Daniela Rodrigues de Moraes

Variações no número de cópias genômicas submicroscópicas raras em pacientes com insuficiência ovariana primária: identificação de novos genes candidatos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Sorahia Domenice

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moraes, Daniela Rodrigues de
Variações no número de cópias genômicas submicroscópicas raras em pacientes com insuficiência ovariana primária : identificação de novos genes candidatos / Daniela Rodrigues de Moraes. -- São Paulo, 2020.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Sorahia Domenice.

Descritores: 1.Insuficiência ovariana primária 2.Infertilidade feminina 3.Variações do número de cópias de DNA 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.SNP-array 6.Hibridação genômica comparativa baseada em microarranjos 7.Array-CGH 8.Deleção cromossômica submicroscópica 9.Duplicação cromossômica submicroscópica

USP/FM/DBD-316/2020

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Agradeço em primeiro lugar à Deus pela oportunidade de ter me tornado médica, e estar inserida num meio onde o conhecimento auxilia a melhorar a vida do próximo: nossos pacientes, a razão de querermos nos aprimorar.

Ao meu amado marido, **Alexandre**, por estar comigo diuturnamente em todas as caminhadas rumo ao progresso da alma, incansável e sempre me apoiando. À nossa filha Mariana, nosso maior amor.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra Sorahia, por sua generosidade, pelo seu exemplo ético e moral, que vai muito além da vida acadêmica e por ter sido para mim, modelo inspirador de ser humano. Agradeço por ter me feito acreditar que seria capaz de estudar um tema, na época, para mim tão complexo e desafiador, e por ter lidado com minhas dificuldades sempre de maneira tão positiva e carinhosa;

À professora Ana Krepischi, pessoa encantadora, que dividiu comigo seus conhecimentos de maneira magnânima;

À professora Berenice, pelo acolhimento e exemplos tão marcantes de liderança e brilhantismo;

À amiga Viviane Yance, minha admiração e gratidão, por ter me impulsionado a estar aqui hoje. À minha querida Marcela Ferraz, amiga que partilhou comigo o poço rico de conhecimento da Residência Médica, e que tornou meus dias mais alegres. Aos queridos preceptores da Residência Médica da família Santa Marcelina, que levo com muito amor e carinho;

Aos meus pais, que não são médicos, mas sempre valorizaram o estudo e me ensinaram que temos sempre algo de bom a doar, mesmo que seja apenas uma palavra; me ajudaram incansavelmente a perseguir sonhos que pareciam inalcançáveis. Agradeço à minha avó Alice *(in memorian*), por ter sido uma mulher que à sua época, já considerava o estudo essencial à uma vida mais digna e justa a todos os seres humanos, tendo sido uma educadora muito especial. Ao meu irmão, por compreender minha ausência, enquanto eu buscava aprimoramento. Ao meu sobrinho Pedro, que veio dar colorido e leveza às nossas vidas, e aos meus sobrinhos Lucas e Luísa que vieram complementar essa alegria;

Aos meus amigos da sala do DDS: Jota, esse baiano com uma leveza ímpar, sorriso gostoso, coração alegre, que enxerga a vida por um prisma sempre bom

e cheio de otimismo, vendo sempre a parte boa de cada um; que felicidade foi dividir com você esses anos de aprendizado, te levo em meu coração! Rafa esse gaúcho espetacular, astuto investigador no ramo científico e lindamente generoso com seus pacientes e colegas, é um amigo para sempre. Nath, amiga querida, dedicada e competente, sempre exemplar!

Flavinha, Maria Tereza, Léo e Lia, mesmo que por pouco tempo, foi muito bom compartilhar da companhia de vocês;

À querida Marlene Inácio, pelo sorriso sempre largo e abraço caloroso; à Dra Maria Helena, pelo compartilhamento de aprendizados, pela doçura e amizade; à Dra Elaine por tantos ensinamentos, paciência e oportunidades;

Especiais agradecimentos à Miriam, Monica França, Dr Alex, Dra Ana Canton, Dra Luciani, por dividirem comigo seus conhecimentos, e estarem sempre tão prontos a ajudar!

À nossa Nildinha (*in memorian*) minha querida companheira de almoços e cafés, posso dizer que o LIM 42 nunca mais será o mesmo;

Aos amigos da pós graduação, com quem pude dividir muitos momentos especiais: Juliana, Isa, Felipe, Thaty, Carol e Ana;

À todos os funcionários do LIM 42, em especial à Rosangele, Cidinha, Luciana, Fran, Cris, Valéria, Neide, Gislene, Adriana, pela eficiência, disponibilidade e por tornar nossos dias mais leves e alegres.

Sumário

1) Introdução..... 2

1.1) Insuficiência Ovarina Primária (IOP)..... 2

1.2) Distúrbios genéticos associados a IOP..... 5

1.2.1) Anormalidades no cromossomo X relacionada a IOP..... 5

1.2.2) Genes localizados no cromossomo X relacionados a IOP. 6

1.2.3) Genes localizados em autossomos relacionados a IOP..... 8

1.2.4) IOP relacionada a Síndromes, com fenótipos complexos..... 9

1.3) Cariotipagem molecular..... 12

1.4) Justificativa..... 15

2) Objetivo..... 17

2.1) Objetivo principal..... 17

2.2) Objetivo específico..... 17

3) Métodos e Pacientes 19

3.1) Considerações éticas..... 19

3.2) Pacientes..... 19

3.3) Métodos..... 25

3.3.1) Extração do DNA genômico..... 25

3.3.2) Metodologia *Polimorfismo de nucleotídeo único* array (SNP-array) 25

3.3.3) Metodologia *Comparative Genomic Hybridization Array* (aCGH)..... 28

3.3.4) Análise dos *microarrays*..... 29

4) Resultados 36

4.1) Pacientes com CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas: descrição clínica e *microarray*..... 41

4.2) Pacientes com CNVs classificadas como VUS, contendo genes candidatos a IOP: descrição clínica e *microarray*..... 52

4.3) Pacientes com CNVs classificadas como VUS, sem conteúdo gênico e/ou com genes que não foram associados à função ovariana: descrição clínica e *microarray*..... 56

5) Discussão 66

6) Conclusões 83

7) Anexos 85

8) Referências Bibliográficas 90

Lista de abreviaturas

aCGH	Hibridação genômica comparativa por microarray
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
βHCG	Gonadotropina coriônica humana Beta
CDKN1B	Inibidor 1B da quinase dependente de ciclinas
CNV	Variação no número de cópias
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
DGV	Database of Genomic Variants
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
ExAC	The Exome Aggregation Consortium (banco de dados populacional)
FISH	Hibridação fluorescente *in situ*
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
GRCh37/hg19	Genome Reference Consortium 37/ human genome 19
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMC	Índice de massa corporal
IOP	Insuficiência ovariana primária

Kb	Kilobases
LH	Hormônio luteinizante
Mb	Megabases
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SNP array	Polimorfismo de nucleotídeo único por microarray
TGFβ	Transforming growth factor beta / Fator de crescimento de transformação beta
TSH	Hormônio tireoestimulante
UCSC	University of California, Santa Cruz Genome Browser
UI	Unidades internacionais
URL	Uniform resource locator
VUS	Variante de significado indeterminado
LHR	Receptor de LH
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory Protein
Clock	Clock Circadian Regulator

FIGURAS

Figura 1	Dinâmica folicular e possíveis mecanismos de IOP; aferindo diferentes estágios da foliculogênese	5
Figura 2	Genes assocados a IOP e sua importância na oogênese, foliculogênese e outras funções	11
Figura 3	Resumo dos resultados do microarray no grupo estudado	36
Figura 4	Dados derivados do SNP-array 2M Affymetrix da paciente 1	43
Figura 5	Dados derivados do SNP-array 2M Affymetrix da paciente 1	44
Figura 6	Dados derivados do SNP-array 2M Affymetrix da paciente 2	46
Figura 7	Dados derivados do SNP-array 2M Affymetrix da paciente 3	47
Figura 8	Dados derivados do SNP-array 2M Affymetrix da paciente 4	49
Figura 9	Ideograma representando o genoma da paciente 4, e segmentos genomicos em homozigose	50
Figura 10	Representação da atuação do *PER2* e *Clock* na célula granulosa no ovário	70

