏ, M. F.; PRIEUR, F.; PUECHBERTY, J.; PUTOUX, A.; RIO, M.; ROORYCK-THAMBO, C.; ROSSI, M.; SARRET, C.; SATRE, V.; SIFFROL, J. P.; TILL, M.; TOURAINE, R.; TOUTAIN, A.; TOUTAIN, J.; VALENCE, S.; VERLOES, A.; WHALEN, S.; EDERY, P.; TABEL, A. C.; SANLAVILLE, D. Whole genome paired-end sequencing elucidates functional and phenotypic consequences of balanced chromosomal rearrangement in patients with developmental disorders **Journal of Medical Genetics**, vol.56, p.526–535, 2019.

SCHLUTH-BOLARD, C.; DELOBEL, B.; SANLAVILLE, D.; BOUTE, O.; CUISSET, J. M.; SUKNO, S.; LABALME, A.; DUBAN-BEDU, B.; PLESSIS, G.; JAILLARD, S.; DUBOURG, C.; HENRY, C.; LUCAS, J.; ODENT, S.; PASQUIER, L.; COPIN, H.; LATOUR, P.; CORDIER, M. P.; NADEAU, G.; TILL, M.; EDERY, P.; ANDRIEUX, J. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. **European Journal of Medical Genetics**, vol.52, p.291–296, 2009.

SCHLUTH-BOLARD, C.; LABALME, A.; CORDIER, M. P.; TILL, M.; NADEAU, G.; TEVISSSEN, H.; LESCA, G.; BOUTRY-KRYZA, N.; ROSSIGNOL, S.; ROCAS, D.; DUBRUC, E.; EDERY, P.; SANLAVILLE, D. Breakpoint by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. **Journal Medical Genetics**, vol.50, p.144–150, 2012.

SCHNEIDER, A.; PUECHBERTY, J.; NG, B. L.; COUBES, C.; GATINOIS, V.; TOURNAIRE, M.; GIRARD, M.; DUMONT, B.; BOURET, P.; MAGNETTO, J.; BAGHDADLI, A.; PELLESTOR, F.; GENEVIÈRE, D. Identification of disrupted *AUTS2* and *EPA6* genes by array painting in a patient carrying a de novo balanced translocation t(3;7) with intellectual disability and neurodevelopment disorder. **American Journal of Medical Genetics A**, vol.167, p.3031–3037, 2015.

SHEN, M. M. Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome. **Cancer Cell**, vol.23 p.567–569, 2013.

SHIMOJIMA, K.; OKAMOTO, N.; YAMAMOTO, T. A 10q21.3q22.2 microdeletion identified in a patient with severe developmental delay and multiple congenital anomalies including congenital heart defects. **Congenital Anomalies (Kyoto)**, vol.58 p.36–68, 2018.

SHIOHAMA, T.; LEVMAN, J.; VASUNG, L.; TAKAHASHI, E. Brain Morphological Analysis in PTEN Hamartoma Tumor Syndrome NICL-18-995. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3287717>, 2018.

SIMIONI, M.; ARTIGUENAVE, F.; MEYER, V.; SGARDIOLI, I. C.; VIGUETTI-CAMPOS, L. N.; MONLLEÓ, I. L.; STEINER, C. E.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V. L. Genomic Investigation of Balanced Chromosomal Rearrangements in Patients with Abnormal Phenotypes. **Molecular Syndromology**, vol.8 p.-187-194, 2017.

SISMANI, C.; KITSIOU-TZELI, S.; IONNIDES, M.; CHRISTODOULOU, C.; ANASTASIADOU, V.; STYLIANIDOU, G.; PAPADOPOULOU, E.; KANAVAKIS, E.; KOSMAIDOU-ARAVIDOU, Z.; PATSALIS, P. C. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. **Molecular Cytogenetics**, vol.1 p.1-9, 2008.

SOUTH, S. T.; LEE, C.; LAMB, A. N.; HIGGINS, A. W.; KEARNEY, H. M. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. **Genetics in Medicine**, vol.15, p.901-909, 2013.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. **Annual Review of Medicine**, p.437-455, 2010.

STAROPOLI, J. F.; ABELIOVICH, A. The ubiquitin-proteasome pathway is necessary for maintenance of the postmitotic status of neurons. **Journal of Molecular Neuroscience**, vol.27, p.175–183, 2005.

STEPHENS, P. J.; GREENMAN, C. D.; FU, B.; YANG, F.; BIGNELL, G. R.; MUDIE, L. J.; PLEASANCE, E. D.; LAU, K. W.; BEARE, D.; STEBBINGS, L. A.; MCLAREN, S.; LIN, M. L.; MCBRIDE, D. J.; VARELA, I.; NIK-ZAINAL, S.; LEROY, C. JIA, M.; MENZIES, A.; BUTLER, A. P.; TEAGUE, J. W.; QUAIL, M. A.; BURTON, J.; SWERDLOW, H.; CARTER, N. P.; MORSBERGER, L. A.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; FOLLOWS, G. A.; GREEN, A. R.; FLANAGAN, A. M.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, P. A.; CAMPBELL, P. J. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, vol.144 p.27-40, 2011.

SUZUKI, E.; SHIMA, H.; TOKI, M.; HANEW, K.; MATSUBARA, K.; KURAHASHI, H.; NARUMI, S.; OGATA, T.; KAMIMAKI, T.; FUKAMI, M. Complex X-chromosomal rearrangements in two women with ovarian dysfunction: implications for chromothripsis/chromoanaysynthesis-dependent and-independent origins of complex genomic alterations. **Cytogenetic and Genome Research**, vol. p.1-7, 2017.

SUZUKI, T.; TSURUSAKI, Y.; NAKASHIMA, M.; MIYAKE, N.; SAITSU, H.; TAKEDA, S.; MATSUMOTO, N. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole-genome sequencing. **Journal of Human Genetics**, vol.59, 649-654, 2014.

TABET, A. C.; VERLOES, A.; PILORGE, M.; DELABY, E.; DELORME, R.; NYGREN, G.; DEVILLARD, F.; GÉRARD, M.; PASSEMARD, S.; HÉRON, D.; SIFFROI, J. P.; JACQUETTE, A.; DELAHAYE, A.; PERRIN, L.; DUPONT, C.; ABOURA, A.; BITOUN, P.; COLEMAN, M.; LEBOYER, M.; GILLBERG, C.; BENZACKEN, B.; BETANCUR, C. Complex nature of apparently balanced chromosomal rearrangements in patients with autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, Vol.6, p.1-14, 2015.

TALKOWSKI, M. E.; ROSENFELD, J. A.; BLUMENTHAL, I.; PILLALAMARRI, V.; CHIANG, C.; HEILBUT, A.; ERNST, C.; HANSCOM, C.; ROSSIN, E.; LINDGREN, A. M.; PEREIRA, S.; RUDERFER, D.; KIRBY, A.; RIPKE, S.; HARRIS, D. J.; LEE, J. H.; HA, K.; KIM, H. G.; SOLOMON, B. D.; GROPMAN, A. L.; LUCENTE, D.; SIMS, K.; OHSUMI, T. K.; BOROWSKY, M. L.; LORANGER, S.; QUADE, B.; LAGE, K.; MILES, J.; WU, B. L.; SHEN, Y.; NEALE, B.; SHAFFER, L. G.; DALY, M. J.; MORTON, C. C.; GUSELLA, J. F. Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. **Cell**, vol. 149, p.525-537, 2012.

THOMAS, T.; VOSS, A. K.; CHOWDHURY, K.; GRUSS, P. A MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development. **Development**, vol.127 p.2537–2548, 2000.

TRAYLOR, R. N.; DOBYNS, W. B.; ROSENFELD, J. A.; WHEELER, P.; SPENCE, J. E.; BANDHOLZ, A. M.; BAWLE, E. V.; CARMANY, E. P.; POWELL, C. M.; HUDSON, B.; SCHULTZ, R. A.; SHAFFER, L. G.; BALLIF, B. C. Investigation ofTBR1hemizygoty: Four individualswith 2q24 microdeletions. **Molecular Syndromology**, vol.3 p.102–112, 2012.

TREMBATH, D. G.; SEMINA, E. V.; JONES, D. H.; PATIL, S. R.; QIAN, Q.; AMENDT, B. A.; RUSSO, A. F.; MURRAY, J. C. Analysis of two translocation breakpoints and identification of a negative regulatory element in patients with Rieger’s syndrome. **Birth Defects Research part A Clinical Molecular Teratology**, vol.70, p.82–91, 2004.

TZSCHACH, A.; BISGAARD, A. M.; KIRCHHOFF, M.; GRAUL-NEUMANN, L. M.; NEITZEL, H.; PAGE, S.; AHMED, A.; MULLER, I.; ERDOGAN, F.; ROPERS, H. H.; KALSCHUEER, V. M.; ULLMANN, R. Chromosome aberrations involving 10q22: report of three overlapping interstitial deletions and a balanced translocation disrupting C10orf11. **European Journal of Human Genetics**, vol.18, p.291–295, 2010.

TZSCHACH, A.; KRAUSE-PLONKA, I.; MENZEL, C.; KNOBLAUCH, A.; TOENNIES, H.; HOELTZENBEIN, M.; RADKE, M.; ROPERS, H. H.; KALSCHUEER, V. Molecular cytogenetic analysis of a de novo interstitial chromosome 10q22 deletion. **American Journal of Medical Genetics A**, vol.140, p.1108–1110, 2006.

UTAMI, K. H.; HILLMER, A. M.; AKSOY, I.; CHEW, E. G.; TEO, A. S.; ZHANG, Z.; LEE, C. W.; CHEN, P. J.; SENG, C. C.; ARIYARATNE, P. N.; ROUAM, S. L.; SOO, L. S.; YOUSOOF, S.; PROKUDIN, I.; PETERS, G.; COLLINS, F.; WILSON, M.; KAKAKIOS, A.; HADDAD, G.; MENUET, A.; PERCHE, O.; TAY, S. K.; SUNG, K. W.; RUAN, X.; RUAN, Y.; LIU, E. T.; BRIAULT, S.; JAMIESON, R. V.; DAVILA, S.; CACHEUX, V. Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. **PLoS ONE**, vol.9 p.1-9, 2014.

VLCKOVA, M.; SIMANDLOVA, M.; ZIMMERMANN, P.; STRANECKY, V.; HARTMANNOVA, H.; HODANOVA, K.; HAVLOVICOVA, M.; HANCAROVA, M.; KMOCH, S.; SEDLACEK, Z. A patient showing features of both SBBYSS and GPS supports the concept of a KAT6B-related disease spectrum, with mutations in mid-exon 18 possibly leading to combined phenotypes. **European Journal of Medical Genetics**, vol.48 p.550-555, 2015.

VUILLAUME, M. L.; DELRUE, M. A.; NAUDION, S.; TOUTAIN, J.; FERGELOT, P.; ARVEILER, B.; LACOMBE, D.; ROORYCK, C. Expanding the clinical phenotype at the 3q13.31 locus with a new case of microdeletion and first characterization of the reciprocal duplication. **Molecular Genetics and Metabolism**, vol.110 p.90-97, 2013.

WARBURTON, D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. **American Journal of Human Genetics**, vol. 49, p.995–1013, 1991.

WATSON, C.; MARQUES-BONET, T.; SHARP, A.; MEFORD, H. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update. **The Annual Review of Genomics and Human Genetics**, vol.15, p.215-244, 2014.

WENGER, S. L.; STEELE, M. W.; BOONE, L. Y.; LENKEY, S. G.; CUMMINS, J. H.; CHEN, X. Q. Balanced karyotypes in six abnormal offspring of balanced reciprocal translocation normal carrier parents. **American Journal of Medical Genetics**, vol.55, p. 47-52, 1995.

WORBY, C. A.; DIXON, J. E. PTEN. **Annual. Review of Biochemistry**, vol.83 p.641-669, 2014.

YOKOYAMA, E.; VILLARROEL, C. E.; DEL CASTILLO, V.; TORRES, L.; SANCHEZ, S.; MOLINA, B.; AVILA, S.; CASTRILLO, J. L.; NAVARRETE-MENESES, P.; FRIAS, S. Interstitial deletion of 2q24.2: Further delineation of an emerging syndrome associated with intellectual disability, severe hypotonia and moderate intrauterine growth restriction. **American Journal of Medical Genetics Part A**, vol.164, p.824–827, 2014.

YOSHIMOTO, M.; LUDKOVSKI, O.; DEGRACE, D.; WILLIAMS, J. L.; EVANS, A.; SIRCAR, K.; BISMAR, T. A.; NUIN, P.; SQUIRE, J. A. PTEN genomic deletions that characterize aggressive prostate cancer originate close to segmental duplications. **Genes Chromosomes and Cancer**, vol.51 p.149–160, 2012.

ZEPEDA-MENDOZA, C. J.; IBN-SALEM, J.; KAMMIN, T.; HARRIS, D. J.; RITA, D.; GRIPP, K. W.; MACKENZIE, J. J.; GROPMAN, A.; GRAHAM, B.; SHAHEEN, R.; ALKURAYA, F. S.; BRASINGTON, C. K.; SPENCE, E. J.; MASSER-FRYE, D.; BIRD, L. M.; SPIEGEL, E.; SPARKES, R. L.; ORDULU, Z.; TALKOWSKI, M. E.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; ROBINSON, P. N. Computational prediction of position effects of apparently balanced human chromosomal rearrangements. *American Journal of Human Genetics*, vol.101 p.206-217, 2017.

ZHANG, C. Z.; LEIBOWITZ, M. L.; PELLMAN, D. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. **Genes and Development**, vol.27 p.2513–2530, 2013.

ZHU, G.; YOSHIDA, S.; MIGITA, K.; YAMADA, J.; MORI, F.; TOMIYAMA, M. Dysfunction of extrasynaptic GABAergic transmission in phospholipase C-related, but catalytically inactive protein 1 knockout mice is associated with an epilepsy phenotype. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol.340 p.520–528, 2012.

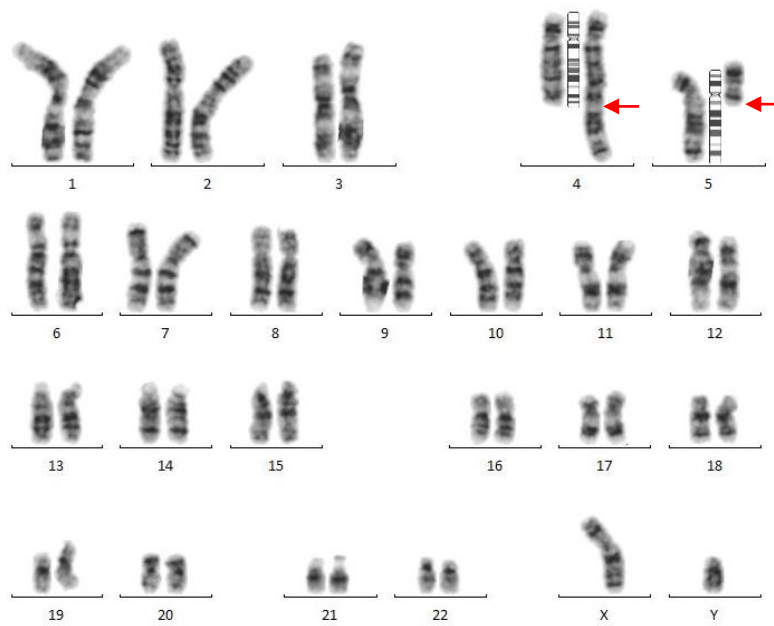
Appendice

Apêndice I

Citogenética Clássica

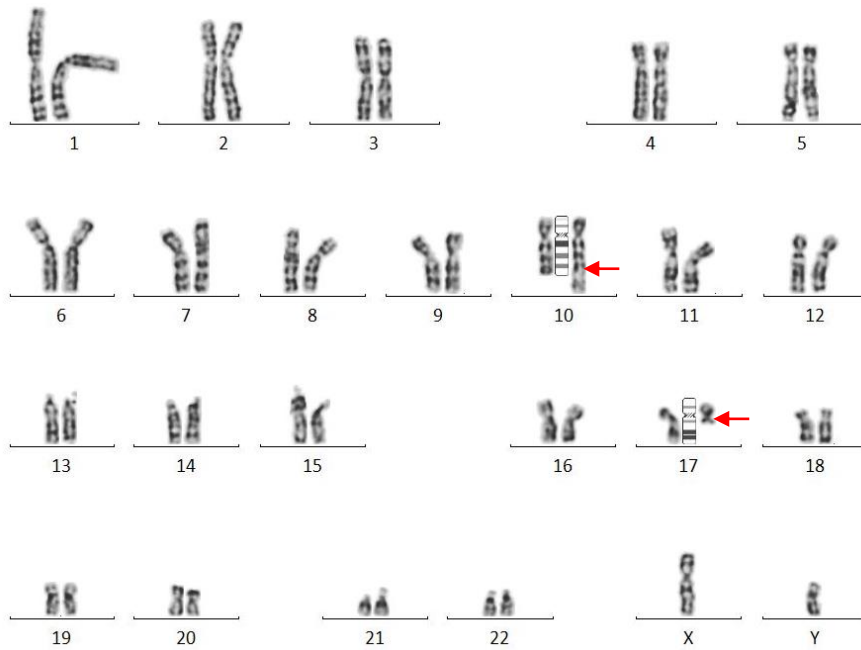
Cariótipo por bandamento GTG de todos os pacientes avaliados, evidenciando as translocações aparentemente equilibradas.