TABELAS

Tabela 1	Principais causas associadas a IOP	3
Tabela 2	Dados clínicos e laboratoriais de 53 pacientes portadores de insuficiência ovariana primária e amenorréia primária	22
Tabela 3	Dados clínicos e laboratoriais de 22 pacientes portadores de insuficiência ovariana primária e amenorréia secundária	24
Tabela 4	Critérios utilizados para a classificação das CNVs de acordo com sua patogenicidade	31
Tabela 5	Ferramentas utilizadas de análise de bioinformática	33
Tabela 6	Categorização de acordo com a patogenidade das CNVs encontradas e achados clínicos	38
Tabela 7	Genes contidos nas CNVs raras identificadas nesta coorte de pacientes com IOP	39
Tabela 8	Novos genes candidatos e genes previamente associados à etiologia da IOP	40

ANEXOS

Anexo 1	História clínica e exame físico realizados na abordagem diagnóstica inicial de Insuficiência Ovariana Primária, realizada no Ambulatório do Desenvolvimento do HCFMUSP	85
Anexo 2	Avaliação laboratorial e de imagem feitas inicialmente nas pacientes com IOP	86
Anexo 3	Descrição da investigação das pacientes com IOP, dos grupos I e II, que apresentavam ao exame físico clitoromegalia	87
Anexo 4	Achados clínicos observados na coorte de 75 pacientes com IOP	88

RESUMO

Moraes DR. **Variações no número de cópias genômicas submicroscópicas raras em pacientes com insuficiência ovariana primária*:* identificação de novos genes candidatos** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A insuficiência ovariana primária (IOP) é uma condição heterogênea com múltiplas etiologias, que acomete um grande número de mulheres e com repercussões importantes na saúde geral e psicológica, especialmente pelo estigma da infertilidade em mulheres jovens. A presença de amenorréia, hipogonadismo hipergonadotrófico e hipoestrogenismo em mulheres com menos de 40 anos caracterizam a insuficiência ovariana primária. As causas da IOP envolvem processos infecciosos, doenças metabólicas e autoimunes, fatores ambientais e iatrogênicos além das causas genéticas. Nos últimos anos, o número de genes identificados, que desempenham um papel na etiologia da IOP em humanos e em modelos animais tem crescido exponencialmente, mas apesar disso, um grande número de mulheres continua sem um diagnóstico estabelecido. As técnicas de citogenômica, *Comparative Genomic Hybridization Array* (*array*-CGH) e *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-*array*), permitem avaliar todo o genoma na detecção de variação no número de cópias (copy number variants-CNVs) genômicas, baixos níveis de mosaicismos e perda de heterozigose com rapidez e acurácia, e tem contribuído no esclarecimento das causas da IOP. O objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de deleções ou duplicações submicroscópicas raras em pacientes portadoras de IOP sem causa etiológica estabelecida e identificar novas regiões cromossômicas e/ou novos genes possivelmente relacionados à doença. **Pacientes e Métodos**: Setenta e cinco pacientes portadoras de IOP de causa não determinada foram selecionadas, 53 apresentavam amenorreia primária e 22 pacientes amenorreia secundária. Todas as pacientes apresentavam cariótipo 46,XX. As técnicas de *array* utilizadas no estudo foram *array*-CGH (plataforma 180K DNA microarray, Agilent Technologies) e SNP *array* (CytoScan HD *array* 750K, Affymetrix). As CNVs identificadas foram comparadas com CNVs relatadas em bancos de dados de indivíduos normais (Database of Genomic Variants - DGV) e de dados associados a anomalias e variações cromossômicas (Decipher). Uma ampla análise do conteúdo gênico das CNVs raras foi realizada utilizando-se diferentes ferramentas de bioinformática (OMIM, Pubmed, Ovarian Kaleidoscope Database e Mouse Genome Informatics). **Resultados**: Dezenove CNVs raras foram identificadas em 18 pacientes, sete deleções e doze duplicações, a maioria delas localizadas em autossomos. Cinco CNVs foram categorizadas como patogênicas, duas provavelmente patogênicas e doze variantes de significado clínico incerto (VUS). As CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas e os genes candidatos contidos nessas regiões foram respectivamente: deleção (del) de 14,5 Mb em Xq27.2q28 (genes *FMR1* e *FMR2*); duplicação (dup) de 41,4 Mb em Xq22.1q27.1 (genes *XPNPEP2*, *COL4A6**,*** *NXF5* e *PGRMCI*); dup de 2,7 Mb em 20p13; del de 1,7 Mb em15q25.2 (genes *CPEB1* e *BNC1)*; del de 1,0 Mb em Xq13.2 (gene *XIST*), dup de 0,55 Mb em 2q37.3 (gene *PER2*) e dup de 0,33 Mb em 19q13.43 (gene *NLRP5*). As CNVs localizadas nas regiões Xq27.2q28, Xq22.1q27.1 e 15q25.2 foram regiões genômicas previamente descritas em pacientes com IOP. Em sete CNVs, a análise do conteúdo gênico indicou potenciais candidatos associados à

disfunção ovariana: *PTGFR* (1p31.1), *XDH* e *EHD3* (2p23.1), *PER2* (2q37.3), *KDM4C* (9p24.1), *NLRP5* (19q13.43), *ZNRF3* (22q12.1) e *XIST* (Xq13.2). **Conclusão:** A análise de *microarray* desta coorte de mulheres portadoras de IOP permitiu o reconhecimento de 19 CNVs raras, das quais duas regiões no cromossomo X (Xq22.1q27.1 e Xq27.2q28), e uma em autossomo (15q25.2), consistem em desequilíbrios genômicos recorrentes, já descritos previamente em IOP. Novos genes e novas vias potencialmente envolvidas na patogênese ovariana foram sugeridas pelos achados, porém o real envolvimento destes genes na etiologia da IOP deverá ser elucidado por estudos complementares.

Descritores: Insuficiência ovariana primária; Infertilidade feminina; Variações do número de cópias de DNA; Polimorfismo de nucleotídeo único; SNP-array; Hibridação genômica comparativa baseada em microarranjos; Array-CGH; Deleção cromossômica submicroscópica; Duplicação cromossômica submicroscópica..

ABSTRACT

Moraes DR. **Rare submicroscopic copy number variations in patients with primary ovarian failure: identification of novel candidate genes** [dissertation]. São Paulo: São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introduction: Primary ovarian insufficiency (POI) is a heterogeneous condition with multifactorial etiologies. It affects a large number of women and has important impacts on general physical and psychological health, especially due to the stigma associated with infertility in young women. Amenorrhea, hypergonadotropic hypogonadism, and hypoestrogenism in women under 40 years of age are features of POI. Causes of POI include infectious processes, metabolic and autoimmune diseases, environmental, iatrogenic, and genetic factors. In recent years, the number of genes identified as playing a role in the etiology of human and animal model POI has grown exponentially. Nevertheless, in many women with POI, the specific etiology is not established. Microarray-based cytogenomic techniques such as array comparative genomic hybridization (array-CGH) and single nucleotide polymorphism array (SNP array) promote a quick and accurate evaluation of the entire genome for the existence of copy number variants (CNVs), low-level mosaicism, and loss of heterozygosity, and have contributed to the elucidation of POI etiologies. The aims of the present study were to determine the presence of rare submicroscopic deletions (del) or duplications (dup) in POI patients with no established specific etiology and to identify novel chromosomal regions and/or genes potentially associated with disease risk. **Patients and Methods:** Seventy-five patients with POI of undetermined origin were selected (53 with primary amenorrhea and 22 with secondary amenorrhea). All patients had 46,XX karyotype. Array-CGH (180K DNA microarray platform, Agilent Technologies) and SNP-array (CytoScan HD Array 750K, Affymetrix) were employed to detect genetic variants. Identified CNVs were compared with those reported in databases containing data associated with both normal individuals (Database of Genomic Variants (DGV)) and anomalies or chromosomal variations (DECIPHER). A broad analysis of the gene content of rare CNVs was performed using various bioinformatic databases and tools (OMIM, PubMed, Ovarian Kaleidoscope Database, and Mouse Genome Informatics). **Results**: The study identified 19 rare CNVs (n = 18 patients), seven deletions, and 12 duplications, largely located within autosomes. Five CNVs were categorized as pathogenic, two as likely pathogenic, and 12 as variants of unknown significance (VUS). Candidate genes relevant to the seven pathogenic and likely pathogenic CNVs are as follows: *FMR1* and *FMR2* (14.5 Mb del in Xq27.2q28); *XPNPEP2*, *COL4A6*, *NXF5,* and *PGRMCI* (41.4 Mb dup in Xq22.1q27.1); none (2.7 Mb dup in 20p13); *CPEB1* and *BNC1* (1.7 Mb del in 15q25.2); *XIST* (1.0 Mb del in Xq13.2); *PER2* (0.55 Mb dup in 2q37.3); and *NLRP5* (0.33 Mb dup in 19q13.43). Those CNVs located in Xq27.2q28, Xq22.1q27.1, and 15q25.2 involve genomic regions previously implicated in POI. Analysis of gene content within the seven pathogenic and potentially pathogenic CNVs identified in this patient cohort indicate additional potential candidates associated with ovarian dysfunction: *PTGFR* (1p31.1), *XDH* and *EHD3* (2p23.1), *PER2* (2q37.3), *KDM4C* (9p24.1), *NLRP5* (19q13.43), *ZNRF3* (22q12.1), and

XIST (Xq13.2). **Conclusion:** Microarray analysis of this cohort of POI patients detected 19 rare CNVs, of which: two involved the X chromosome (Xq22.1q27.1 and Xq27.2q28) and one autosomal (15q25.2) CNV had been previously described as recurrent in POI. Findings suggest novel genetic and functional pathways potentially involved in POI pathogenesis. Candidate gene involvement should be validated and elucidated by further studies.

Descriptors: Primary ovarian insufficiency; Infertility, female; DNA Copy number variations; Polymorphism, single nucleotide; SNP-array; Comparative genomic hybridization based on microarray; Array-CGH; Submicroscopic chromosomal deletion; Submicroscopic chromosomal duplication

1) INTRODUÇÃO

1.1) Insuficiência Ovarina Primária

Insuficiência ovariana primária (IOP) é uma síndrome clínica caracterizada pela ausência de atividade ovariana antes dos 40 anos. Clinicamente a IOP pode apresentar-se como atraso puberal e amenorreia primária (AP), amenorréia secundária (AS) ou oligomenorréia por 4 meses ou mais; associado a um hipogonadismo hipergonadotrófico, representado laboratorialmente por hipoestrogenismo e níveis elevados de FSH (Follicle-stimulating hormone) >25 IU/l, aferidos em duas ocasiões, com pelo menos 1 mês de intervalo entre as aferições(Webber *et al*.,2016). O hormônio antimulleriano (AMH) é um indicador que ajuda a avaliar o estado de senescência folicular, funcionando como um possível preditor de IOP; no entanto, não deve ser consideradocomo um teste de triagem isolado, que possa prever a vida útil reprodutiva da mulher (Visser *et al.,*2012)

A incidência de IOP é de 1:10.000 em mulheres entre 18-25 anos, 1:1000 em mulheres com idade entre 25-30 anos e 1:100 nas mulheres entre 35-40 anos.A IOP representa 10-28% das causas de amenorréia primária e 4-18% das causas de amenorréia secundária.A incidência de casos familiais varia entre 4% a 31%. (Dixit *et al.*, 2010, Van Kasteren *et al*.,1999).

O termo insuficiência ovariana primária (IOP) é a denominação utilizada atualmente para abranger as entidades previamente denominadas de falência ovariana prematura, hipogonadismo hipergonadotrófico e a disgenesia gonadal 46,XX (Fortuño e Labata.,2016)

Os sintomas vasomotores, como ondas de calor e suores noturnos, e sintomas secundários à vaginite atrófica, como a dispareunia e infecções urinárias recorrentes são relacionados à deficiência estrogênica. Podem ainda ocorrer alterações emocionais, designadamente: depressão, irritabilidade, ansiedade, diminuição da libido e distúrbios do sono. Osteoporose e osteopenia podem se desenvolver também secundariamente ao déficit estrogênico. O risco de doenças cardiovasculares, devido a disfunção endotelial é maior nesta

condição. A IOP também acarreta infertilidade, situação que geralmente determina um grande impacto emocional nas mulheres afetadas (Nelson LM, 2015; Gianinni *et al*,2016).

A alta frequência desta condição na população feminina e as graves repercussões na saúde física e mental destas mulheres tornam o estudo das causas etiológicas da IOP de alta relevância.

As causas etiológicas da IOP envolvem mecanismos heterogêneos e podem ser secundárias a processos infecciosos, a doenças metabólicas e autoimunes, a fatores ambientais e iatrogênicos além das causas cromossômicas e genéticas (Goswami e Conway, 2005, Ravel *et al*., 2015)(Tabela 1). Porém, na maior parte das pacientes a causa da IOP ainda não é estabelecida, sendo classificada como idiopática (Huhtaniemi *et al*.,2018)

TABELA 1: Principais causas associadas a IOP

CAUSAS DE INSUFICIÊNCIA OVARIANA			
IATROGÊNICAS	**GENÉTICAS AUTOSSÔMICAS**	**GENÉTICAS LIGADAS AO X**	**SISTÊMICAS**
-quimioterapia	**Sindrômicas**	-Síndrome de Turner	**Doenças auto-imunes**
-radioterapia	-Perrault	-Triplo X	-Lúpus
-cirurgia pélvica	-Blefarofimose-ptose-epicanto invertido	-Pré-mutação do *FMR1*	-Miastenia Gravis
	-Galactosemia	-Gene *BMP15*	-Doença de Crohn
	-APECED	-Deleções	-Artrire reumatóide
	-Ataxia Telangectasia	-Translocações	-Doença de Addison
	Não Sindrômicas		-Diabetes tipo 1
	-genes: *GDF9, NOBOX,FIGLA, NR5AI,FSHR, LHR*		**Fatores ambientais**
			-Vírus
			-Pesticidas
			-Solventes
			-Plásticos
			-Metais pesados

APECED-Poliendocrinopatia autoimune distrofia ectodermal-candidíase(Tabela adaptada de Ravel *et al*.,2015)

Desenvolvimento ovariano

As células germinativas desempenham um papel fundamental na formação e manutenção da função ovariana e o processo de falência ovariana está em grande parte relacionado ao tamanho do *pool* de células germinativas primordiais do ovário.

No feto feminino, a partir da sétima semana de vida intrauterina, as células germinativas proliferativas presentes no tecido gonadal se diferenciam em oogônias, que são a seguir envolvidas por uma camada de células foliculares, derivadas das células de suporte precursoras do epitélio celômico. Uma vez iniciada a meiose, as oogônias se diferenciam em oócitos e formam o folículo primordial (Rosen e Cedars, 2006). Cerca de 7 milhões de folículos primordiais estão presentes no desenvolvimento ovariano durante a embriogênese. A grande maioria dos folículos é perdida durante a vida fetal e pós-natal por atresia, e apenas 400-500 deles serão viáveis nos ciclos ovulatórios antes da menopausa fisiológica (Reynaud *et al*, 2003).

Os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da IOP podem ser: uma diminuição no *pool* inicial dos folículos primordiais; uma aceleração do processo normal de atresia folicular e alterações na maturação folicular e degeneração folicular (Figura 1) (Persani *et al*, 2010). Genes que participam das diferentes etapas da formação e manutenção dos folículos ovarianos são alguns dos genes candidatos à etiologia genética da IOP.