Paciente 1:



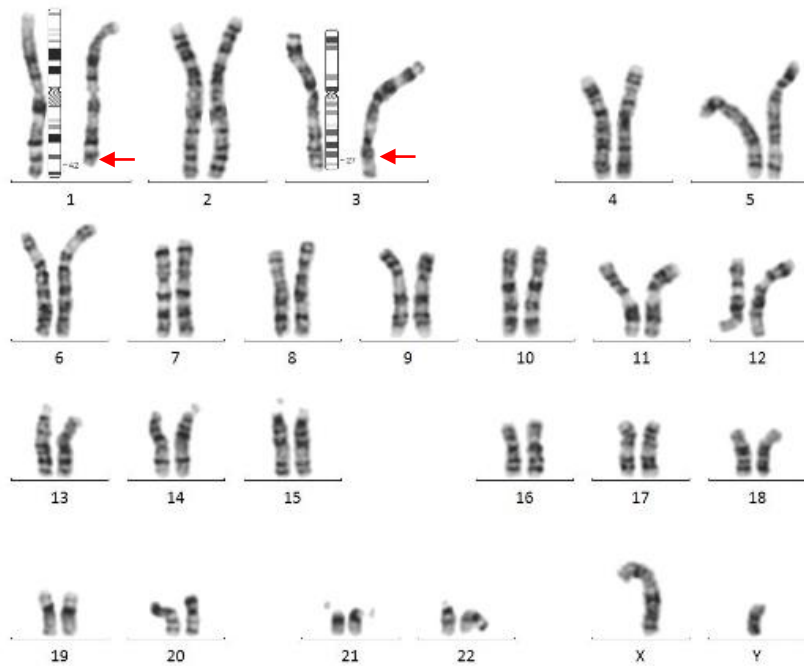
Cariótipo de P1: 46,XY,t(4;5)(q33;q12)mat

Paciente 2:



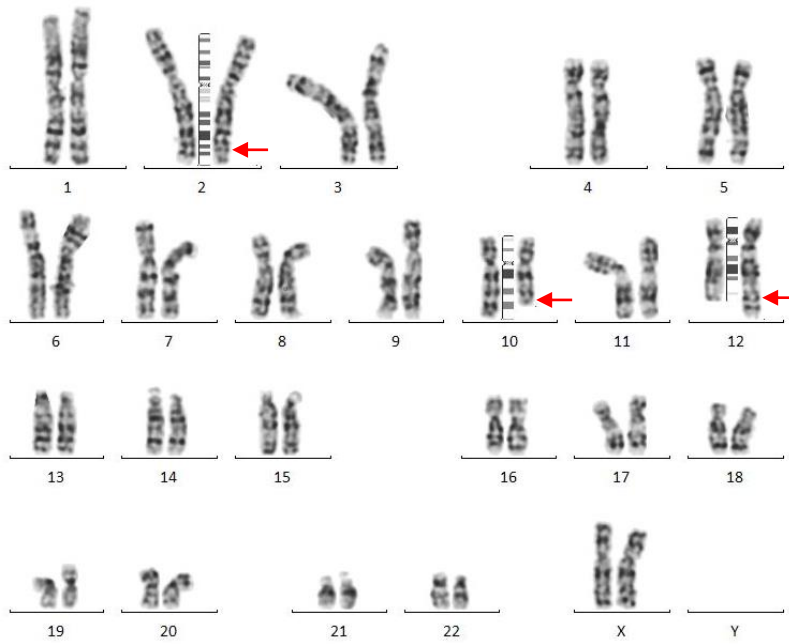
Cariótipo de P2: 46,XY,t(10;17)(q26.1;q21.1)mat

Paciente 3:



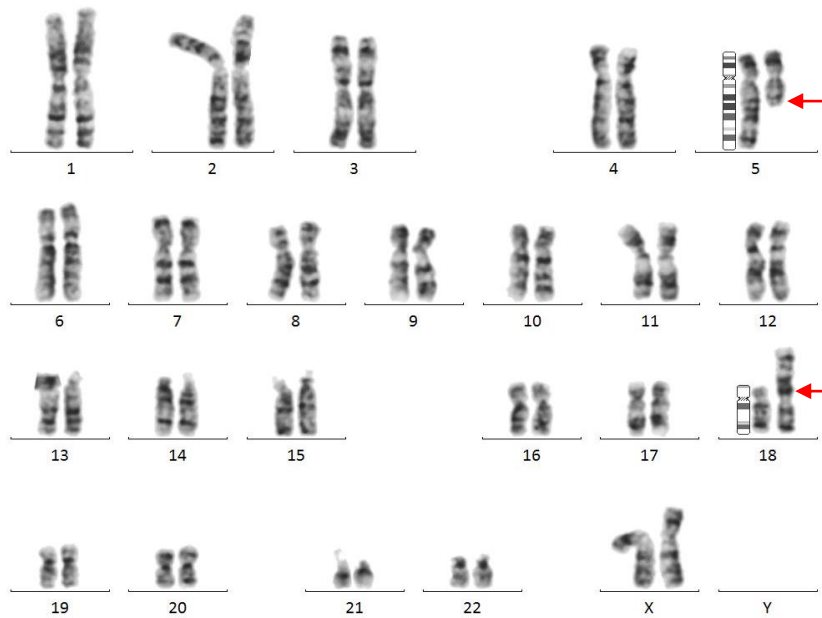
Cariótipo de P3: 46,XY,t(1;3)(q42;q27)mat

Paciente 4:



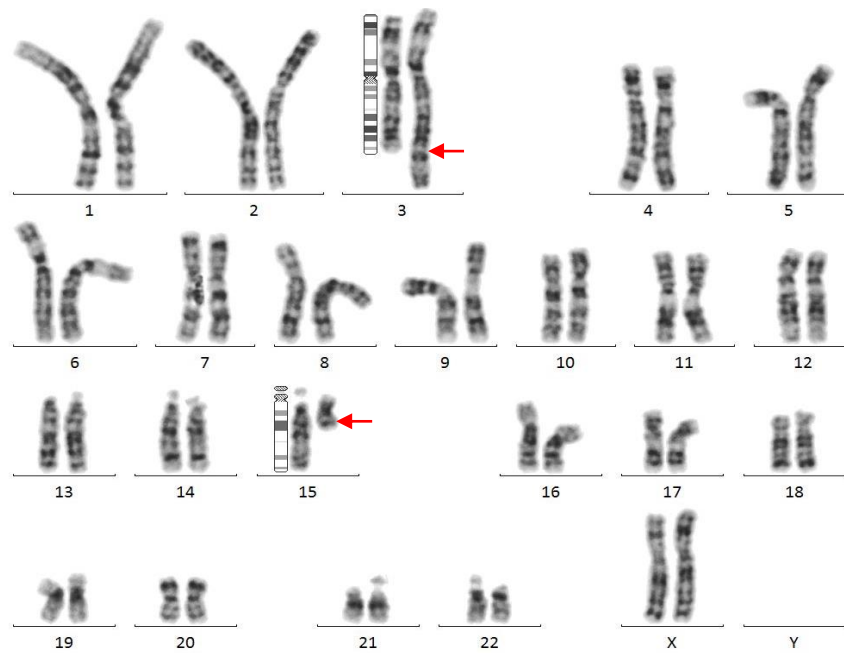
Cariótipo de P4: 46,XX,t(2;10;12)(q33;q24;24.3)

Paciente 5:



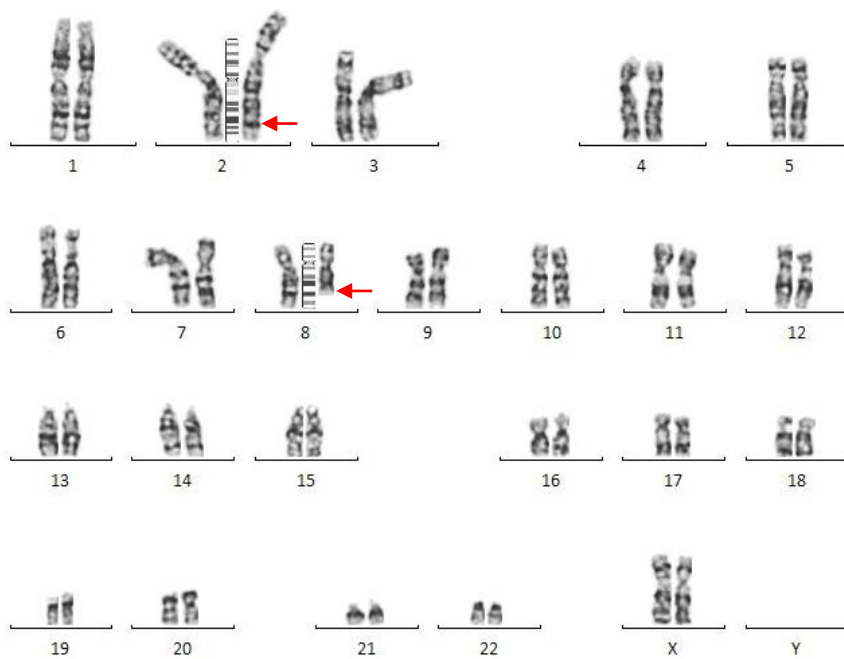
Cariótipo de P5: 46,XX,t(5;18)(q15;p11.2)

Paciente 6:



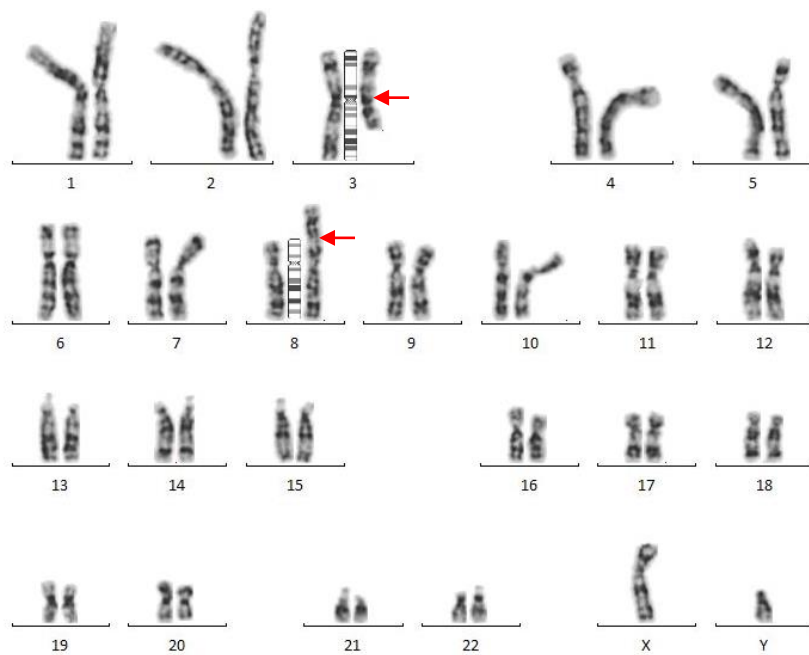
Cariótipo de P6: 46,XX,t(3;15)(q29;q15)

Paciente 7:



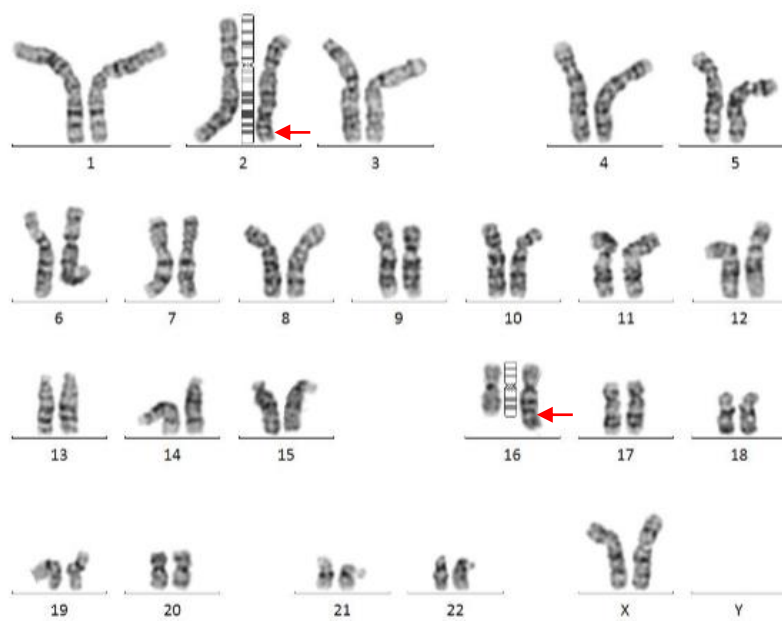
Cariótipo de P6: 46,XX,t(2;8)(q37;q24)

Paciente 8:



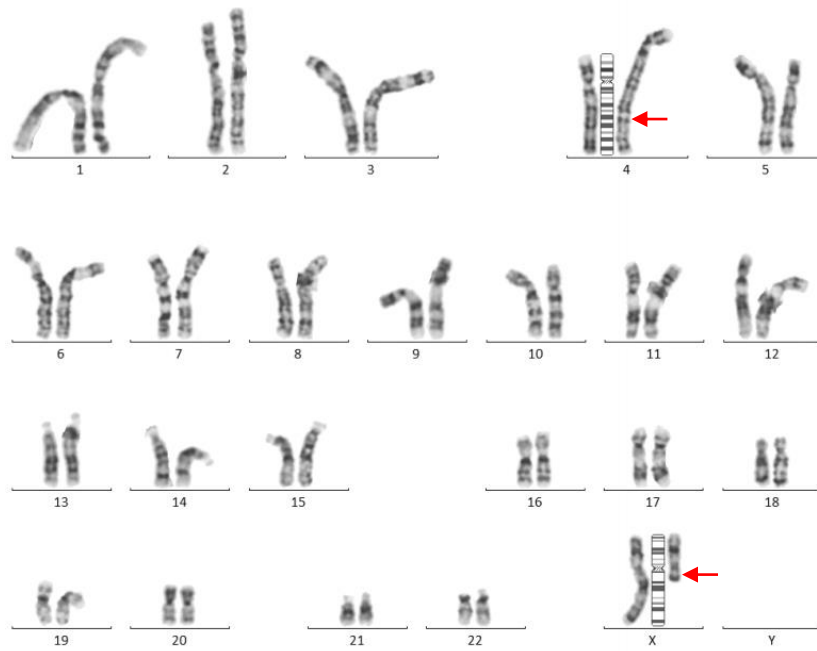
Cariótipo de P8: 46,XY,t(3;8)(q13.2;p21)

Paciente 9:



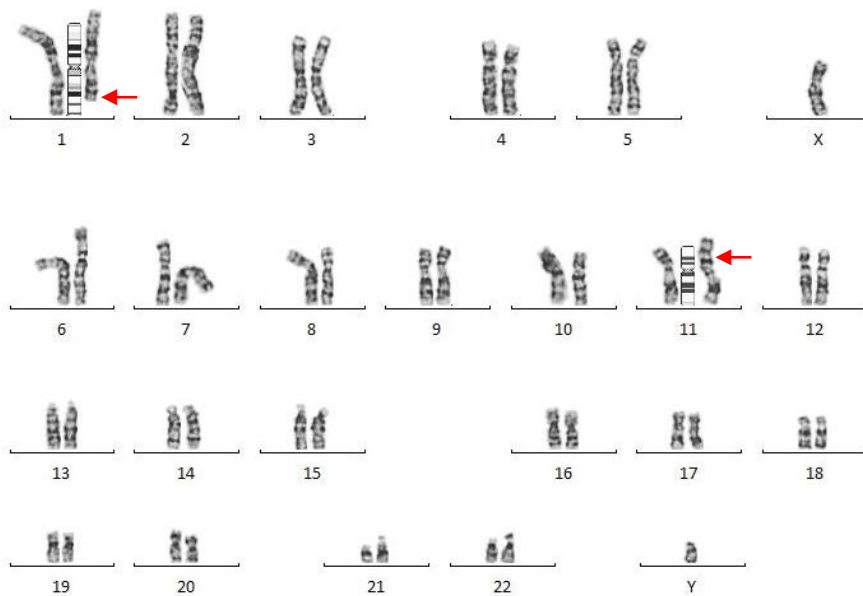
Cariótipo de P9: 46,XX,t(2;16)(p16;q24)

Paciente 10:



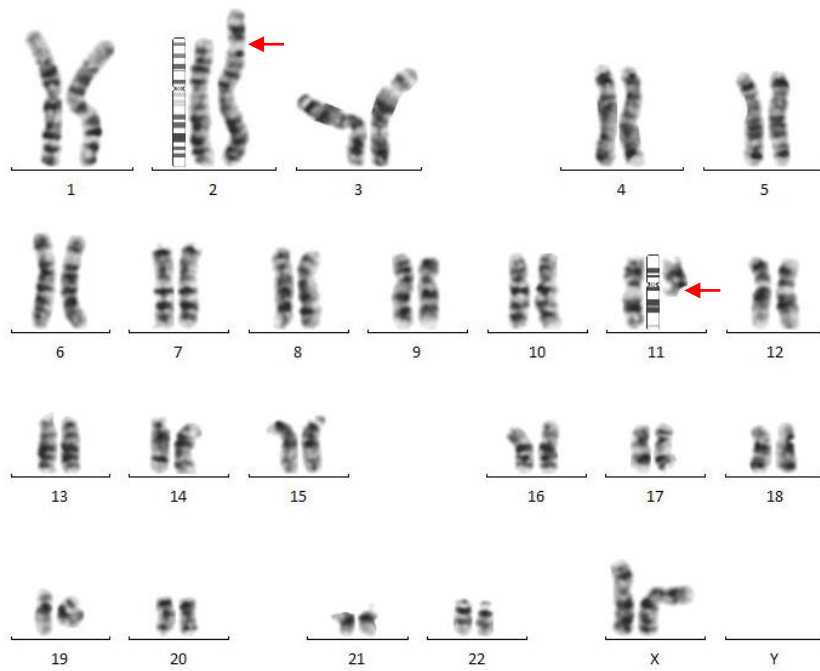
Cariótipo de P10: 46,XX,t(X;4)(q21;q32)

Paciente 11:



Cariótipo de P11: 46,XY,t(1;11)(q31;p13)

Paciente 12:



Cariótipo de P12: 46,XX,t(2;11)(p25;q13)

Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Estamos convidando você a participar de um projeto de pesquisa do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, intitulado “**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS**”, que tem como pesquisadores responsáveis Tatiana Mozer Joaquim e Profa. Dra. Lucia Regina Martelli (CREMESP 40.569). O objetivo deste estudo é avaliar a constituição genética do paciente para podermos explicar seus sintomas.

Para isso, será necessária a coleta de uma amostra de sangue de aproximadamente 5mL, utilizando uma agulha fina, o que pode causar desconforto, dor local e raramente, uma marca roxa que desaparecerá com o tempo, sem nenhum risco para a saúde. O material genético extraído da amostra permitirá avaliar todos os cromossomos (constituição genética) do paciente e se as mudanças encontradas podem explicar os sinais e sintomas apresentados. O material coletado será utilizado exclusivamente para esse projeto sendo descartado após o término da pesquisa.

Sua participação neste estudo não envolverá teste de novos procedimentos ou tratamentos, portanto sua saúde física não sofrerá nenhum risco.

Informamos que:

1. Sua participação é espontânea e opcional;
2. Caso você decida não participar, ou desista de participar da pesquisa a qualquer momento, você não perderá nenhum benefício ou tratamento que estiver fazendo neste Hospital;
3. Você estará colaborando para aumentar nosso conhecimento sobre as alterações cromossômicas e sua relação com características clínicas;
4. Para preservação de anonimato, os participantes serão identificados apenas por números e todas as informações coletadas serão mantidas em absoluto sigilo;
5. Você receberá uma via deste Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) devidamente assinada pelo participante e pelo pesquisador responsável;
6. A participação não trará nenhum benefício direto para sua saúde.

Caso haja qualquer dúvida, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pelos telefones (16) 3315-3081 (laboratório), 3602-2598 (secretaria), ou com Tatiana pelo telefone (16) 982562652.

Declaro que concordo com as condições que me foram apresentadas e aceito participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20__.

Nome do Paciente ou responsável

Assinatura do paciente ou responsável

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20__.

Nome do Pesquisador responsável

Assinatura do Pesquisador responsável

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HCFMRP) (Anexo II)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 03 de setembro de 2015

Ofício nº 3150/2015
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS” - Versão 3, de agosto de 2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 414ª Reunião Ordinária realizada em 31/08/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Versão 3, de 28/08/2015**, de acordo com o Processo HCRP nº 7491/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

TATIANA MOZER

PROF^a.DR^a. LUCIA REGINA MARTELLI (Orientadora)

Depto. de Genética – FMRP-USP

Descrição Clínica dos pacientes avaliados (Anexo III)**Paciente 1: GTG - 1085226I**

Identificação: GTG, 10 anos, natural e procedente de Matão (SP), estudante do 5º ano, iniciando alfabetização

História Médica Atual: Escolar encaminhado ao Serviço de Genética Médica do HCFMRP aos 10 anos através de Pedido de Intercorrência da Cardiologia Infantil por bradiarritmia com presença de pré-excitação ventricular associada com miocardiopatia hipertrófica concêntrica e simétrica de ventrículo esquerdo, associada com dificuldade escolar e dismorfias craniofaciais. Mãe referiu que aos 5 meses de vida do probando, foi percebido sopro cardíaco. Foi avaliado por cardiologista que solicitou exame complementar (ecocardiograma) que foi normal. Cerca de 3 meses após, evoluiu com “crise convulsiva” que se caracterizava por parada comportamental evoluindo com perda de consciência e movimentos tônico-clônicos. Realizou RNM de crânio que foi normal e EEG alterado, sendo iniciado medicação anticonvulsivante (Carbamazepina) e notado nesse período a bradicardia, sendo então encaminhado para avaliação no HC. Durante investigação neste hospital, descartado epilepsia e notado dificuldade escolar e dismorfias.

História Pré-natal: sem intercorrências

História Obstétrica: Mãe G3P2(N1C1)A1, RNP NAT, Pn: 3005g (p25/50); C: 47cm (p10/25); PC: 35cm (p75/90) , alta com 2 dias de vida, sem intercorrências.

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Mãe não soube precisar antecedentes, porém refere que não houve diferenças em comparação com a irmã do probando.

História Patológica Progressiva: Ablação de via pósteroseptal direita em 27/9/2011 em outro serviço.

História Familiar: Pais não consanguíneos
B1, dificuldade escolar
C1, portadora de translocação equilibrada 4;5
A1, probando, filho do segundo relacionamento materno
A2, meio-irmã, feminino, hígida
B2, morte súbita com idade entre 50-60 anos
Avô materno com problemas psiquiátricos

Exame Físico:**1. Antropometria (10 anos):**

Estatura: 144,5cm (p75)

Peso: 35,6 kg (p75)

PC: 51 cm (p10)

IC: 0,93

- 2. Exame Dismorfológico:** Braquicefalia, discreto sobredobramento de hélices bilateralmente, cílios longos, sobrelanceias espessas, discreta retrognatia, baixa implantação capilar anterior, hipoplasia de aletas nasais, postura cifótica, diastema, clinodactilia distal discreta de 5° QRD, frouxidão articular.

Exames Complementares:

1. Cariótipo: 46, XY,t(4;5)
2. CPK: 198 (VR: 24 – 195 U/L)/ repetida: 235
3. Atividade da beta galactosidase (DBS): 16,77 (VR: maior que 6 micromol/L/h)
4. Atividade da alfa glicosidase (DBS): 4,2 (VR: maior que 3,5 micromol/L/h)
5. ENMG: Normal
6. Atividade da LIPA: 0,50 (VR: 0,37 – 2,30 nmol/punch/h)
7. Lactato esforço: 1,8 (vr: 0,5 – 2,0)
8. RNM cardíaca: Discreto espessamento do VE com discreta hipocinesia septal

Paciente 2: GRF - 0813910E

Identificação: GRF, 12 anos, natural de Santo Expedito e procedente de Presidente Prudente (SP)

Hipótese Diagnóstica: Alteração estrutural cromossômica aparentemente equilibrada herdada paternalmente (translocação 10;17), com crises convulsivas de difícil controle (Síndrome de West) evoluindo com regressão neurológica.

História Médica Atual: Probando encaminhado para avaliação pelo Serviço de Neurologia Infantil do HCFMRP aos 3 anos e 6 meses por regressão neurológica e hipotonia global após quadro de crises convulsivas de difícil controle. Após exclusão de acidemia orgânica foi encaminhado para avaliação genético-clínica deste mesmo hospital. Crises convulsivas descritas como espasmos com cerca de 30 episódios/dia, com duração aproximada de 5 minutos e sem liberação esfíncteriana. Realizou EEG evidenciando hipsiarritmia.

História Pré-Natal: Mãe referiu 2 episódios de sangramento transvaginal. Primeiro, no 6° mês de gestação e segundo no 8° mês, mais intenso.

História Obstétrica: Mãe G5P4A1, RNPCAT, Parto cesárea por placenta prévia. Nasceu no Hospital Sino Brasileiro de Osasco, Pn: 3695g (p75/90); C: 49 cm (p50/75), APGAR: 8/9. Recebeu alta em 3 dias sem intercorrências

Teste do Pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Normal até início de crises convulsivas

História Patológica Progressiva: Orquidopexia à direita e herniorrafia E aos 3 anos; trauma em Membro inferior direito

História Familiar: Pais não consanguíneos

B1, 38 anos ao nascimento do probando, portador de alteração estrutural cromossômica equilibrada 46,XY,t(10;17)(q26;q21)

C1, 37 anos ao nascimento do probando, hígida

A2, 46, XY

A3, 46,XX,t(10;17)(q26;q21)

A4, Abortamento de 1 trimestre

A1, probando, 46,XY,t(10;17) (q26;q21), com crises convulsivas de difícil controle

Exame Físico:

1. Antropometria (4 anos e 3 meses)

Estatura: 110 cm (p75-90)

Peso: 15,8kg (p10)

PC: 47cm (< 2DP)

2. Exame Dismorfológico: Microcefalia, sinofre discreta, telecanto, epicanto bilateral, palato alto, raiz nasal baixa com narinas antevertidas, fenda palpebral oblíqua para cima, palato alto com incisivos centrais grandes e com diastema, frouxidão articular e pads fetais.

Exames Complementares:

1. BERA: Normal
2. Oftalmogenética: Normal
3. Cromatografia de Ácidos Orgânicos na Urina (2008): Normal
4. TEIM: Normal
5. Dosagem de Beta glicosidase: Normal
6. RNM de crânio: Normal
7. Eletroforese de Hemoglobina: Normal
8. US de abdomen: Normal

Paciente 3: GLN - 0695541K

Identificação: GLN, 13 anos, natural e procedente de São Sebastião do Paraíso (MG), estudante do 6º ano.

História Médica Atual: Paciente encaminhado para avaliação pelo Serviço de Genética Médica do HCFMRP aos 8 anos de idade por ADNPM evoluindo com dificuldade escolar e dismorfias.

História Pré-natal: Mãe referiu complicações associadas com gestação gemelar. Gestação por técnica de fertilização *in vitro* (FIV) por histórico de vasectomia do esposo.

História Obstétrica: Mãe G1P2A0, RNPCPTGemelarA, parto cesárea pré-termo com 6 meses de gestação por sofrimento fetal agudo. Pn: 1140g (<p10); C: 38 cm (p10); Alta após 30 dias de nascimento.

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor:

Primeiras palavras com mais de 2 anos de idade; Controle esfincteriano com mais de 5 anos

História Patológica Progressiva: Histórico de 1 crise convulsiva febril; Histórico de parada cardiorrespiratória mal caracterizada.

História Familiar: Pais não consanguíneos

B1, 40 anos ao nascimento do probando, hígido, 46, XY [11]

C1, 30 anos ao nascimento do probando, hígida.

Gemelar A, probando, com alteração estrutural cromossômica aparentemente equilibrada “de novo” com ADNPM e dismorfias.

Gemelar B hígido, 46,XY,(inv)(9)

Exame Físico:

1. Antropometria (13 anos):

Estatura: 144,5 cm (p10)

Peso: 30,7 kg (<p3)

PC: 53 cm (p25/50)

IC: 0,8

2. Exame Dismorfológico: Crânio braquicefálico, Face plana e triangular, hemangioma plano em glabella, raiz nasal alta e larga, estrabismo convergente à esquerda, hipoplasia de face média, boca pequena e palato alto, pescoço longo, frouxidão articular, hipotrofia, criptorquidia à direita.

Exames Complementares:

1. RNM de crânio: Normal
2. Ecocardiograma: Normal
3. Cariótipo: 46, XY,t(3;8)(q13.2;p21)
4. US de abdomen: Normal

Paciente 4: CASC - 0878158K

Identificação: CASC, 17anos e 10 meses, natural e procedente de Ribeirão Preto, frequente escola especial (Egydio Pedreschi)

História Médica Atual: Encaminhada da Neurologia Infantil/ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo para avaliação aos 8 anos por atraso de fala evoluindo com deficiência intelectual moderada associada com distúrbio comportamental (agitação com

auto e heteroagressividade). Foi avaliada então pelo Serviço de Genética Médica do HCFMRP e observado dismorfias.

História Pré-Natal: Sem intercorrências

História Obstétrica: Mãe G3P3A0, RPNAT, Pn: 3140g (p50/75); C: 50cm (p50/75); Alta hospitalar em 3 dias por icterícia.

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Sem atraso motor, apenas atraso de linguagem.

História Patológica Progressiva: ndn

História Familiar: Pais não consanguíneos
B1, 36 anos ao nascimento da probanda, hígido.
C1, 34 anos ao nascimento da probanda, hígida.
A2, hígido
A3, hígido.

Exame Físico:

1. **Antropometria** (15 anos e 9 meses):
Estatura: 157,5 cm (p10-25)
Peso: 49kg
PC: 56 cm (p90-97)
2. **Exame Dismorfológico:** Tendência à Macrocefalia, frontal amplo, implantação capilar posterior em tridente, orelhas rodadas posteriormente com crus da hélix à direita, maxila proeminente com palato ogival, incisivos centrais proeminentes, braquidactilia do tipo E, encurtamento de 4º e 5º metatarsos à esquerda, hipoplasia ungueal de 1º QRDs bilateralmente.