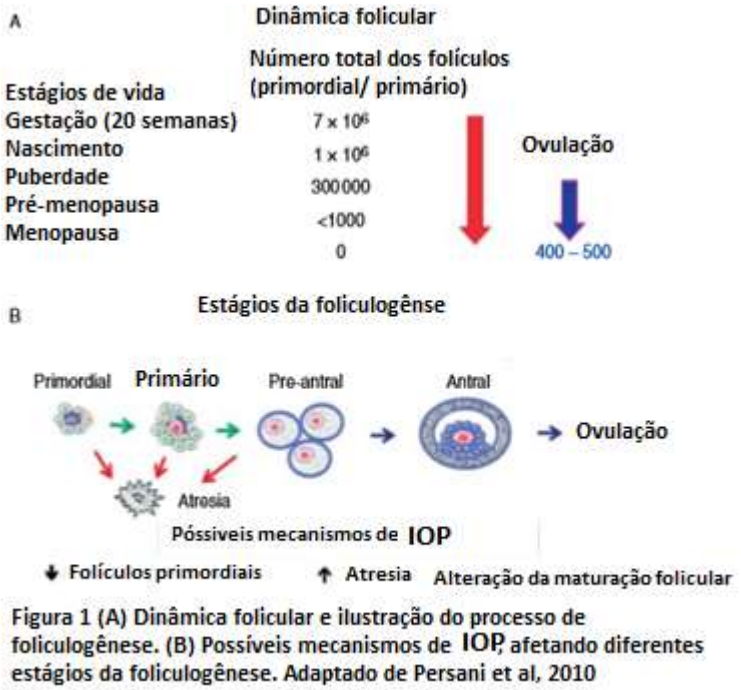

Figura 1 (A) Dinâmica folicular e ilustração do processo de foliculogênese. (B) Possíveis mecanismos de IOP, afetando diferentes estágios da foliculogênese. Adaptado de Persani et al, 2010

1.2) Distúrbios genéticos associados à IOP

1.2.1) Anormalidades no cromossomo X relacionadas a IOP

As alterações do cromossomo X estão entre as causas mais comuns de IOP.A seguir descreveremos algumas dessas anormalidades:

-45,X e 45,X/46,XX: A monossomia do cromossomo X (Síndrome de Turner), tem uma prevalência de 1:2.500 indivíduos nascidos vivos, eé caracterizada por disgenesia gonadal, amenorréia primária (mais comumente) e baixa estatura, entre outros achados dismórficos (Franic-Ivanisevic *et al*.,2016). A depleção de oócitos começa na primeira infância como consequência de uma atresia folicular acelerada. Os indivíduos cujo cariótipo é 45,X/46,XX podem se apresentar com amenorréia secundária. A haploinsuficiência de genes essenciais do cromossomo X, poderia explicar a atresia acelerada de oócitos dos indivíduos com linhagens 45,X (Qin *et al.*, 2015)

-47,XXX ou Trissomia do X: os genes localizados no cromossomo X são críticos para o funcionamento normal do ovário, portanto qualquer anormalidade numérica pode levar a IOP. Groswani *et al*. (2005), em uma revisão de dados

publicados, descreve uma incidência de 3,8% de trissomia do X em mulheres com IOP.

-**Anormalidades estruturais do cromossomo X e translocações X-autossomos:** deleções e inversões no cromossomo X, bem como translocações balanceadas X-autossomos, tem sido observadaem pacientes comIOP. Análises citogenéticas denotam uma região crítica para pontos de quebra no braço longo do cromossomo X, a região de Xq13-Xq21 (denominada IOP1) e de Xq23-q27 (denominada IOP2); regiões necessárias para o desenvolvimento e função ovariana (Shelling *et al*.,2010)

1.2.2) Genes localizados no cromossomo X relacionados a IOP

-***FMR1***(Fragile X Mental Retardation I): a expansão da repetição de trinucleotídeos CGG, presente na região 5' não traduzida do exon 1 do gene *FMR1* (localizado em Xq27.3) é a causa da Síndrome do X Frágil; a segunda causa mais frequente de deficiência intelectual herdada. Expansões na sequência dos nucleotídeos acima de 200 repetições causam uma redução ou ausência da produção da proteína FMRP e o fenótipo da doença. São consideradas expansões normais dessa sequência de 5-44 repetições, expansões intermediárias de 45-54 e pré-mutações de 55-200 repetições (Barasoain *et al*.,2016). Pré-mutação no *FMR1* é a causa genética mais frequente de IOP, sendo identificada em 6% e até 13% dos casos de IOP esporádica e familiar respectivamente, em indivíduos caucasianos, embora com frequências bem menores em populações chinesas e japonesas (Qin *et al.*, 2015). A proteína FMRP exerce um efeito supressivo na tradução do RNAm, portanto sua ausência leva a uma "superexpressão" de RNAm, fato que pode prejudicar a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento dos oócitos, resultando em uma diminuição do *pool* de folículos. Outros estudos sugerem que o RNAm na pré-mutação possa causar toxicidade ovariana, levando a atresia folicular. (Persani *et al*.,2010)

-***BMP15*** (Bone Morphogenetic Protein 15), está localizado no cromossomo Xp11.2; codifica a proteína morfogenética óssea 15 e pertence à

família de fatores de transformação e crescimento tipo beta (TGF-B). O *BMP15* é expresso em oócitos, e desempenha uma atividade crítica na regulação da foliculogênese e na função de células germinativas. Mutações do gene *BMP15* como causa de IOP, tem uma prevalência entre 1,5 a 12%. (Persani *et al*.,2010)

-***PGRMC1***(Progesterone Receptor Membrane Component 1), está localizado em Xq22-q24 e codifica o receptor de membrana de ligação a progesterona. Sua expressão alterada leva à infertilidade por diferentes mecanismos. O *PGRMC1* desempenha um papel fundamental na regulação do desenvolvimento folicular (Dixit *et al*.,2010). A redução nos níveis de expressão desse receptor diminui o efeito anti-apoptótico exercido pela progesterona econsequentemente o aumento da apoptose das células ovarianas um mecanismo determinante daIOP. (Wang *et al*.,2014; Qin*et al*., 2015)

-***AR*** (Receptor Androgênico), está localizado em Xq12, e no ovário o *AR* é expresso no desenvolvimento de folículos, principalmente nas células da zona granulosa. A deficiência do *Ar* em camundongos fêmeas resultou num fenótipo de IOP, sugerindo que para uma foliculogênese normal é requerida uma ação mediada pelo *AR*. (Qin *et al*., 2015)

- *FOX04* (Forkhead box 04), localizado em Xq13.1, é expresso nas células granulosas, e está envolvido na sinalização molecular da PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/ AKT (v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog I)/CDKN Ib (Cyclin-dependent kinase inhibitor IB); o que sugere um papel na fisiologia ovariana. Uma mutação nesse gene foi identificada numa coorte de 116 pacientes tunisianas com IOP (Fonseca *et al*., 2012)

- *POF 1B* (Premature ovarian failure 1 B), localizado em Xq21.2, está localizado na "região crítica" denominada IOP 1, e sua interrupção por pontos de quebra, devido a translocações X-autossomos, levaram ao quadro de IOP. Além disso, está associado a capacidade de ligação de filamentos de actina não musculares, cuja disfunção pode levar a apoptose exagerada de células germinativas. Lacombe *et al*., (2006) identificou mutações nesse gene em cinco irmãs com quadro de IOP, pertencentes a uma mesma família.