Exames Complementares:

1. RNM de crânio: Foco de desmielinização na transição córtico-subcortical compatíveis com leucodistrofia.
2. RX de pés: encurtamento de 4º metatarso
3. Oftalmogenética: Normal
4. Audiometria: Normal
5. Homocisteína: Normal
6. Cariótipo: 46,XX, t(2;10;12)(q33q24q24)

Paciente 5: ISC - 0960114K

Identificação: ISC, 7 anos, sexo feminino, natural e procedente de Varginha, Minas Gerais

Hipótese Diagnóstica: Alteração estrutural cromossômica – translocação 5;18 – aparentemente equilibrada com atraso do desenvolvimento Neuropsicomotor (ADNPM).

História Médica Atual: Escolar encaminhada ao Serviço de Genética Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCFMRP) para avaliação por histórico de hipotonia global evoluindo com ADNPM. Aos 8 meses de idade, mãe notou atraso dos marcos motores (hipotonia generalizada), sendo encaminhada para avaliação com neuropediatra. Após avaliação inicial e exames complementares, encaminhada para avaliação deste serviço. Evoluiu com distúrbio comportamental (agitação psicomotora).

História Pré-Natal: Mãe nega qualquer intercorrência pré-natal, negou tabagismo e etilismo.

História Obstétrica: Mãe G3P3A0, RNPCAT, Pn: 3045g (p50); C: 50cm (p50/75); APGAR: 10/10. Nasceu sem intercorrências recebendo alta em dois dias.

Teste do Pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Atraso global do desenvolvimento

Sustente cefálico (1a6m); Sentou sem apoio (3 anos); Andou (4 anos); Não forma palavras ou frases na presente idade.

História Patológica Progressiva: Hábito intestinal constipado; 2 crises convulsivas sem vigência de febre.

História Familiar: Casal não consanguíneo (pais separados)

B1, (não coletou exame citogenético)

C1, hígida, cariótipo: 46,XX [11]

A2, meio irmão materno, hígido

A3, meia irmã materna, hígida

A1, probanda, portadora de alteração estrutural cromossômica com ADNPM e distúrbio comportamental

Sobrinho materno em investigação para amaurose congênita de Leber

Exame Físico:

1. **Antropometria** (8 anos 11 meses):

Estatura: 126 cm (p10-25)

Peso: 23 kg (p)

PC: 50 cm (p3 -10)

2. **Exame Dismorfológico:** Face hipotônica, estrabismo convergente à esquerda, dentes apinhados, palato alto, pregueamento palmar anômalo com camptodactilia discreta, clinodactilia de 5 QRD bilateralmente, *genu recurvatum*

Exames Complementares:

1. Cariótipo: 46,XX, t (5;18)(q15p11.2)

Paciente 6: LLVSP - 1030754D

Identificação: LLVSP, 8 anos, natural e procedente de Ribeirão Preto

História Médica Atual: Encaminhada do NADEF aos 4 anos por ADNPM e dismorfias. Na presente data, não fala, não gesticula apenas grita quando quer alguma coisa. Ainda com comportamento agressivo (apenas heteroagressividade), pouca interação com outras crianças. Uso de fraldas contínuo. Nega crises convulsivas.

História Pré-Natal: Mãe referiu tratamento para 3 infecções do trato urinário com uso de Cefalexina.

História Obstétrica: Mãe G4P3A1, primeira gestação com ovo anembrionado, RNPAT, nasceu na MATER, Pn: 2650g (p25/50); C: 46,5 cm (p10/25);

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Atraso global com sustento cefálico com mais de 1 ano de idade e sentou sem apoio com 2 anos.

História Patológica Pgressa: ndn

História Familiar: Pais não consanguíneos

B1, 46,XY, 16qh+

C1, 45,X[1]/47,XXX[1]/48,XXX,i(x)(q10)[1]/46,XX[97]

A1, probanda

A2, hígido, 46,XY

A3, masculino, hígido (aguarda cariótipo)

G1, 45,X[4]/46,XX[96] (histórico de 2 abortamentos)

Exame Físico:

1. Antropometria (8 anos):

Comprimento: 120cm (p10)

Peso: 34 kg (p90)

PC: 50 cm (p3-p50)

2. Exame Dismorfológico: Face alongada, frontal amplo, aparente enoftalmia e hipotelorismo (não permite examinar), dentes espaçados e com má oclusão, estrabismo convergente, hipoplasia de face média. Dedos afilados, prega de hockey stick bilateral, aumento entre 1° e 2° artelhos com sulco plantar.

Exames Complementares:

1. Cariótipo: 46, XX,t(3;15)(q29;q15)

2. EEG: normal

3. RNM de crânio: Discreto atraso global e simétrico de desmielinização

4. BERA: Normal

5. TC de crânio: Normal

6. Oftalmogenética: Normal

Paciente 7: MRR - 0892373I

Identificação: MRR, 15 anos, natural e procedente de Franca, estudante da APAE

História Médica Atual: Mãe referindo que por conta do ADNPM notado aos 8 meses de idade da probanda, esta foi encaminhada para avaliação por pediatra que a encaminhou para APAE. Evoluiu com atraso da marcha e com quedas frequentes. Aos 5 anos iniciou algumas poucas palavras, sendo então encaminhada aos 8 anos para investigação no Serviço de Genética Médica por ADNPM e dismorfias. Evoluiu com deficiência Intelectual grave.

História Pré-Natal: Mãe em tratamento para hipotireoidismo. Referiu exames de seguimento normais.

História Obstétrica: Mãe G4P4A0, RNPAT, Nasceu na Santa casa de Franca, Pn: 3200g (p50/75); C: 50cm (p50/75); alta da maternidade em 2 dias.

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Atraso global

História Patológica Progressiva: ndn

História Familiar: Pais não consanguíneos
B1, 43 anos ao nascimento da probanda,
C1, 40 anos ao nascimento da probanda,
A2, masculino, fenda palatina corrigida.
A3, masculino, hígido,
A4, feminino, hígido,
A1, probanda

Exame Físico:

- 1. Antropometria (15 anos):**
Estatura: 164,5cm (p50/75)
Peso: 49,4 kg (p25/50)
PC: 57 cm (p75-97)
- 2. Exame Dismorfológico:** Dolicocefalia, face alongada e triangular; estrabismo divergente, macrodontia com hipertrofia gengival, estrabismo divergente; 5° QRD curtos e com clinodactilia; alargamento de falanges distais de mmss, pés planos frouxidão ligamentar.

Exames Complementares:

- 1. BERA (9/3):** Normal
- 2. TC DE CRANIO (7/3):** Normal
- 3. RX PANORAMICA:** Morfologia anômala da dentição (alteração da dentina)
- 4. ECOCARDIO (6/09):** Normal
- 5. Cariótipo:** 46,XX,t(2;8)(q37;q24)

Paciente 8: GLN - 0695541K

Identificação: GLN, 13 anos, natural e procedente de São Sebastião do Paraíso (MG), estudante do 6º ano.

História Médica Atual: Paciente encaminhado para avaliação pelo Serviço de Genética Médica do HCFMRP aos 8 anos de idade por ADNPM evoluindo com dificuldade escolar e dismorfias.

História Pré-natal: Mãe referiu complicações associadas com gestação gemelar. Gestação por técnica de fertilização *in vitro* (FIV) por histórico de vasectomia do esposo.

História Obstétrica: Mãe G1P2A0, RNPCPT GemelarA, parto cesárea pré-termo com 6 meses de gestação por sofrimento fetal agudo. Pn: 1140g (<p10); C: 38 cm (p10); Alta após 30 dias de nascimento.

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor:

Primeiras palavras com mais de 2 anos de idade; Controle esfíncteriano com mais de 5 anos

História Patológica Progressiva: Histórico de 1 crise convulsiva febril; Histórico de parada cardiorrespiratória mal caracterizada.

História Familiar: Pais não consanguíneos

B1, Luiz Carlos, 40 anos ao nascimento do probando, hígido, 46, XY

C1, Maria de Fátima, 30 anos ao nascimento do probando, hígida.

Gemelar A, probando, com alteração estrutural cromossômica aparentemente equilibrada “de novo” com ADNPM e dismorfias.

Gemelar B hígido, 46, XY (inv)(9)

Exame Físico:**3. Antropometria (13 anos):**

Estatura: 144,5 cm (p10)

Peso: 30,7 kg (<p3)

PC: 53 cm (p25/50)

IC: 0,8

4. Exame Dismorfológico: Crânio braquicefálico, Face plana e triangular, hemangioma plano em glabella, raiz nasal alta e larga, estrabismo convergente à esquerda, hipoplasia de face média, boca pequena e palato alto, pescoço longo, frouxidão articular, hipotrofia, criptorquidia à direita.

Exames Complementares:

5. RNM de crânio: Normal

6. Ecocardiograma: Normal

7. Cariotipo: 46, XY,t(3;8)(q13.2;p21)

8. US de abdômen: Normal

Paciente 9: MSS - 0837986A

Identificação: MSS, 16 anos, natural e procedente de Viradouro (SP)

História Médica Atual: Encaminhada para avaliação aos 2 anos 6 meses por ortopedia de cidade local por ADNPM e dismorfias que lembravam Síndrome de Down.

História Pré-Natal: Gestação com retardo de Crescimento Intrauterino (RCIU) e oligoâmnio. Permaneceu internada por 2 meses para ganhar peso na gestação. Evoluiu com doença hipertensiva da gestação (DHEG) e passou a usar metildopa. Sorologias negativas. No fim da gestação detectado sofrimento fetal agudo.

História Obstétrica: Mãe G2P2A0, RNPCAT, Pn: 1500g (<p3); C: 42 cm (< p3); PC: 30cm (<p10), demorou para chorar. Permaneceu 2 meses internada

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: andou com mais de 2 anos

História Patológica Progressiva: Refluxo gastroesofágico

História Familiar: Pais não consanguíneos

B1, 21 anos ao nascimento da probanda

C1, 27 anos ao nascimento da probanda, Deficiência Intelectual leve (histórico de ADNPM + crises convulsivas)

A1, probanda, portadora de alteração estrutural cromossômica aparentemente equilibrada “de novo” (translocação 2;16) com deficiência intelectual

A2, hígido

C2, óbito aos 4 meses e histórico de crises convulsivas

Exame Físico:

1. Antropometria (2 anos 6 meses):

Comprimento: 84cm (p3-10)

Peso: 10,93 kg (p3-10)

PC: 46 cm (-2dp)

IC: 0,92

2. Exame Dismorfológico: Microbraquicefalia, frontal amplo, perfil facial achatado, hipoplasia de face média, FPO para cima, epicanto invertido, raiz nasal baixa, boca em carpa, palato estreito, incisivo central mal posicionado, clinobraquidactilia de 5° QRDs, 3° PDQ curtos e pés valgos.

Exames Complementares:

Cariótipo: 46,XX,t(2;16)(p16;q24)

Paciente 10: ICM (Serviço de Genética Médica UFTM)

Identificação: ICM, 10 anos, feminino, natural e procedente de Uberaba (MG).

Hipótese Diagnóstica: Alteração estrutural cromossômica aparentemente equilibrada - 46,XX,t(X;4)(q21;q32). Apresentando atraso na fala e deficiência intelectual.

História Médica Atual: Escolar encaminhada para avaliação no serviço de Genética Médica do Hospital da Universidade Federal do Triângulo Mineiro UFTM aos 5 anos para avaliação por atraso de desenvolvimento e fala e deficiência intelectual. Com 2 anos de idade, a mãe percebeu atraso de fala e procurou atendimento com pediatra que solicitou alguns exames como audiometria e Ressonância Magnética de Encéfalo (RNM) que foram normais. Foi então encaminhada para avaliação fonoaudiológica e aos 4 anos avaliada por neurologista que a encaminhou para APAE. Durante avaliação genético-clínica, observadas dismorfias discretas e solicitados exames complementares. Evolução com discreta melhora da linguagem.

História Pré-Natal: Mãe nega qualquer intercorrência pré-natal, negou tabagismo e etilismo.

História Obstétrica: Mãe G3P3A0, RNPCAT, Pn: 4220g (>p90); C: 53cm (>p90); PC: 36cm (p90) Nasceu sem intercorrências recebendo alta em dois dias.

Teste do Pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Desempenho motor adequado para idade. Atraso da linguagem (primeiras palavras com mais de 2 anos e meio).

História Patológica Progressiva: Várias infecções de via aérea superior (IVAS) na infância; descrição de transtorno comportamental (agitação psicomotora).

História Familiar: Casal não consanguíneo

B1, 28 anos ao nascimento da probanda, hígado cariótipo - 46,XY

C1, Gilza, 39 anos ao nascimento da probanda, - cariótipo 46,XX

A1, probanda

Exame Físico:

1. **Antropometria** (5 anos 4 meses):

Estatura: 118,5 cm (p90-97)

Peso: 32,4 kg (p90)

PC: 53,5 cm (p50-98)

Índice Cefálico: 0,87

2. **Exame Dismorfológico:** Crânio turricefálico; estreitamento bitemporal, implantação alta de cabelo, palato ogival, narinas antevertidas, incisivos centrais grandes, dentes com má oclusão, discreta frouxidão articular.

Exames:

1. RNM de encéfalo: Normal
2. Audiometria: Normal
3. Teste de triagem de Erros Inatos do metabolismo: Normal

Paciente 11: DGF - 07058771

Identificação: DGF, 12 anos e 10 meses, natural e procedente de Matão (SP)

História Médica Atual: Encaminhado da urologia de Hospital Externo por genitália ambígua (criptorquidia bilateral, hipospádia penoescrotal e bolsa escrotal hipoplásica porém, hiperpigmentada e enrugada) além da descrição de um episódio de proteinúria. Foi submetido à laparotomia exploradora com orquidopexia à esquerda em 2006 e à direita em 2007 com correção da hipospádia em 2008. Evoluiu com desempenho neuropsicomotor normal.

História Pré-Natal: Sem intercorrências

História Obstétrica: Mãe G2P2A0, RNPCAT, Pn 3315g (p75/90), C 47 cm (p25/50)

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Normal

História Patológica Progressiva: Tratamento cirúrgico da genitália ambígua

História Familiar: Pais não consanguíneos

B1, desconhecido (paciente não sabe que pai adotivo não é o pai biológico)

C1, Hígida 46,XX

A2, feminino, hígida

Exame Físico:

1. **Antropometria** (9 anos 2 meses):

Comprimento: 133cm (p50)

Peso: 37 kg

PC: 52 cm (25-50)

2. **Exame Dismorfológico:** Sem dismorfias significativas (frontal amplo, lábio superior fino, filtro nasolabial discretamente apagado). ID: síndrome de Dennys-Drash like

Exames Complementares:

1. Cariótipo: 46,XY,t(1;11)(q31;p13)
2. Cariótipo materno: 46, XX. Cariótipo paterno: não foi possível coleta de amostra, pai não disponível.
3. US de vias urinárias: Normal
4. US de abdome: Normal

Paciente 12: ALCB - 1025932G

Identificação: ALCB, 16 anos, natural e procedente de Ibitinga

História Médica Atual: Mãe referiu que aos 7 anos de idade notou que a mesma não apresentava progressão escolar, comportamento infantilizado e alguns maneirismos. Foi então encaminhada para avaliação da Neurologia Infantil do HCFMRP e deste, encaminhada aos 15 anos para avaliação no Serviço de Genética Médica por deficiência intelectual.

História Pré-Natal: sem intercorrências

História Obstétrica: Mãe G2P2C2A0, RNPCAT, cesárea por não progressão de trabalho de parto, Pn: 3200g (p50/75); C: 51 cm (p75/90); Alta em 1 dia da maternidade.

Teste do pezinho: Normal

Desenvolvimento Neuropsicomotor: Adequado para idade

História Patológica Progressiva: ndn

História Familiar: Pais não consanguíneos

B1, 30 anos ao nascimento da probanda, 46,XY

C1, 21 anos ao nascimento da probanda, faleceu em decorrência de H1N1

Meio irmão materno

Exame Físico:**1. Antropometria (15 anos 8 meses):**

Estatura: 154,5cm (p10)

Peso: 53,2 kg (p)

PC: 55 cm (p50)

2. Exame Dismorfológico: Frontal amplo, raiz nasal alta, filtro nasolabial longo e bem marcado, lábios finos, incisivos centrais proeminentes, palato alto e estreito, assimetria de tórax com mama direita maior que esquerda, pectus excavatum discreto, camptodactilia, prova punho polegar positiva, frouxidão ligamentar, valgismo cubital escoliose, orelhas rodadas posteriormente com hipoplasia de lóbulo, braquidactilia de 5° QRD e 4° e 5° PDQ, pés planos.**Exames Complementares:**

1. RNM de crânio (2011): Normal

2. TEIM: Normal

3. Cariótipo: 46,XX,t(2;11)

4. RX de tórax: assimetria torácica

5. Ecocardiograma: Coração posicionado em mesocárdio

**Paper a ser submetido para a revista “Cytogenetics and Genome Research”
Anexo IV**

Case Report

**13.05 Mb Xp22.33-22.13 duplication in a patient carrying a recombinant
chromosome X arisen from an inherited intrachromosomal insertion**

Tatiana Mozer Joaquim¹, Scott Roy², Clarissa Gondim Picanço de Albuquerque^{1,3},
Luissa Hikari Hayashi Araujo^{1,3}, Jeremy Andrew Squire¹, Maisa Yoshimoto², Lucia
Martelli^{1,3}

¹ Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo,
Ribeirão Preto, Avenida dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil -14049-900

² Medical Genetics Department, University of Alberta Hospital, 8440 112 St NW,
Edmonton AB, Canada - T6G 2B7

³ Medical Genetics Section, Clinical Hospital of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto Medical
School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Avenida dos Bandeirantes, 3900,
Ribeirão Preto, SP, Brazil -14049-900

Short Title: Xp22.33-22.13 duplication resulting from an intrachromosomal insertion
maternally inherited

*Corresponding Author

Full name: Lucia Regina Martelli

Department: Genetics

University/Hospital: Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo

Street Name & Number: Av. dos Bandeirantes 3900

City, State, Postal code, Country: Ribeirão Preto, SP, Brazil -14049-900

Tel: +55 16 3315-3102

E-mail: lrmartel@fmrp.usp.br

Keywords: aCGH; Genotype-phenotype correlation, Intrachromosomal insertion; Chromosome X, Xp duplication.

Abstract

Insertions are structural chromosomal rearrangements resulting from three break events. The risk of chromosome imbalances in the offspring can vary from 15 to 50%. In this case report, we describe a patient carrying a recombinant chromosome X arisen from a pericentric intrachromosomal insertion maternally inherited. The proband was referred for clinical evaluation of developmental delay, intellectual disability, behavioral disorder, and dysmorphic facial features. He was found to have a 13.05 Mb interstitial duplication of Xp22.33-p22.13 that was inserted at Xq26.1. The duplication harbors 99 genes; several of them have already correlated with X-linked intellectual disability and or neurodevelopmental disorders by mutations or loss of function. Due to the large size of the Xp duplication, it is difficult to correlate the phenotype of our patient with a specific gene. Indeed, we suggest that the synergistic action of several of the genes may be contributing to the clinical findings. Furthermore, other genetic mechanisms such as position effects leading to facultative inactivation of adjacent genes by the duplicated Xp region may be a consideration.

Introduction

Structural chromosomal rearrangements are the result of breakage, followed by reconstitution of the broken chromosomal regions as an abnormal combination. Insertions are structural alterations that occur when a single chromosome breaks in two places, and a piece of the chromosome is reinserted into another non-homologous chromosome (interchromosomal insertion) or a different location of the same chromosome (intrachromosomal insertion). Since these rearrangements require at least three break events, they are classified as complex chromosomal rearrangements (CCR) [Kang et al., 2010].

The rate of insertions was previously considered to be a relatively rare event when determined solely by cytogenetic approaches. The incidence was estimated to be about 1 in 80.000 live births [Van Hemel and Eussen 2000]. However, more recently, with the increased genomic resolution afforded by array comparative genomic

hybridization (aCGH), the number of detected insertions has been demonstrated to be much higher, with an estimated incidence of 1 in 500 individuals tested [Kang et al., 2010].

The phenotypic consequences of insertions may vary depending on their size, gene content, and the orientation of the inserted fragment [Gu et al., 2016]. Also, the derivative chromosome formed after the insertion can affect the gene function and consequently result in an abnormal phenotype by several different ways such as increased gene expression due to the presence of one or more genes at the duplicated segment; either loss or gain of function by disruption, deletion or duplication of genes located at the breakpoint regions; or even abnormal gene expression due to position effect [Kang et al., 2010].

Balanced insertions carriers generally have a normal phenotype, except when the breakpoint interrupts a gene with a dominant effect [Higgins et al., 2008]. The risk of chromosome imbalances in the offspring can vary from 15 to 50% [Madan and Menko 1992]. For interchromosomal insertions, unbalanced products are mostly caused by segregation anomalies. In contrast, abnormal offspring in intrachromosomal insertion carriers are associated only with recombinant chromosomes [Blanchard et al., 2014].

We describe the genotype and phenotypic effects of a patient with 13.05 Mb interstitial duplication of Xp22.33-p22.13 that arose from a maternal balanced intrachromosomal insertion. The proband carrying a recombinant X chromosome was referred for clinical genetic evaluation due to developmental delay, intellectual disability, behavioral disorders, and mild dysmorphic facial features.

Case Presentation

The proband, a 20 years-old boy was referred for the clinical genetic evaluation due to global development delay (including speech delay- first words at 3), intellectual disability and behavioral disorder such as hyperactivity and aggressiveness. He was the first child of non-consanguineous young parents (mother 21 years-old, father 24 years-old). Pregnancy and birth were uneventful and the child was delivered by normal birth. His birth parameters were: weight 3.7 kg (p50-p75), length 49.5 cm (p25-p50). On his first physical examination at 7-years-old, his weight was 30.4 kg (p95), length was 117 cm (p25-50), and head circumference was 51 cm (p50). Dysmorphic facial features

included narrow forehead, hypertelorism and telecanthus, down-slit palpebral fissures, epicanthic folds, broad nose, short philtrum and thin superior lip. Single palm fold on the right hand and bilateral clinodactyly were also noticed (Fig. 1A, B). Brain CT and MRI were normal.

Methods

Chromosomal analysis of the patient and his mother was performed in peripheral blood samples using the GTG-banding technique at an approximately 550 band level. Karyotype description followed the recommendations of the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [ISCN, 2016]. Array-CGH study was performed in the proband using Agilent Array Kit, 2x400K according to manufacturer's recommendations. Data were analyzed by the Ogt software (CytoSure, USA) using hg19/GRCh37 as reference. FISH for aCGH validation was carried out using the BAC clone RP11-484B13 (Xp22.31) SpectrumOrange in association with the commercial centromeric X probe (LPE 0XG-SpectrumGreen - Cytocell, UK) following standard procedures. The BAC clone was selected on the public database UCSC Genome Browser. M-band analysis of chromosome X was performed in both, the patient and his mother, using the human mband probe Xcyte X (Metasystems, Germany). Metaphase slides were analyzed with an epifluorescent microscope and images were captured using Isis software (Metasystems, Germany).

Results

The karyotype of the proband was initially described as 46,XY,inv(9)(p13q21) (Fig. 1C). His mother with normal phenotype was also evaluated and her initial karyotype was 46,XX,inv(X)p22.1,inv(9)(p13q21) (Fig. 1D). Paternal karyotype was normal.

Cytogenomic analysis by aCGH technique revealed that the proband was a carrier of a 13.05 Mb duplication located on chromosome X (Xp22.33Xp22.12) defined as: arr[hg19] Xp22.33p22.13(4220086-17269548)x2 (Fig. 2A). The chromosomal abnormality detected by aCGH encompasses 99 genes of which, 14 are reported in OMIM database as disease causative genes (*NLGN4*, *STS*, *KALI*, *GPR143*, *CLCN4*, *MIDI1*, *HCCS*, *AMELX*, *FMRPD4*, *TRAPPCE*, *OFD1*, *FANCEB*, *PIGA*, *APIS2*).

FISH evaluation using the BAC clone (RP11-484B13 – Xp22.31) performed in the patient and his mother (Fig. 2B,C), revealed that the patient duplication was located

at the terminal portion of the long arm of chromosome X (Xq) (Fig. 2B). The FISH studies also suggested that the Xp duplication was the consequence of a balanced insertion inherited from his mother, rather than an inversion as initially described (Fig. 2C).

The M-band analysis confirmed the occurrence of the intrachromosomal pericentric insertion of the bands Xp22.33-Xp22.13 at Xq26.1 for both the proband and his mother (balanced insertion carrier) (Fig. 3).

The G-banded karyotype of the proband was thus redefined to be 46,XY,rec(X)dup(Xp)ins(X)(q26.1p22.33p22.13)mat whereas the maternal karyotype was reported as 46,XX,ins(X)(q26.1p22.33p22.13).

Discussion

We report a patient with a 13.05 Mb duplication of the region Xp22.33-p22.13 linked to the presence of a balanced intrachromosomal pericentric Xp insertion detected in the proband's healthy mother. The imbalance is carried by a recombinant X chromosome resulting from meiotic crossing-over between the displaced chromosomal segment and its normally located counterpart. In this process the pairing of homologous segments may be achieved by the formation of a double loop. If the crossing-over occurs in the loop formed by the non-inserted segment, unbalanced recombinants with a deletion or a duplication of the inserted segment are produced. This is the most frequent possibility and the one we see in our patient. On the other hand, a single crossing-over in the loop formed by the inserted segment, would produce recombinants with either deletions or duplications of the non-inserted segment [Madan and Menko, 1992]. Outside the loops, crossing-overs produce normal or inserted balanced chromosomes.

Intrachromosomal insertions may be challenging to distinguish from inversions. According to Madan and Nieuwint [2002], after a careful revision of 13 cases of recombinant chromosomes firstly diagnosed as arisen from parental inversions, only two or three were correctly identified. Of the remaining ten cases, at least six could have their mechanisms of origin much more readily explained by interpreting the parental rearrangement as an insertion instead of an inversion. In our case, the karyotype of the proband's mother was first described as a paracentric inversion of chromosome X (46,XX,inv(X)p22.1,inv(9)(p13q21)). By routine cytogenetic analysis, the abnormal chromosome X was not identified in the proband. Further analyses combining FISH and aCGH suggested that both mother and the proband were carriers

of an intrachromosomal Xp pericentric insertion. These findings were confirmed by m-banding analysis (Fig. 3). The situation reported here shows the importance of parental studies by cytogenetics methods (karyotype and FISH) for genetic counseling. Since these techniques currently used as confirmation methods, can be the only way to identify the mechanisms and to estimate the recurrence risks for certain unbalances reported by aCGH, their use cannot be minimized.

Duplications on chromosome X overlapping the region Xp22.33-Xp22.13 are not uncommon. The DECIPHER database harbors approximately 400 patients overlapping this duplicated region, ranging in size from 2 Kb to 155 Mb. However, according to Lintas et al. [2015], many of them, especially those with larger duplications, are described with some other chromosomal imbalances and, therefore, can not be directly compared with patients carrying only the Xp22.33-Xp22.13 duplication.

The phenotype described in patients with a gain overlapping the cytobands cited above mainly includes global neurodevelopmental and speech delay, intellectual disability, autism spectrum disorder (ASD), epilepsy, short stature and dysmorphism [Mohamed et al., 2018]. A correlation between the size of the duplications previously reported and the severity of the clinical features could not be established, suggesting that the gene content of each alteration may have an important influence under the phenotype, rather than the size.

The Xp duplication spanning 13.05 Mb observed in our patient harbors 99 genes. Although it is known that single nucleotide mutations and or deletions of some of these genes may be associated with neurodevelopmental disorders (*NLGN4*; *OFD1*; *APIS2*) or may play an essential role in the nervous system (*FRMPD4*; *SYAP1*; *GLRA2*), the clinical impact of the overexpression of the genes presented in this region remains unclear [Lintas et al., 2015].

While hard to establish a correlation between the duplication of single genes and our patient's phenotype, there are several reports in the literature associating the Xp duplication with abnormal phenotype [Honda et al., 2010, Salaria et al., 2012, Lintas et al 2015, Mohamed et al., 2018]. Sismani et al. [2011] described a family with syndromic X-linked intellectual disability caused by a 9 Mb Xp22.2-22.13 duplication. The phenotype of the affected carriers includes intellectual disability, developmental delay, cardiovascular problems and mild dysmorphic facial features. Even small gains diagnosed in the short arm of chromosome X have been reported as causative of

abnormal phenotypes. Esplin et al. [2014] described nine patients with Xp22.31 microduplication and clinical features as developmental delay and or intellectual disability, talipes anomalies, seizures, feeding difficulties, ASD, and hypotonia. The authors suggest that the Xp22.31 microduplications may contribute to the observed common phenotypic effects.

Previous studies have provided evidence that other genomic mechanisms as gene disruption or position effect, rather than copy number imbalances, can contribute to the presence of abnormal phenotype even in patients diagnosed with duplications or deletions of specific genes [Sun et al., 2009; Kim et al., 2010; Fonseca et al., 2013; Aristidou et al., 2017]. DeStefano et al. [2013] described a patient carrying a 389 kb interchromosomal insertion in a family with X-linked congenital generalized hypertrichosis. The authors suggested that the presence of the chromosomal rearrangement rather than the content of the insertion that occurred in an extragenic palindromic sequence at Xq27.1 may have changed the expression patterns of the gene *FGF13* leading to the phenotype observed in the affected patients.

Moreover, the X chromosome inactivation patterns may also contribute to the abnormal phenotypes described in patients with X rearrangements. According to the literature, about 21% of the genes contained on the chromosome X typically escape from X-inactivation and several of them are located on the short arm [Carrel et al., 1999; Brown and Greally, 2003]. The ‘Lyon hypothesis’ postulates that females with X chromosomal duplications are generally less severely impaired than males [White et al., 1998]. However, females with anomalies in the X chromosome inactivation may show severe intellectual disability, developmental delay, dysmorphic facial features and heart defects [Migeon et al., 1993]. The phenotype described in these females somehow resembles our patient.

Due to the large size of the Xp duplication presented in our case, it is not possible to identify any specific genes or sets of genes responsible for a characteristic phenotype. Rather, the synergistic action of some of the 99 genes presented in this duplication could be contributing to the clinical findings. Furthermore, other genetic mechanisms such as position effect and X-inactivation may be involved. For more clarifications, these two last mechanisms should be investigated using genome-wide transcriptomic approaches.

Statements

Acknowledgements

We thank the patient and his mother for their cooperation and Lucimar Aparecida Fernandes Laureano and the Cytogenetics' laboratory team of the University of Alberta Hospital for their technical assistance.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethic Committee for research involving human subjects at the Ribeirão Preto Clinical Hospital of the University of São Paulo (HCRP: 74/91/2015). Written informed consent was obtained from the parents for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the corresponding author.

Disclosure statements

None of the authors have any conflict of interest to disclose.

Funding sources

This work was funded by CAPES – Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, CNPq – Council for Scientific and Technological Development and FAEPA – Foundation for Education, Research and Assistance Support of the University Hospital of the Ribeirão Preto Medical School – USP.

Author contributions

All authors made substantive intellectual contributions to the study. All authors read and approved the final version of the manuscript. Author contributions are: TMJ participated in the design of the study, performed and analyzed FISH, M-band and Array-CGH data, drafted the manuscript, and finalized it. SR participated in the perform and analysis of the Array CGH data and FISH probe design. CGPA and LHHA acquired and interpreted clinical data. JAS participated in data analysis and helped with writing the manuscript. MY and LM conceived the study, participated in its design and coordination, drafted the manuscript and finalized it.