Outros genes localizados no cromossomo X potencialmente envolvidos com IOP são: o ***ZFX*** (Zinc Finger X) em Xp22.1-21.3,o***SHOX*** (Short Stature Homeobox) em Xp22.33, o ***DACH2*** (Dachshund Family transcription fator 2)

emXq21.3, o ***DIAPH2***(Diaphanous-related formin 2) em Xq22,o ***NXF5*** (Nuclear RNA export fator 5) em Xq22.1,o ***CENP1*** (Centromere Protein 1) em Xq22.1 o ***COL4A6***(Collagen type IV, alpha 6) em Xq22.3, o ***XPNPEP2*** (X-prolyl aminopeptidase P 2, membrane-bound) em Xq25 eo ***FMR2*** (Fragile Mental Retardation 2) em Xq28(Fortuño e Labarta.,2014).

1.2.3) Genes localizados em autossomos relacionados a IOP

- ***GDF9*** (Growth Differentiation Factor 9), localizado em 5q31.1, é expresso em oócitos, e assim como o *BMP15*, é um membro da família de fatores de transformação do crescimento tipo beta (TGF-B). Alguns trabalhos, tem descrito mutações desse gene associadas a IOP, numa frequência que varia de 1 a 4%. (Dixit *et al*., 2005; Zhao *et al*.,2008, Norling *et al.*, 2014)

- ***FIGLA***(Factor in the germline alpha), localizado em 2p13.3, desempenha um papel crucial na formação do folículo primordial e coordena a expressão de genes da zona pelúcida. Zhao *et al*., (2008) descreveu mutações desse gene numa frequência de 2% em uma coorte de mulheres chinesas com IOP.

- ***NOBOX***(Newborn ovary homeobox gene), localizado em 7q35 é um gene homeobox oócito-específico, que desenvolve um papel crucial na foliculogênese precoce. Qin *et al*., (2007) encontrou 1% de mutações desse gene, numa coorte de mulheres brancas norte-amercianas, já Bouilly *et al*., (2015) reportou mutações do *NOBOX* numa frequência de cerca de 5% numa coorte de mulheres caucasianas com IOP.

- ***NR5A1*** (Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1); SF-1(Steroidogenic fator-1), localizado em 9q33, regula a transcrição de genes envolvidos na reprodução, esteroidogênese e diferenciação sexual masculina. A inativação do *NR5A1* especificamente em células da granulosa de camundongos causa infertilidade, associado a hipoplasia ovariana. Lourenço *et al.,* (2009) identificou 19 diferentes mutações nesse gene, em indivíduos de quatro famílias com IOP e em 25 casos esporádicos da mesma patologia.

- Mais raramente associados a IOP, encontram-se o ***FSHR*** (FSH receptor) e o ***LHR***(LH receptor),ambos localizados em 2p21-p16).O*FSHR* desenvolve um papel chave na função gonadal normal regulando o crescimento folicular,

produção estrogênica e maturação dos oócitos. Mutações que determinem a perda de função desses receptores causam resistência às gonadotrofinas e hipogonadismo hipergonadotrófico. No caso da resistência ao LH, o quadro de IOP pode se caracterizar por oligomenorréia ou amenorréia secundária, evidenciando-se múltiplos folículos antrais à ultrassonografia. A biópsia ovariana nesses casos revela desenvolvimento folicular até o estágio pré-ovulatório, ocorrendo uma típica falência da ovulação (Woad *et al*.,2013).

Outros genes em autossomos, já foram associados à IOP, a saber: ***ESR1*** (Estrogen receptor 1) localizado em 6q24.1, ***WNT4***(Wnt familiy member 4) em1p36.23-p35.1, ***INHA***(Inhibin Subunit Alpha) em 2q35, ***POU5F1*** (POU Class 5 homeobox 1) em 6p21.31, ***FOX03*** (Forkhead transcription fator 3) em 6q21, ***SOHLH1***(Spermatogenesesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix transcription fator 1) em 9q34.3, ***NANOS3***(Nanos homolog 3- Drosophila) em 19p13.1, ***STAGE3*** (Stromal Antigen 3) em 7q22.1), ***EIF2B***(Eukaryotic translation initiation fator subunit 2 beta) e o ***SYCE1***(Synaptonemal complex central elemento protein 1) em 10q26.3; entre outros. (Chapman *et al.,* 2015, L Persani *et al.*, 2010, Qin *et al.,* 2015). A figura 2 ilustra inúmeros genes já associados à fisiologia ovariana e envolvidos à IOP.

1.2.4) IOP relacionada a síndromes com fenótipos complexos:

-**Síndrome Blefarofimose-ptose-epicanto** (BPES-Blepharophimosis-ptosis-epicanthus) é uma síndrome autossômica dominante na qual o gene *FOXL2*(Forkheadbox L2), localizado em 3q23, está envolvido. Esse gene desenvolve um papel crucial no desenvolvimento ovariano, portanto um dos aspectos da síndrome é a IOP, associado amalformaçõespalpebrais, levando a ptose e epicanto invertido.

-**Síndrome de Perrault**- envolve os genes *HSD17B4* (Hydroxysteroid dehydrogenase 4), localizado em 5q21; *HARS2* (Hystidyl-tRNA synthetase 2), localizado em 5q31.4; *LARS2* (Leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial) localizado em 3p21.3; *CLPP* (Caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit), localizado em 19p13.3 e o *C10orf2* (Chromosome 10 open

reading frame 2) localizado em 10q24. É uma condição de herança recessiva, caracterizada por IOP nas mulheres, surdez neuro-sensorial tanto em homens como em mulheres, entre outras manifestações neurológicas.

-**APECED** (Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy)- envolve o gene *AIRE* (Autoimmune Regulator), localizado em 21q22.3, que quando afetado, pode levar a múltiplas anormalidades auto-imunes: Doença de Addison, hipoparatireodismo, Diabetes Mellitus tipo 1, alopécia, vitiligo, distrofia ectodermal, doença celíaca, gastrite crônica atrófica, hepatite ativa crônica, distúrbios tireoidianos auto-imunes e anemia perniciosa. O acometimento ovariano costuma ocorrer na terceira década de vida.

Outras síndromes associadas a IOP, são: o Pseudohipoparatireodismo tipo 1a, a Leucodistrofia ovariana, a Ataxia telangectasia, a Galactosemia, a Oftalmoplegia externa progressiva e a Síndrome de Demirhan. (Persani *etal*.,2010; Qin *et al*.,2015)

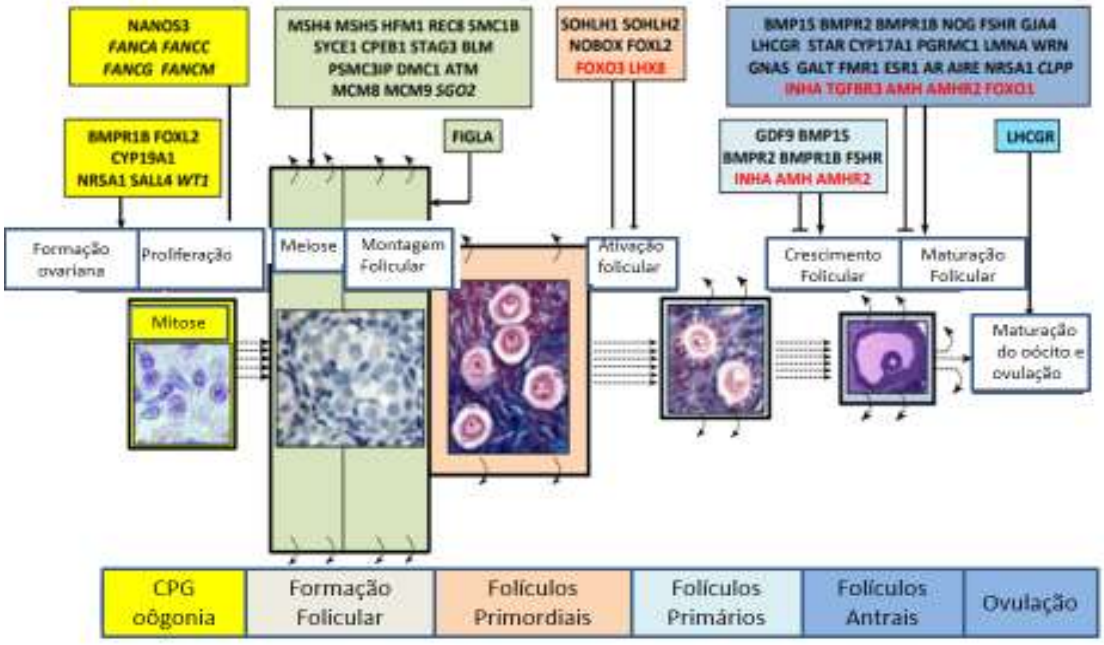

Figura 2: Genes assocados a IOP e sua importância na oogênese, foliculogênese e outras funções.CPG: células germinativas primordiais. Adap. Huhtaniemi et al.,2018

Naspacientes com IOP, as técnicas da citogenética convencional tem-se mostrado limitadas na detecção de alterações estruturais de segmentos pequenos do DNA, uma vez que o cariótipo convencional detecta apenas desbalanços acima de 4-10 Mb e nas técnicas de FISH e MLPA é necessário a escolha de uma região genômica definida para o estudo, impossibilitando a busca de desbalanços pelo genoma inteiro ((Huhtaniemi *et al*.,2018, Separovic., 2012).

Na busca por um diagnóstico genético para esse grande número de pacientes portadores de IOP de etiologia não conhecida, o uso de técnicas que avaliam todo o genoma, tem se tornado uma realidade, na medida em que os custos estão sendo barateados possibilitando sua utilização não apenas em protocolos de pesquisa, mas também na prática clínica (Arboleda *et al.*, 2013).

1.3) Cariotipagem molecular

A tecnologia de *microarrays,* também conhecida como cariotipagem molecular,demonstrou a importância das variações do número de cópias (CNVs) submicroscópicas na patogênese de inúmeras doenças raras e complexas (Vulto-van Silfhout *et al*.,2013).Em 2010, o *microarray* foi eleito o exame de escolha, o padrão-ouro na investigação de indivíduos com anormalidades do desenvolvimento neurológico e anomalias congênitas, recomendado como o primeiro teste diagnóstico a ser realizado idealmente nestas condições (Miller *et al.*, 2010).

O desenvolvimento dessa técnica permitiu detectar desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos em pelo menos 10-15% dos pacientes com atraso de desenvolvimento, múltiplas anormalidades congênitas e casos de autismo, suplantando o diagnóstico anteriormente feito pelo cariótipo simples, nessas e em outras inúmeras patologias (Separovic ER, 2012).

As CNVs são variantes estruturais, que se caracterizam pordeleções, duplicações e inserções de regiões do DNA maiores que 1 Kb de tamanho ecom um número de cópias variável em relação a um genoma referência (Feuk *et*

al.,2006). Associações entre CNVs e determinadas doenças podem revelar novas regiões candidatas e genes relacionados com a patologia.

Para que possamos qualificar o quão relevante possa ser uma CNV para a doença em estudo, são feitas análises de sobreposição com bancos de dados de CNVs relatadas em indivíduos normais (Database of Genomic Variants – DGV:http://dgv.tcag.ca) e também com banco de dados de CNVs em indivíduos com fenótipo alterado (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources-DECIPHER:http://decipher.sanger.ac.uk); além da análise de tamanho, tipo de CNV e conteúdo gênico (Vermeesch *et al.*,2007, Rigs *et al*.,2019)

As técnicas de *microarrays*: *Comparative Genomic Hybridization Array* (*array*-CGH) e *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-*array*) são plataformas bastante robustas capazes de detectar CNVs tão pequenas quanto 20 Kb (Miller *et al.*, 2010). Além disso, permitem a identificação de mosaicismos (10-30%) e perda de heterozigose de uma maneira rápida e acurada (Kulikowski *et al.*,2013, Achermann *et al.*, 2015).

A “cariotipagem molecular” tem sido amplamente utilizada no campo da endocrinologia, se mostrando ferramenta útil na elucidação de inúmeras doenças como: obesidade severa de início precoce, hipotireoidismo congênito, genitália atípica, baixa estatura e IOP, entre outros (Ledig *et al*.,2010, Aboura *et al*., 2008, Schaaf *et al*., 2011).

As causas genéticas de IOP são muito heterogêneas e as técnicas diagnósticas com uma ampla investigação do genoma são as mais indicadas na pesquisa etiológica. Estudos utilizando essas plataformas de alta resolução, como CGH-*array*e SNP-*array*, tem identificado CNVs tanto ligadas ao cromossomo X, como em autossomos, afetando lócus com possível papel na fertilidade feminina, além da descoberta de novos genes com um papel importante no desenvolvimento ovariano (Aboura *et al*.,2009; Ledig *et al*.,2010; Quilter *et al.,*2010; Castranovo *et al*.,2014; McGuire *et al.,*2011; Norling*et al.,*2014; Jaillard*et al*.,2016; Tsuiko *et al.,*2016; Bestetti *et al.,*2019)

Baseados nessas evidencias, estudamos um grupo de pacientes com IOP de causa indeterminada, utilizando a técnica de *microarrays*, para que com esse

ensaio de alta resolução, pudéssemos detectar de forma rápida e acurada, desequilíbrios genômicos associados ao fenótipo de IOP.

1.4) JUSTIFICATIVA

A maioria das pacientes com diagnóstico de insuficiência ovariana primária permanece classificada como de etiologia idiopática, ou seja sem causa conhecida. Acreditamos que uma grande parcela delas, possa ter esse distúrbio esclarecido do ponto de vista molecular, desde que estudadas com metodologias adequadas. As novas técnicas disponíveis, como o sequenciamento de alta performance e a análise cromossômica por*microarrays*, permitem a avaliação de todo o genoma de forma rápida e eficaz.

A relevância do estudo molecular dos pacientes portadores de IOP está na possibilidade de se estabelecer um diagnóstico etiológico definitivo e rápido assim como a identificação de novos genes candidatos.

O diagnóstico de uma anormalidade genética em uma paciente com IOP também pode permitir o rastreamento e o aconselhamento de outras mulheres da família, portadoras da mesma alteração gênica, mas em fases precoces da doença e com possibilidade de orientação para preservação de fertilidade.

2) OBJETIVO

2.1) OBJETIVO PRINCIPAL

Pesquisar a presença de deleções ou duplicações submicroscópicas raras em um grupo selecionado de pacientes com Insuficiência Ovariana Primária utilizando o método de análise cromossômica por *microarray*

2.2) OBJETIVO ESPECÍFICO

-Avaliar a correlação entre variações do número de cópias genômicas patogênicas que justifiquem o fenótipo de Insuficiência Ovariana Primária em um grupo selecionado de pacientes.

-Identificar novas regiões cromossômicas e/ou novos genes possivelmente relacionados à etiologia da insuficiência ovariana primaria

3) PACIENTES E MÉTODOS

3.1) CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 07/04/2008, protocolo nº 1226/07. Todos os pacientes ou seus responsáveis assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação no protocolo clínico, coleta das amostras de sangue e análise de DNA segundo as normas do Comitê de Ética.

3.2) PACIENTES

Setenta e cinco pacientes com Insuficiência Ovariana Primária foram selecionadas: 53 portadoras de amenorréia primária e 22 portadoras de amenorréia secundária.

Os dados de exame físico geral e exame da genitália externa no momento do início do acompanhamento na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - A1MN 1003 foram coletados retrospectivamente das anotações dos prontuários, assim como os resultados dos exames laboratoriais e hormonais realizados na investigação diagnóstica. Nos anexos 1 e 2 segue a descrição da abordagem clinico-laboratorial realizadana investigação das pacientes**.**

<u>Critérios de seleção de pacientes para o estudo</u>

As pacientes selecionadas para o estudo foram acompanhadas no Ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (Unidade A1MN 1003) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Todas as pacientes apresentavam idade inferior a 35 anos, queixa de amenorreia primária ou secundária e níveis séricos elevados de gonadotrofinas, com predomínio de FSH em relação ao LH e hipoestrogenismo.