References

Aristidou C, Koufaris C, Theodosiou A, Bak M, Mehrjouy MM, et al: Accurate Breakpoint Mapping in Apparently Balanced Translocation Families with Discordant Phenotypes Using Whole Genome Mate-Pair Sequencing. *PLoS ONE* 12:1-18 (2017).

Blanchard M, Dubourg C, Pasquier L, Odent S, Lucas J, et al: Postnatal diagnosis of 9q interstitial imbalances involving PTCH1, resulting from a familial intrachromosomal insertion. *Eur J Med Genet* 57:195-199 (2014).

Brown CJ, Greally JM: A stain upon the silence: Genes escaping X inactivation. *Trends Genet* 19:432–438 (2003).

Carrel L, Willard HF: X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400–404 (2005).

DeStefano GM, Fantauzzo KA, Petukhova L, Kurban M, Tadin- Strapps M, et al: Position effect on FGF13 associated with X-linked congenital generalized hypertrichosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:7790–7795 (2013).

Esplin ED, Li B, Slavotinek A, Novelli A, Battaglia A, et al: Nine patients with Xp22.31 microduplication, cognitive deficits, seizures, and talipes anomalies. *Am J Med Genet A* 164A:2097-2103 (2014).

Fonseca ACS, Bonaldi A, Bertola DR, Kim CA, Otto PA, et al: The clinical impact of chromosomal rearrangements with breakpoints upstream of the SOX9 gene: two novel de novo balanced translocations associated with acampomelic campomelic dysplasia. *BMC Med Genet* 14:2-10 (2013).

Gu S, Szafranski P, Akdemir ZC, Yuan B, Cooper ML, et al: Mechanisms for Complex Chromosomal Insertions. *PLoS Genet* 12:1-21 (2016).

Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GA, et al: Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am J Hum Genet* 82:712-722 (2008).

Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, et al: Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *J Hum Genet* 55:590–599 (2010).

ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature; McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds). *Cytogenet Genome Res* 149: 1–140 (2016).

Kang SH, Shaw C, Ou Z, Eng PA, Cooper ML, et al: Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am J Med Genet A* 152:1111-1126 (2010).

Kim J, Lee G, Choi JR, Kurban M, Christiano AM, et al: Ambras syndrome in a Korean patient with balanced pericentric inversion (8)(p11.2q24.2). *J Dermatol Sci* 59:204–206 (2010).

Lintas C, Picinelli C, Piras IS, Sacco R, Gabriele S, et al: Xp22.33p22.12 duplication in a patient with intellectual disability and dysmorphic facial features. *Mol Syndromol* 6: 236–241 (2015).

Madan K, Menko FH. Intrachromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet* 89:1-9 (1992).

Madan K, Nieuwint AW. Reproductive risks for paracentric inversion heterozygotes: Inversion or insertion? That is the question. *Am J Med Genet* 107:340-343 (2002).

Migeon BR, Luo S, Stasiowski BA, Jani M, Axel- man J, et al: Deficient transcription of XIST from tiny ring X chromosomes in females with severe phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:12025–12029 (1993).

Mohamed AM, Zaki MS, Kamel AK, Issa MY, Mekkawy M, et al: Unbalanced 14;X Translocation and patten of X inactivation in a female patient with multiple congenital anomalies. *Cytogenet Genome Res* 156:1-9 (2018).

Salaria M, Burgess T, Setyapranata S, Winship I: Phenotype in novel Xp duplication. *Am J Med Genet A* 158A:2342–2346 (2012).

Sismani C, Anastasiadou V, Kousoulidou L, Parkel S, Koumbaris G, et al: 9 Mb famíliar duplication in chromosome band Xp22.2-22.13 associated with mental retardation, hypotonia and developmental delay, scoliosis, cardiovascular problems and mild dysmorphic facial features. *Eur J Med Genet* 54:510-515 (2011).

Sun M, Li N, Dong W, Chen Z, Liu K, et al: Copy-number mutations on chromosome 17q24.2-q24.3 in congenital generalized hypertrichosis terminalis with or without gingival hyperplasia. *Am J Hum Genet* 84:807–813 (2009).

Van Hemel JO, Eussen HJ. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet.*; 107:415-432 (2000).

White WM, Willard HF, Van Dyke DL, Wolff DJ. The spreading of X inactivation into autosomal material of an X:autosome translocation: evidence for a difference between autosomal and X-chromosomal DNA. *Am J Hum Genet* 63:20-28 (1998).

Figure and legends

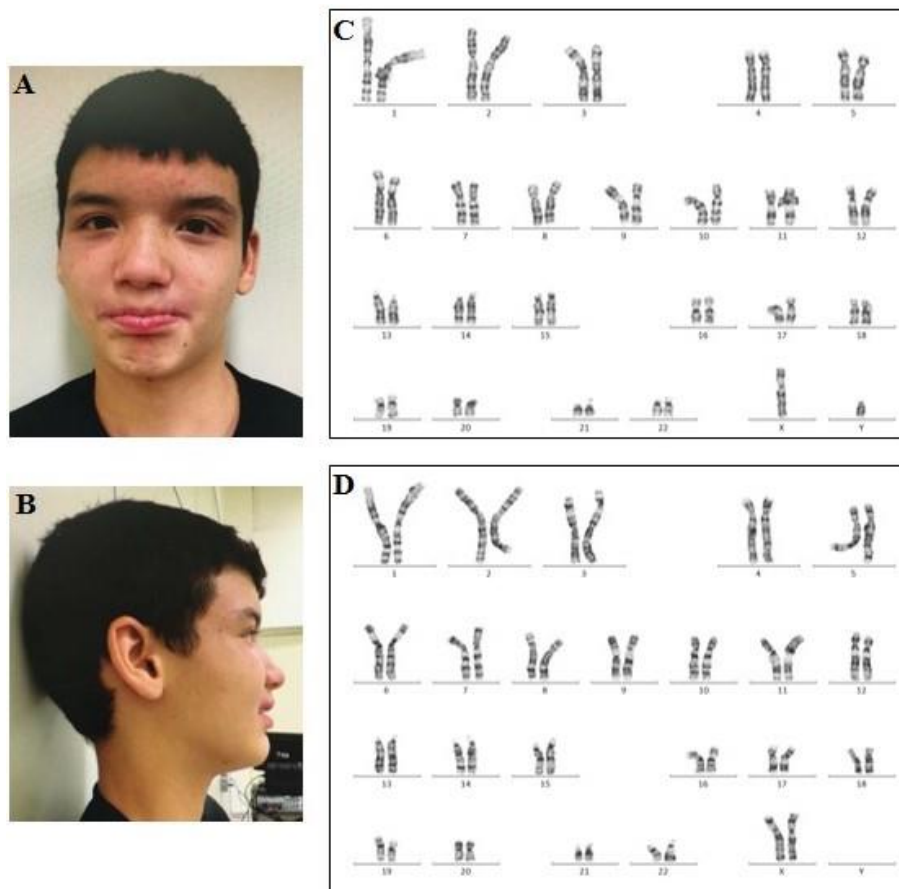


Figure 1: Proband facial features and karyotype analysis
Proband facial features and karyotype analysis. (A,B) Craniofacial anomalies of the proband showing narrow forehead, hypertelorism, telecanthus, down slit palpebral fissures, epicanthic folds, broad nose, short philtrum and thin superior lip. (C) G-banded karyotype of the proband showing the inversion of chromosome 9. (D) G-banded karyotype of the mother of the proband showing the inverted chromosomes X and 9.

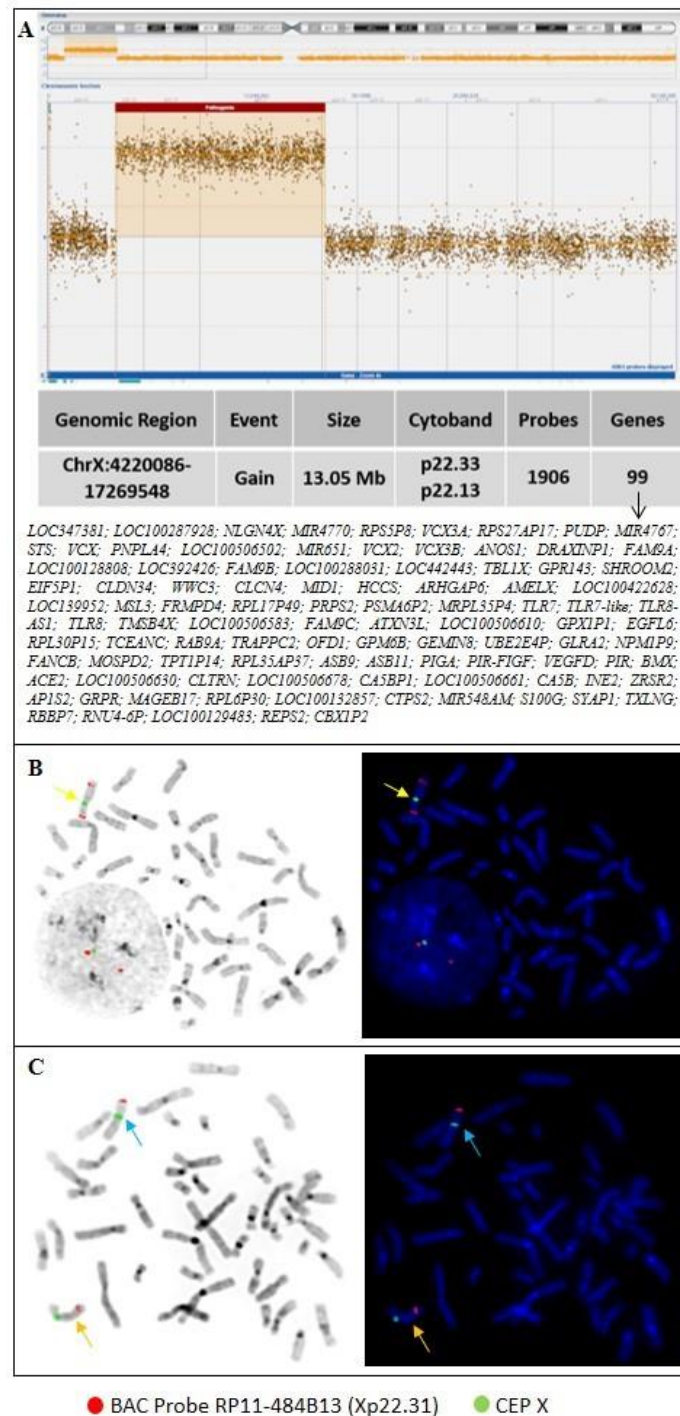


Figure 2: Array-CGH results and FISH validation. (A) Shows the 13.05 Mb interstitial X duplication detected in the proband. The alteration harbors 99 genes. (B-C) Metaphase FISH analyzes of the proband and his mother (balanced insertion carrier). FISH was carried out using the BAC Probe RP11-484B13 (Red signal) in association with the centromeric probe of chromosome X (CEP X- Green signal) as control. (B) Proband FISH analysis showing the recombinant chromosome X with two red signals (yellow arrow). The signal located at the long arm of chromosome X (Xq) refers to the region Xp22.31 insertion occurred. (C) FISH analysis of the mother of the proband, showing the normal chromosome X (blue arrow) and the derivative chromosome X mapping the insertion of Xp22.31 on Xq (Orange arrow).

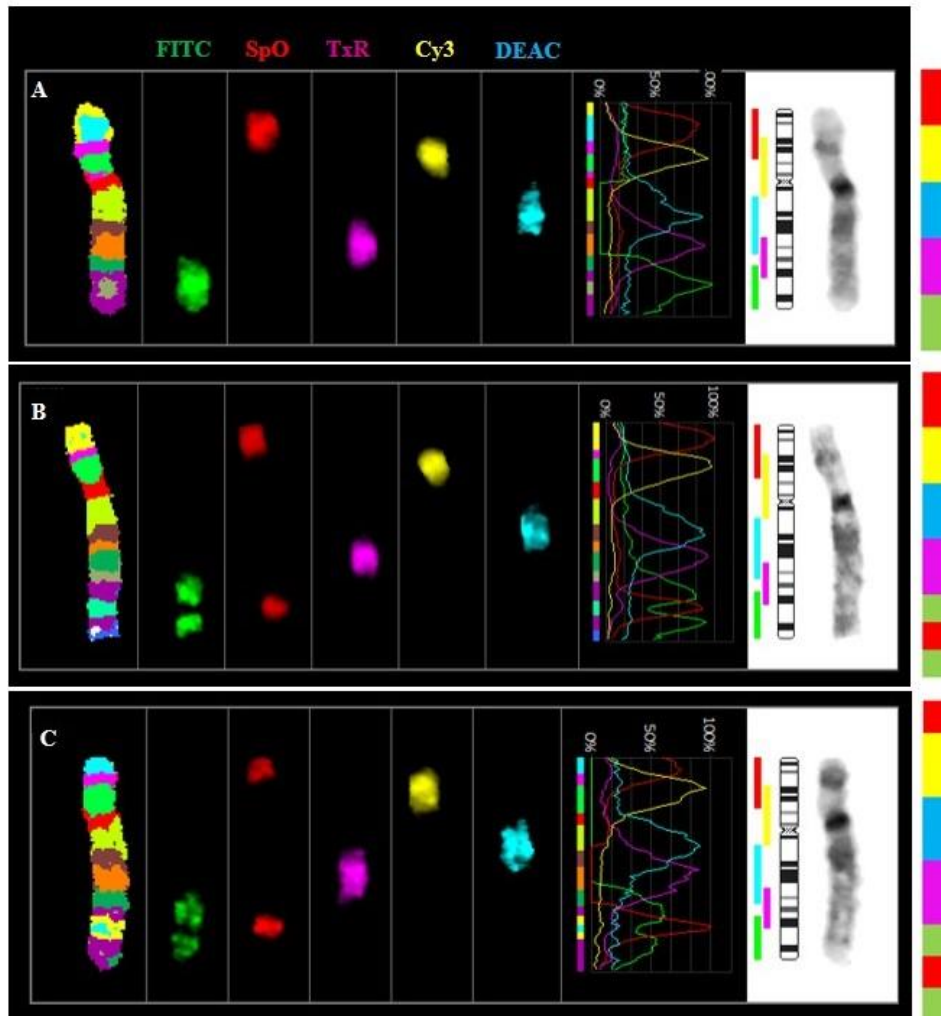


Figure 3: M-band analysis confirming the occurrence of the intrachromosomal pericentric X insertion in the proband and his mother (balanced insertion carrier). (A) Color patterns of the normal chromosome X using the multi-color band probe (Xcyte X Metasystems, Germany). (B) Recombinant chromosome X of the proband showing the duplicated region (red signal) inserted between the two green signals at Xq26.1. (C) Chromosome X of the mother of the proband showing the balanced rearrangement where half of the red signal is inserted at Xq26.1 between the two green signals.