Amenorréia primária foi definida como ausência de ciclos menstruais em mulheres sem desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e idade cronológica igual ou superior a13 anos.

Amenorréia secundária foi definida como a ausência de menstruação por mais de quatro ciclos consecutivos, em mulheres que apresentavam previamente ciclos menstruais regulares, ou ausência de menstruação por mais de seis meses naquelas mulheres cujos ciclos eram irregulares.

Todas as pacientes apresentaram cariótipo 46,XX sem anormalidades numéricas ou estruturais identificadas pela técnica de bandamento cromossômico G (mínimo de 20 células analisadas)

Critérios de exclusão de pacientes para o estudo

Pacientes com causas conhecidas de insuficiencia ovariana primária, a saber: etiologia auto-imune, secundária a procedimentos cirúrgicos ou quimioterápicos ou portadoras de anormalidades cromossômicas identificadas no cariótipo, foram excluídas do estudo.Pacientes em que foram encontradas variantes alélicas patogênicas em genes que reconhecidamente participam da via de determinação ovariana ou que foram previamente relacionados ao desenvolvimento de insuficiência ovariana, estudadas com as técnicas de sequenciamento paralelo em larga escala por painel gênico customizado, foram excluídas desse estudo.A pesquisa de pré-mutação do gene *FMR1* foi realizada utilizando a técnica de Triplet primed PCR (TP-PCR). As pacientes nas quais foi identificada a presença de pré-mutação do *FMR1* foram excluídas do estudo.

Caracterização da coorte de pacientes

A coorte foi constituída por 75 indivíduos, sendo 53 com amenorréia primária (71%) e 22 com amenorréia secundária (29%).

Grupo I- Pacientes com IOP e Amenorréia Primária

Este grupo foi constituído por 53 pacientes que apresentavam ao exame físico ausência de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e relatavam ausência de menarca. A média da idade de diagnóstico das pacientes foi de 17,4 anos (variando de 13 a 30 anos). Quinze casos familiais (28%) oriundos de oito famílias e 38 casos (72%) esporádicos foram identificados. História de consanguinidade parental foi relatada em 12 pacientes (23%). Todas as pacientes deste grupo apresentavam níveis elevados das gonadotrofinas séricas; com predomínio dos valores de FSH em relação aos do LH e valores séricos de estradiol inferiores aos valores normais para a fase folicular (Tabela 3). Em duas pacientes (denominadas 51 e 66) foi observada a presença de clitoromegalia (2,8 e 2,5 cm) isolada, sem outros sinais de virilização, associada a valores elevados de testosterona sérica. A descrição da investigação diagnóstica destas pacientes esta relatada no **Anexo 3**.

A ultrassonografia pélvica suprapúbica foi realizada durante a investigação deste grupo de pacientes, por diferentes profissionais em diferentes serviços médicos utilizando diferentes aparelhos de ultrassonografia. Nestas condições, os exames evidenciaram: útero de volume reduzido em todas as pacientes e ovários de tamanhos diminuídos (volume < $2cm^3$) ou não visualizados (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários de 3 a 10 cm^3).

Tabela 2: :Dados clínicos e laboratoriais de 53 pacientes portadoras de insuficiencia ovariana primária e amenorréia primária

VARIÁVEIS	**Nº**
IDADE INÍCIO DE ACOMPANHAMENTO (anos)	
Média (dp)	17,4 (4,1)
Mediana (min-máx)	16,5 (13-30)
IDADE INÍCIO TERAPIA HORMONAL (anos)	
Média (dp)	18,3 (4,3)
Mediana (min-máx)	17 (14-30)
FSH (UI/L)	
Média (dp)	100,3 (37,2)
Mediana (min-máx)	99 (30,6-183)
Valor normal na fase folicular: 3,5 a 12,5	
LH (UI/L)	
Média (dp)	36,9 (15,6)
Mediana (min-max)	41 (11-65)
Valor normal na fase folicular: 2,4 a 12,6	
ESTRADIOL (pg/mL)	<13
Valor normal na fase folicular: 20-233	
TESTOSTERONA (ng/dl)	
Média (dp)	38,76 (39,9)
Mediana (min-máx)	15 (<14-142)
Valor normal na fase folicular: <12-48	

dp: desvio padrão, min: mínimo, máx: máximo

Neste grupo de pacientes, onze indivíduos apresentavam características fenotípicas sindrômicas (como por exemplo: palato ogival, cúbito valgo, baixa estatura, sindactilia, encurtamento do quarto metacarpo, entre outras), (**anexo 4**). Ainda no grupo I houve uma paciente com doença de Wilson e ceratocone, outra paciente com retinite pigmentosa e por último uma com eflúvio telógeno crônico.

Grupo II- Pacientes com IOP e Amenorréia Secundária

Este grupo foi constituído por 22 pacientes que apresentavam ao exame físico desenvolvimento completo dos caracteres sexuais secundários e relatavam cessação dos ciclos menstruais. A idade de menarca destas pacientes variou entre 11e 18 anos e a cessação dos ciclos menstruais ocorreu entre 12 e 35 anos de idade (tabela 4). A média da idade de diagnóstico das pacientes foi de 21,5 anos (14 aos 37 anos). Apenas 1 caso familial (4,5% dos casos) foi identificado e história de consanguinidade parenteral não foi relatada nesse grupo.

Todas as pacientes deste grupo apresentavam níveis elevados das gonadotrofinas séricas; com predomínio dos valores de FSH em relação aos do LH e valores séricos de estradiol inferiores aos valores normais para a fase folicular (tabela 4). Em uma das pacientes (denominada paciente 7) desse grupo a presença de clitoromegalia (medida de 4,5 cm) foi observada, associada a níveis aumentados de testosterona sérica. A descrição da investigação diagnóstica desta paciente está relatada nos **Resultados** (paciente 7).

Dentre os indivíduos com amenorréia secundária, houve uma grande heterogeneidade dos achados da ultrassonografia pélvica, variando entre útero hipoplásico e ovários não visualizados, à útero de tamanho habitual e ovários de volume acima de 2,0 cm^3e menores que 10 cm^3 (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários 3 a 10 cm^3).

Tabela 3: Dados clínicos e laboratoriais de 22 pacientes portadoras de insuficiência ovariana primária e amenorréia secundária

VARIÁVEIS	**Nº**
IDADE DA MENARCA (anos)	
Média (dp)	13,7 (2,0)
Mediana (min-max)	13,5 (11-18)
IDADE INÍCIO DE ACOMPANHAMENTO (anos)	
Média (dp)	22,8 (7,0)
Mediana (min-máx)	22,75 (12-35)
IDADE INÍCIO TERAPIA HORMONAL (anos)	
Média (dp)	23,2 (6,8)
Mediana (min-máx)	21,5 (14-37)
VALOR DE FSH (UI/L)	
Média (dp)	76,5 (22)
Mediana (min-máx)	82 (40-109)
Valor normal na fase folicular: 3,5 a 12,5	
VALOR DE LH (UI/L)	
Média (dp)	36,4 (15,5)
Mediana (min-max)	38 (18-61,09)
Valor normal na fase folicular: 2,4 a 12,6	
VALOR DO ESTRADIOL (pg/ml)	
Média (dp)	13,3 (6,5)
Mediana (min-max)	13(4,9-25)
Valor normal na fase folicular: 20-233,0	
VALOR DE TESTOSTERONAL (ng/dl)	
Média (dp)	27,4(25,9)
Mediana (min-max)	14 (<14-99)
Valor normal na fase folicular: <12-48	

dp: desvio padrão, min: mínimo, máx: máximo

No grupo II, apenas duas pacientes apresentavam características sindrômicas (**Anexo 4**).

3.3) MÉTODOS

3.3.1) Extração do DNA genômico

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos arrolados na pesquisa. O DNA foi extraído de acordo com os procedimentos padronizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo e foram armazenados no Banco de DNA do respectivo laboratório.