Partial Monosomy 4p and Trisomy 12q due to a t(4;12)(p16.3;q24.31) Familial Translocation in Two Cousins

Tatiana Mozer Joaquim^a Carlos H. Paiva Grangeiro^{a, b}
Flávia Gaona de Oliveira Gennaro^a Alexandra Galvão Gomes^a
Jeremy A. Squire^{a, c} Lucia R. Martelli^{a, b}

^aDepartment of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^bMedical Genetics Section, Clinical Hospital of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^cDepartment of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, Canada

Keywords

Chromosomal translocation · Comparative genomic hybridization · Genotype-phenotype association · Partial monosomy 4p16 · Partial trisomy 12q · Wolf-Hirschhorn syndrome

Abstract

Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) is caused by a distal 4p monosomy usually involving the region of the *WHSC1* and *WHSC2* genes. About 40–45% of WHS patients show an unbalanced translocation leading to both 4p monosomy and partial trisomy of another chromosome arm. In this case report, we describe 2 female cousins (P1 and P2) with a derivative chromosome leading to a 4p16.3pter deletion and 12q24.31qter duplication. Conventional karyotyping and genomic analyses showed that they both had the same rearrangement derived from a balanced parental translocation involving chromosomes 4 and 12, t(4;12)(p16.3;q24.31). The rearrangements occurred between 4p16.3pter and 12q24.31qter detected by array-CGH analysis, with a 2.7-Mb loss at 4p and a large 12.4-Mb gain at 12q. Both affected patients shared global developmental delay and craniofacial

dysmorphisms with some distinct phenotypic findings associated with both WHS and 12qter trisomy. P2 was more severely impaired than P1, and she showed severe intellectual disability, seizures, midface hypoplasia, unilateral microtia, and deafness which were absent in P1. Previous studies of distal 4p monosomies have found phenotypic variability in WHS which does not correlate with haploinsufficiency of specific genes. Features of 12q trisomies are diverse with developmental and growth delay, intellectual disability, behavioral problems, and facial abnormalities. Collectively, our analysis of the literature of 3 similar translocations involving 4p and 12q, together with the clinical features of the affected cousins in this familial translocation, permits an evaluation of genes closely linked to *WHSC1* and *WHSC2* in the context of WHS and the genes involved in 12q trisomy.

© 2019 S. Karger AG, Basel

Unbalanced t(4;12) translocations leading to monosomy of distal 4p16 and partial trisomy of 12q are extremely rare with only 3 previous reports in the literature [Melnyk et al., 1981; Tajara et al., 1985; Wilson and Oei, 1998]. In this study, we describe the genomic and clinical

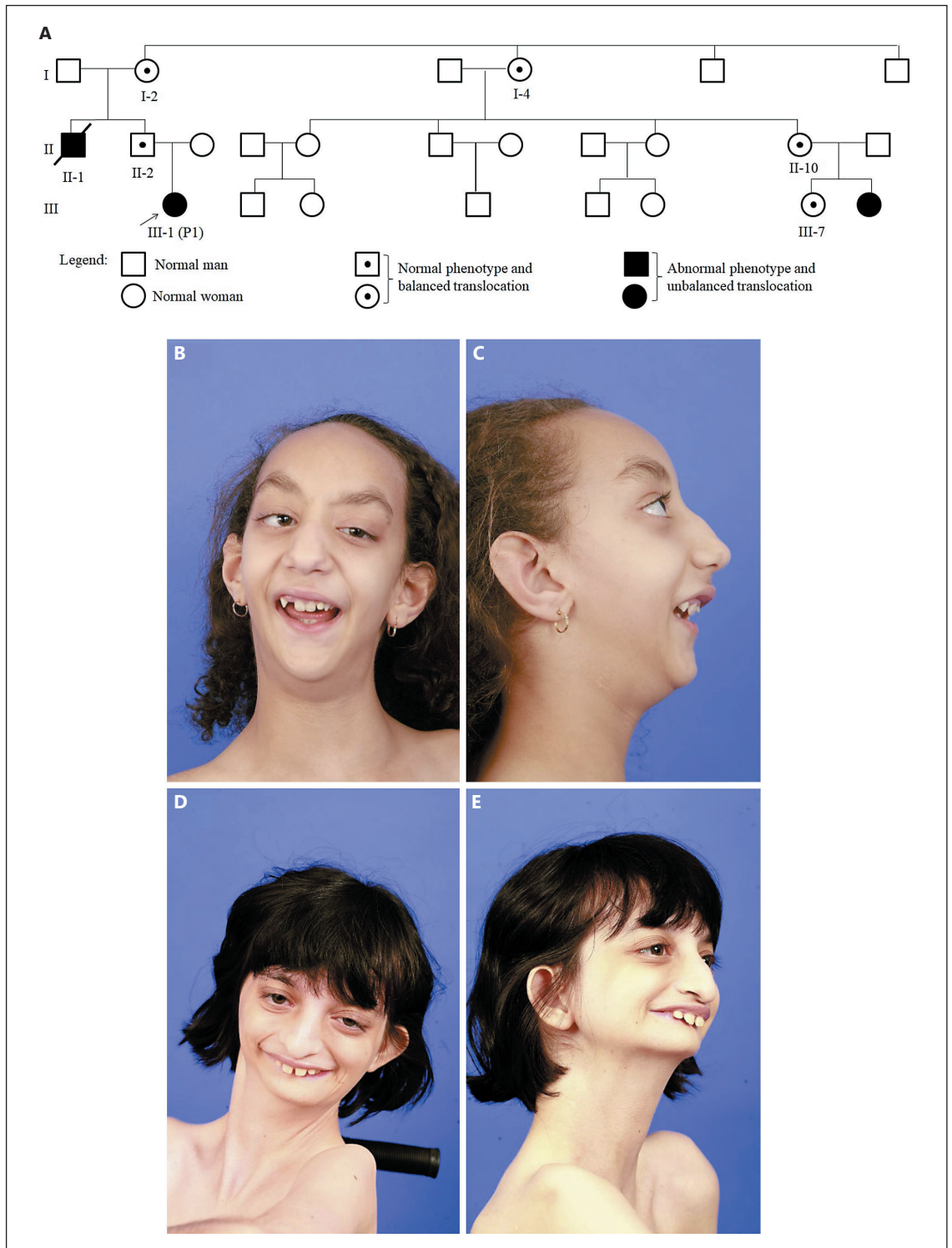


Fig. 1. A Pedigree of the family showing the patients, balanced translocation carriers, and normal individuals. The arrow indicates the index case (P1). All the individuals shown in the pedigree were cytogenetically investigated. FISH and array CGH were also performed on the balanced translocation carriers and affected patients. **B, C** Craniofacial anomalies in P1, showing microcephaly, triangular face, ptosis, strabismus, retrognathia, and dysplastic ears. **D, E** Craniofacial anomalies in P2, showing ocular proptosis, beaked nose, macrostomia, microretrognathia, and prominent left ear.

features of another example of a t(4;12) translocation in 2 cousins who both inherited an unbalanced der(4)t(4;12)(p16.3;q24.31), leading to a combination of partial monosomy 4p and partial trisomy 12q.

Deletions in 4p16 are associated with Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS). The clinical features of WHS include a characteristic facial appearance, delayed growth and development, intellectual disability, hypotonia, and seizures [reviewed in Battaglia et al., 2015]. The genomic size of monosomy 4p16 varies among patients with WHS, and recent studies suggest that larger deletions may lead to more severe features [Corrêa et al., 2018].

Clinical presentations of patients with 12q trisomies may include developmental delay, intellectual disability, behavioral problems, and growth delay, together with distinctive facial features. The severity can also depend on the size, gene content, and the location of the trisomy [Bouman et al., 2013].

In this case report, we describe the clinical and genomic features of patient 1 (P1), a 13-year-old girl, and patient 2 (P2), her 20-year-old female cousin; both carry the same inherited unbalanced chromosomal translocation 46,XX,der(4)t(4;12)(p16.3;q24.31), but each patient has distinct clinical findings. We also compare the phenotypic effects of 3 other similar unbalanced t(4;12) translocation cases that also have monosomy of distal 4p16 and partial trisomy 12q with the clinical findings of our cases P1 and P2.

Patients and Methods

Clinical Reports

We describe 2 related patients with a familial unbalanced translocation of chromosomes 4 and 12 with clinical findings marked by intellectual disability, microcephaly, distinctive facial features, and hearing loss. The index case, P1 was referred to the department for genetic evaluation due to failure to thrive, psychomotor developmental delay, dysmorphic facial features, precocious puberty, and behavioral disorder. An extended analysis of the family revealed no occurrence of miscarriages, but there was a paternal uncle who died at the age of 2 due to unspecified congenital malformations. Our analysis also found that the second cousin (P2) of our index case had some similar phenotypic features (Fig. 1A), prompting a more extensive genetic study of both cases.

Patient 1 is a 13-year-old girl, the only child of nonconsanguineous healthy parents. The pregnancy was unremarkable, and she was born at 38 weeks' gestation by elective C-section with no complications. Her birth weight was 2,500 g (between the 25th and 50th centile), OFC was 31 cm (10th centile), and Apgar scores were 6 and 9. Hypotonia, feeding difficulties, facial dysmorphisms, and cleft palate were observed. Her neuropsychomotor development was globally delayed (she walked within 31 months and spoke her first words when she was 8 years old). A physical

examination was performed when she was 12 years old, which showed microcephaly with moderate intellectual disability and failure to thrive with all parameters <3rd centile (weight: 27.5 kg, height: 140.5 cm, and OFC: 49 cm). Dysmorphic features are detailed in Table 1 (also see Fig. 1B, C). Transthoracic echocardiography revealed an atrial septal defect (3 mm) and brainstem evoked response audiometric testing showed a moderate bilateral sensorineural hearing loss. Abdominal ultrasound and cranial MRI were normal.

Patient 2 is a 20-year-old girl, the second child of nonconsanguineous healthy parents. The pregnancy was unremarkable, and she was born at 38 weeks' gestation. No adverse events in the antenatal period were noticed. Her birth weight was 2,050 g (<3 centile), length 45 cm (10th centile), and OFC was 33 cm (50th centile). She also presented with hypotonia, feeding difficulties, and dysmorphic features. All developmental milestones were more significantly delayed in comparison to P1 (she never walked or was able to speak). Seizures were observed when she was 8 months old. All her current growth parameters are <3rd centile (weight: 19.1 kg, height: 130 cm, and OFC: 45 cm), and her craniofacial dysmorphisms include a characteristic appearance called the "Greek warrior helmet", comprising a high forehead with prominent glabella and a beaked nose that is typical of WHS. The clinical features are detailed in Table 1 (see Fig. 1d, e). Neurological investigation showed temporal lobe epilepsy and tomography of the temporal bone showed atresia of the external auditory canal on the right side with severe bilateral sensorineural hearing loss.

Methods

Cytogenetic analysis of peripheral blood samples was performed according to standard methods. The karyotypes were interpreted according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [ISCN, 2016]. We used LSI probes (Cytocell, UK) specific for the regions 4pter (4p16.3 LPT04PR, SpectrumRed) and 12qter (12q24.33 LPT12QG, SpectrumGreen) according to the manufacturer's instructions. Array CGH was performed on P1, P2, and their relatives (balanced translocation carriers) using Agilent Array Kit, 2x400K according to manufacturer's recommendations. Data were analyzed using Nexus Copy Number version 7.0 software (BioDiscovery, El Segundo, CA, USA). All genomic coordinates for copy number changes are reported using human reference sequence hg19/GRCh37.

Results

Cytogenetic and Cytogenomic Findings

The karyotype analysis revealed that both P1 and P2 carried extra material derived from chromosome 12 on the short arm of chromosome 4. Subsequent cytogenetic analysis performed on their relatives showed that the father of P1 was a carrier of an apparently balanced translocation defined as 46,XY,t(4;12)(p16.3;q24.31). Further cytogenetic studies indicated that the paternal grandmother of P1 and both the sister and the mother of P2 had the same balanced rearrangement, resulting in triso-

Table 1. Clinical features of patients with 4p;12q translocations

	Melnyk et al., 1981	Tajara et al., 1985	Wilson and Oei, 1998	This study	
				P1	P2
Neurological features					
Hypotonia	+	n.d.	n.d.	+	+
Developmental delay	+	+	n.a.	+	+
Intellectual disability	+	+	n.a.	+	+
Seizures	+	+	n.a.	-	+
Behavioral disorder	n.d.	n.d.	n.a.	+	-
Neurosensory deafness	n.d.	n.d.	n.a.	-	+
Craniofacial features					
Microcephaly	+	+	+	+	+
Prominent forehead	+	+	+	+	+
Low-set and/or malformed ears	+	+	+	+	+
Hypertelorism	+	+	+	-	-
Strabismus	n.d.	+	n.d.	+	-
Flat nasal bridge	+	+	+	+	+
Wide mouth with downturned corners	+	+	n.d.	-	+
Cleft palate	-	-	+	+	-
Micrognathia	+	+	+	+	+
Musculoskeletal and limb features					
Single palmar creases	+	+	n.d.	-	-
Clinodactyly	+	+	n.d.	+	+
Hyperextensibility	+	n.d.	n.d.	+	-
Sacrococcygeal anomalies	+	+	-	+	+
Feet deformity	+	+	+	+	+
Subluxation of hips	n.d.	n.d.	+	-	-
Genitourinary anomaly					
	+	+	-	-	-
Cardiovascular anomaly					
	+	-	n.d.	+	-
Other features					
Failure to thrive	+	+	+	+	+
Widely spaced nipples	+	+	+	-	-
Loose skin at nape	-	+	-	-	-
Chromosomal abnormality					
4p deletion	4p16pter	4p16pter	4p15.2pter	4p16.3pter	4p16.3pter
12q duplication	12q24.1qter	12q24.31qter	12q21.3qter	12q24.31qter	12q24.31qter

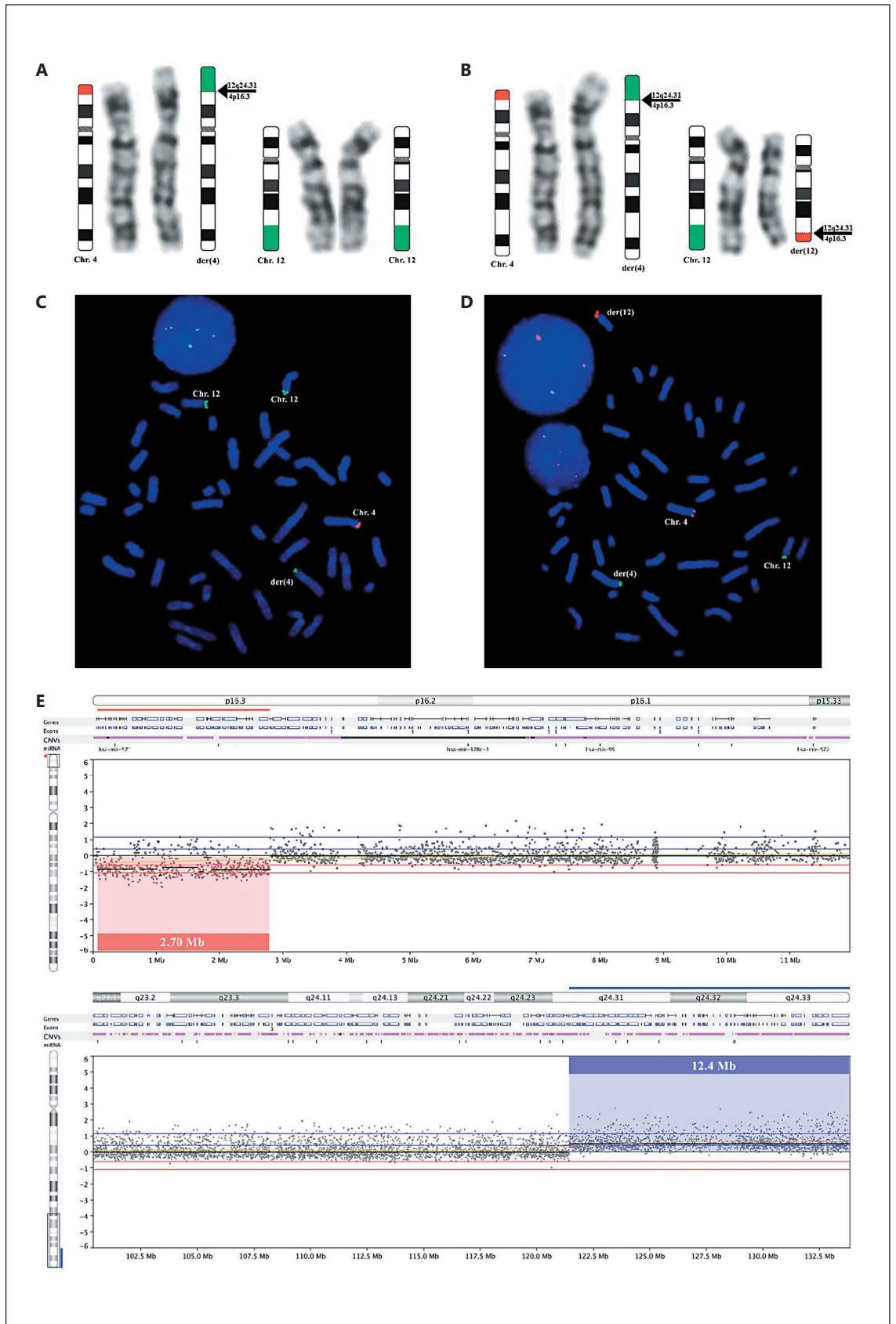
n.a., Not available, patient died 12 h after birth; n.d., not discussed; +, present; -, absent.

my of 12qter for both patients: 46,XX,der(4)t(4;12)(p16.3;q24.31) (Fig. 2A, B).

FISH analysis showed that both patients had a partial monosomy 4p at the 4p16.3 cytoband that had not been detected by G-banding. FISH analysis also showed that the carriers of the balanced translocation with a normal phenotype did not carry a detectable monosomy at 4p (Fig. 2C, D).

Array-CGH analysis showed a partial 4p terminal loss (2.7 Mb) involving 53 genes and a partial 12q gain (12.4

Mb) comprising 139 genes for both patients: defined as arr[GRCh37] 4p16.3(73629_2780849)×1;12q24.31q24.33(121446691_133851895)×3 (Fig. 2E, F). The loss in chromosome 4 comprised the WHS critical region (OMIM 194190) including the *WHCS1*, *WHSC2*, and *LETM1* genes. No evidence of genomic alterations was found in the breakpoint regions of the relatives with apparently balanced translocation.



(For legend see next page.)

Discussion

In this study, we report 2 cousins, both with partial 4p monosomy and 12q trisomy and distinct clinical phenotypes. Analysis of the family suggests that this rearrangement was likely caused by the abnormal chromosome segregation of an inherited parental balanced translocation.

Partial trisomy 12q is a rarely observed chromosomal anomaly. Of the 50 previous cases of partial trisomy 12q, there are 13 that overlap with the same duplicated region present in our patients (12q24.31q24.33) [Zabel and Baumann, 1981; Tajara et al., 1985; Jardine et al., 1993; Rodriguez et al., 2003; Ireland et al., 2004; Lagier-Tourenne et al., 2004; Bao and Schorry 2005; Sathanoori et al., 2007; Semerci et al., 2010]. The sizes of the trisomies in the previous cases vary from 2.3 to 67.9 Mb, with more severe phenotypic effects being reported for more extensive trisomies. The phenotypes typically associated with 12q trisomies are an abnormally shaped skull, hypertelorism, a flat nasal bridge with a downturned or prominent nasal tip, downturned mouth, skeletal and limb abnormalities, sacral dimples, single palmar crease, and occasional brain and heart defects [Bouman et al., 2013]. The duplicated region in both our probands includes 139 genes. Of these genes, 15 are reported in the OMIM database as possibly disease-causing genes (*ORAI1*, *C12orf65*, *SCARB1*, *P2RX2*, *POLE*, *HPD*, *PUS1*, *BCL7A*, *ANKLE2*, *WDR66*, *EIF2B1*, *DIABLO*, *TCTN2*, *VPS33A*, and *ATP6V0A2*). Mutations in *DIABLO* and *P2RX2* are associated with developmental anomalies leading to sensorineural hearing deficits [Cheng et al., 2011; Faletra et al., 2014]. Since both our patients have trisomy of this region, their hearing loss may be related to gene dosage effects. It is likely that although this trisomy occurs in both cousins, the large number of genes duplicated may have resulted in synergistic action of multiple genes contributing to the variation in phenotypes between P1 and P2. In addition, the influence of other genetic mechanisms and environmental factors should not be disregarded.

Fig. 2. G-banded chromosomes and FISH analysis. **A** G-banding results showing the derivative chromosome 4 with the addition of 12q in P1. **B** G-banded chromosomes showing the apparently balanced translocation between chromosomes 4 and 12 in P2's mother. **C, D** FISH analysis using LPT04PR-Red (4p16.3) and LP-T12QG-Green (12q24.33) probes for patients and carriers. FISH analysis (P2) showing 3 green signals (**C**), one of them in the derivative chromosome 4 with the addition of the subtelomeric 12q

The variability of phenotypic findings in WHS has been associated with the extent of the partial deletion in 4p. About 40–45% of the WHS cases involve an unbalanced translocation and a deletion of 4p as well as partial trisomy of a different chromosome arm [Battaglia et al., 2015]. The core phenotype is defined by a broad, flat nasal bridge, a prominent high forehead, and hypertelorism which has led to the descriptive term Greek warrior helmet appearance.

The association of the 4p monosomy and 12q trisomy has been previously reported in only 3 cases [Melnyk et al., 1981; Tajara et al., 1985; Wilson and Oei, 1998], analyzed by classical cytogenetics (Table 1). The phenotypic findings are very similar among the patients including developmental delay, intellectual disability, and craniofacial dysmorphisms. Prominent forehead, flat nasal bridge, micrognathia, and malformed ears were described in all cases. Three patients presented with seizures, and cleft palate was reported in 2. Microtia and deafness was exclusively observed in case P2. Ou et al. [2011] suggest that sequence homologies present in low-copy repeat clusters at 4p16 may make this region prone to chromosomal rearrangements.

The deleted region at 4p16.3 in our patients comprises 53 genes, including 3 major genes (*WHSC1*, *WHSC2*, and *LETM1*) known to be associated with the WHS phenotype. *WHSC1* is thought to regulate multiple processes in development [Battaglia et al., 2015], and its deletion may disrupt normal morphogenesis and neurodevelopment leading to some phenotypic features found in WHS [Zollino and Doronzio, 2018]. The *WHSC2* gene may be involved in more global aspects in WHS. The combined haploinsufficiency of *WHSC1* and *WHSC2* could significantly alter the “transcriptome landscape” during development, which may have an adverse overall impact on normal developmental processes in addition to having tissue-specific effects on different organs [Kerzendorfer et al., 2012].

The *LETM1* gene may play a role in the pathogenesis of seizures in patients with 4p deletion. The *LETM1* protein regulates $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$ influx and efflux levels in the mito-

region. The normal chromosomes 4 (red) and 12 (green) are also indicated. FISH analysis of P2's sister showing the derivatives and normal chromosomes (**D**). The derivative chromosome 4 with the addition of 12q is marked in green and the derivative chromosome 12 with addition of 4p in red. **E, F** Microarray mapping of P1. **E** The 2.7-Mb deletion in chromosome 4 (4p16.3) is indicated in red. **F** The 12.4-Mb duplication in chromosome 12 (12q24.31q24.33) is shown in blue.

chondria affecting cerebral activity [Jiang et al., 2013], but haploinsufficiency of *LETM1* by itself may be insufficient to lead to seizures [Andersen et al., 2014]. More recently, the genes *CTBP1*, *PIGG*, and *CPLX1*, all involved in neuronal synaptic activity, were suggested as additional candidates for the development of seizures [Bayindir et al., 2013; Zollino et al., 2014; Battaglia et al., 2015]. Ho et al. [2016] suggest that WHS patients are less likely to have seizures if the terminal 751 kb of the short arm of chromosome 4 remains intact. The terminal 4p deletions detected in P1 and P2 are the same at the genomic level and comprise all candidate genes for the onset of seizures, suggesting that other reasons may underlie why patient P1 did not have a phenotype involving seizures as observed in her cousin P2. There is some evidence that epileptic disorders act as an independent factor for the final degree of intellectual disability in patients [Oh et al., 2017], and this may explain the more severe neurodevelopmental impairment in case P2 in comparison to P1.

The deletion in 4p16.3 also includes the *FGFRL1* gene. It has been proposed that *FGFRL1* could contribute to the craniofacial phenotype and skeletal features in 4p deletions based on targeted deletion of *fgfr1* in zebrafish [Hall et al., 2006] and mice [Catela et al., 2009]. The jaw malformations and defects in heart septation observed in these *fgfr1* knockouts have similar features to clinical observations in P1, such as cleft palate and persistent interatrial communication.

Both P1 and P2 had some phenotypic features in common with other reported cases of monosomy 4p and trisomy 12q. Since both our patients carry the same genomic alterations and only P2 shows the distinctive Greek warrior helmet appearance typical of monosomy 4p, it seems possible that the large 12q trisomy has slightly different effects in P1 and P2.

Our study of this rare unbalanced t(4;12) translocation draws attention to several related genes that could help explain the genotype-phenotype correlations in patients with similar monosomies and trisomies at 4p and 12q.

References

- Andersen EF, Carey JC, Earl DL, Corzo D, Suttie M, et al: Deletions involving genes *WHSC1* and *LETM1* may be necessary, but are not sufficient to cause Wolf-Hirschhorn syndrome. *Eur J Hum Genet* 22:464–470 (2014).
- Bao L, Schorry EK: A girl with partial trisomy 12q24.31 inherited from her father and a possible novel syndrome transmitted from her mother. *Am J Med Genet A* 138:361–364 (2005).
- Battaglia A, Carey JC, South ST: Wolf-Hirschhorn syndrome: a review and update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 169:216–223 (2015).
- Bayindir B, Piazza E, Mina ED, Limongelli I, Brustia F, et al: Dravet phenotype in a subject with a der(4)t(4;8)(p16.3;p23.3) without the involvement of the *LETM1* gene. *Eur J Med Genet* 56:551–555 (2013).
- Bouman A, Schuitema A, Pfundt R, Van de Zande G, Kleefstra T: Clinical delineation of a patient with trisomy 12q23q24. *Eur J Med Genet* 56:463–469 (2013).
- Catela C, Bilbao-Cortes D, Slonimsky E, Kratsios P, Rosenthal N, Te Welscher P: Multiple congenital malformations of Wolf-Hirschhorn syndrome are recapitulated in *Fgfr1* null mice. *Dis Model Mech* 2:283–294 (2009).

Acknowledgments

The authors are grateful to the patients and their parents who made this report possible. We thank Lucimar Aparecida Fernandes Laureano and Amélia Araújo for their excellent technical assistance.

Statement of Ethics

This study was approved by the Ethic Committee for research involving human subjects at the Ribeirão Preto Clinical Hospital of the University of São Paulo (HCRP: 74/91/2015). Written informed consent was obtained from the parents for publication of this case report and any accompanying images.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Funding Sources

This work was funded by CNPq – Council for Scientific and Technological Development, FAEPA – Foundation for Education, Research and Assistance Support of the University Hospital of the Ribeirão Preto Medical School – USP and CAPES – Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel.

Authors Contributions

All authors made substantive intellectual contributions to the study, read, and approved the final version of the manuscript. T. Mozer Joaquim participated in the design of the study, performed and analyzed FISH and array-CGH data, drafted the manuscript, and finalized it. C.H. Paiva Grangeiro acquired and interpreted clinical data. F. Gaona de Oliveira Gennaro and A. Galvão Gomes participated in performing and analyzing the array-CGH data. J.A. Squire participated in data analysis and critically read the manuscript. L.R. Martelli conceived the study, participated in its design and coordination, drafted the manuscript, and finalized it.

- Cheng J, Zhu Y, He S, Lu Y, Chen J, et al: Functional mutation of *SMAC/DIABLO*, encoding a mitochondrial proapoptotic protein, causes human progressive hearing loss DFNA64. *Am J Hum Genet* 89:56–66 (2011).
- Corrêa T, Mergener R, Leite JCL, Galera MF, Moreira LMA, et al: Cytogenomic integrative network analysis of the critical region associated with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Biomed Res Int* 2018:5436187 (2018).
- Faletta F, Girotto G, D'Adamo AP, Vozzi D, Morgan A, Gasparini P: A novel *P2RX2* mutation in an Italian family affected by autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Gene* 534:236–239 (2014).
- Hall C, Flores MV, Murison G, Crosier K, Crosier P: An essential role for zebrafish *Fgfr1l* during gill cartilage development. *Mech Dev* 123:925–940 (2006).
- Ho KS, South ST, Lortz A, Hensel CH, Sdano MR, et al: Chromosomal microarray testing identifies a 4p terminal region associated with seizures in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet* 53:256–263 (2016).
- Ireland JW, Jalal SM, McGrann PS, Lindor NM: Nonmosaic smallest duplication of 12q24.31-qter: the first reported case. *Am J Med Genet A* 128:305–310 (2004).
- ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature; McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds). *Cytogenet Genome Res* 149:1–140 (2016).
- Jardine PE, Burvill-Holmes LC, Schutt WH, Lunt PW: Partial 6q monosomy/partial 12q trisomy in a child with features of Kabuki make-up syndrome. *Clin Dysmorphol* 2:269–273 (1993).
- Jiang D, Zhao L, Clish CB, Clapham DE: *Letm1*, the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E2249–E2254 (2013).
- Kerzendorfer C, Hannes F, Colnaghi R, Abramowicz I, Carpenter G, et al: Characterizing the functional consequences of *NELF-A (WHSC2)* and *SLBP* identifies novel cellular phenotypes in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Hum Mol Genet* 21:2181–2193 (2012).
- Lagier-Tourenne C, Ginglinger E, Alembik Y, De Saint Martin A, Peter MO, et al: Two cousins with partial trisomy 12q and monosomy 12p recombinants of a familial pericentric inversion of the chromosome 12. *Am J Med Genet A* 125:77–85 (2004).
- Melnyk AR, Weiss L, Dyke DLV, Jarvi P: Malformation syndrome of duplication 12q24.1 leads to qter. *Am J Med Genet* 10:357–365 (1981).
- Oh A, Thurman DJ, Kim H: Comorbidities and risk factors associated with newly diagnosed epilepsy in the U.S. pediatric population. *Epilepsy Behav* 75:230–236 (2017).
- Ou Z, Stankiewicz P, Xia Z, Breman AM, Dawson B, et al: Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between nonhomologous chromosomes. *Genome Res* 21:33–46 (2011).
- Rodriguez L, Guadia NM, Herens C, Jamar M, Verloes A, et al: Subtle trisomy 12q24.3 and subtle monosomy 22q13.3: three new cases and review. *Am Med Genet A* 122:119–124 (2003).
- Sathanoori M, Hu J, Murthy V, Bymes A, Vockley J, et al: Cryptic duplication of 12q24.33→qter in a child with Angelman syndrome – simultaneous occurrence of two unrelated cytogenetic events. *Am J. Med Genet A* 143A:985–994 (2007).
- Semerci CN, Cinbis M, Ullmann R, Steininger A, Bahce M, et al: Subtelomeric 6p monosomy and 12q trisomy in a patient with a 46,XX,der(6)t(6;12)(p25.3;q24.31) karyotype: phenotypic overlap with Mutchinick syndrome. *Am J Med Genet A* 152A:1724–1729 (2010).
- Tajara EH, Varela-Garcia M, Gusson AC: Partial trisomy 12q24.31→qter. *J Med Genet* 22:73–76 (1985).
- Wilson CJ, Oei PT: The use of a specific clinical history in counselling a family with the balanced translocation 46,XY,t(4;12)(p15.2;q21.3): viable offspring with partial monosomy 4p and trisomy 12q. *Clin Genet* 54:110–111 (1998).
- Zabel B, Baumann W: Partial trisomy 12q. *J Med Genet* 18:144–146 (1981).
- Zollino M, Doronzio PN: Dissecting the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype: *WHSC1* is a neurodevelopmental gene contributing to growth delay, intellectual disability, and to the facial dysmorphism. *J Hum Genet* 63:859–861 (2018).
- Zollino M, Orteschi D, Ruiter M, Pfundt R, Steindl K, et al: Unusual 4p16.3 deletions suggest an additional chromosome region for the Wolf-Hirschhorn syndrome-associated seizures disorder. *Epilepsia* 55:849–857 (2014).