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75. As amostras foram mantidas congeladas a – 20 ^{o}C até seu uso.

3.3.2) Metodologia *Polimorfismo de nucleotídeo único array* (*SNP-array*)

O *CytoScan™ HD Array da Affymetrix* permite uma cobertura muito ampla do genoma humano. Possui 2,67 milhões de marcadores para análise do número de cópias, incluindo 750.000 SNP e 1,9 milhões de sondas não polimórficas, permitindo a detecção de aberrações no número de cópias a partir de 25-50 kb além de identificar perdas de heterozigose e mosaicismos acima de 20%.

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Oncologia Experimental (LIM24) da FMUSP.

A plataforma *CytoScan™ HD Array da Affymetrix* foi utilizada para a realização da técnica de SNP-array de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização do experimento foram utilizados 5 µL de DNA a uma concentração final de 50 ng/µL. O ensaio *Cytoscan* foi desenhado para processar de 8 a 24 amostras, incluindo um controle positivo (DNA genômico do kit reagente *Cytoscan*), esse controle é usado apenas para a reação e não para análise dos dados gerados; é utilizado para verificar possíveis problemas com

as amostras e/ou com a reação. Todas as etapas abaixo foram extraídas do manual do usuário CytoScan Affymetrix. (User Manual CytoScan AffymetrixAssay, 2011-2012)

Etapa 1- Digestão e ligação

Digestão do DNA por reagentes específicos fornecidos pelo fabricante no kit (*Digestion Master Mix*) à temperatura de 37 ° C por 2 horas no programa *Cytoscan Digest*. O próximo estágio foi o de ligação e para isso é usada a enzima T4 DNA *Ligase* associada a um mix específico fornecido pelo fabricante (*Ligation Master mix*) que foi adicionado a cada amostra e aos controles seguindo o *Cytoscan Ligate Program* a 16 ° C por 3 horas.

Etapa 2- PCR, purificação e quantificação

Foi realizada a etapa de amplificação genômica, na qual as amostras foram incubadas a 37°C por 20-24 horas. Essa etapa se iniciou com a diluição do DNA ligado com o reagente *Affymetrix Nuclease- Free Water,* seguido pela transferência das amostras diluídas para a placa de PCR e adição do Primer de PCR e outros reagentes fornecidos pelo fabricante (10X TITANIUM *Taq* PCR Buffer, 50X TITANIUM *Taq* DNA Polimerase, GC-MELT Reagent e dNTP Mixture). A placa de PCR foi colocada no programa *PCR Cytoscan*e os produtos amplificados foram avaliados em um gel corado por brometo de etídio.

O produto de PCR foi transferido para um tubo *eppendorf,* ao qual foi adicionado uma solução de purificação (*purification beads*). Para que ocorresse a ligação do DNA amplificado às *beads* esta solução final foi submetida a um período de incubação. Após a centrifugação dessa solução (3 minutos em alta velocidade) os tubos foram levados a uma plataforma magnética, de maneira a retirar e descartar o sobrenadante mantendo-se o produto ligado às *beads (beads pellets)*. Etapas de lavagem com tampão até a completa limpeza dos *beadspellets* são realizadas, seguindo-se a transferência de cada amostra purificada para uma nova placa.

As amostras purificadas foram lidas em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260, 280 e 320 mm para a caracterização da pureza do material. As OD 280 e OD 320 foram usados como controles.

Etapa 3A- Fragmentação, rotulação, hibridação

Etapa 3B- Lavagem, coloração e leitura pelo scanner

As amostras purificadas foram misturadas a um mix enzimático de fragmentação, e submetidas ao programa de fragmentação *Cytoscan* por 35 minutos a uma temperatura de 37° C. Os reagentes: tampão 5X TdT, reagente DNA Labeling e TdT foram adicionados às amostras já fragmentadas e submetidas ao programa de marcação *Cytoscan* por 4 horas a uma temperatura de 37° C. Para a realização da etapa de hibridação, um *mix master de hibridação* fornecido pelo fabricante foi adicionado às amostras, e processado no programa de hibridação da *Cytoscan* por 10 minutos a 95° C, seguido por uma etapa de incubação dessas amostras a 50° C por aproximadamente 16 horas para que ocorresse a hibridação das amostras com as sondas específicas.

Terminadas essas etapas, os *arrays* foram lavados com reagentes específicos para que se iniciasse o processo de coloração de acordo com a complementariedade das bases do DNA estudadas com as sondas (*GeneChip® Fluidics Station* 450-para lavagem e marcação). A intensidade dos sinais foi medida por um scanner específico (*GeneChip® Scanner* 3000 7G) e a análise foi realizada com o auxílio de um *software* específico (*AGCC software Version 3.2.2*) disponibilizado pelo fabricante (Obs: para a análise, o *software* vem com uma referência gerada a partir de 380 indivíduos saudáveis, e nossas amostras foram analisadas comparando seus respectivos sinais, com o dessa referência)

Alterações de número cópias genômicas frequentes na população em geral (*banco de dados Database of Genomic Variants*) foram consideradas polimorfismos e excluídas de análises posteriores

3.3.3) Metodologia *Hibridação Genômica Comparativa baseada em microarranjos (array-CGH)*

A presença de alterações de número de cópias genômicas (duplicações e deleções) foi investigada pela técnica de hibridação genômica comparativa baseada em microarranjos (*array-CGH*). Foi utilizada a plataforma *SurePrint G3 Human* CGH 4x180K (Agilent Technologies, Califórnia, USA), *oligoarrays* que contêm quatro áreas, cada uma delas com aproximadamente 180.000 oligonucleotídeos de 60pb. Os procedimentos de marcação e purificação das amostras, hibridação e lavagem foram realizados conforme descrito pelo fabricante (Agilent Technologies, Califórnia, USA), com modificações desenvolvidas no Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Na etapa de fragmentação de DNA genômico, amostras de aproximadamente 800 ng de DNA genômico foram fragmentadas por 10 minutos a 95ºC em banho seco. Foi utilizado o kit *Agilent Labelling mix* (Agilent Technologies, Califórnia, USA) para marcação das amostras de DNA com fluoróforos; resumidamente, foram adicionados *random primers* e tampão à reação da digestão, seguindo-se a desnaturação do DNA por 3 min a 95ºC e a incubação em gelo por 5 min. Para a marcação, foram adicionados dNTPs, Cy3-dCTP (para a amostra teste) e Cy5-dCTP (para a amostra referência) e enzima *Klenow*. As amostras foram mantidas por duas horas a 37ºC em banho seco, procedendo-se em seguida à inativação da enzima por 10 min a 65ºC. As amostras marcadas foram purificadas utilizando-se *Illustra*^{TM} *ProbeQuant*^{TM} *G-50 Micro Columns* (*GE Healthcare*), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA genômico marcado e a atividade específica dos fluorocromos Cy3-dCTP e Cy5-dCTP foram determinadas no espectrofotômetro *NanoDrop* ND-1000 (*NanoDrop Technologies*). Na etapa de precipitação, 50 μL do DNA teste (marcado com Cy3) e 50 μL do DNA referência (marcado com Cy5) foram adicionados a 10 μg de *Human* Cot-1DNA (*Invitrogen*), para o volume final de 105 μL. Em seguida, foram adicionados NaAc (3 M, pH 5,0; 10% do volume final) e etanol 100% gelado (2,5X o volume final). As amostras foram precipitadas por 15 min a -80ºC ou por duas horas a -20ºC, seguido por centrifugação a 13.200 rpm por 15 min a 4ºC. O DNA marcado foi então ressuspendido em TE

(Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) previamente aquecido a 72ºC e mantido por 2 min a 72ºC, seguindo-se nova ressuspensão em vórtex. Para hibridação foi utilizado o *Agilent Oligo a-CGH Hybridization kit* (*Agilent Technologies*, Califórnia, USA), com adição das soluções *blocking solution* 10X e *hybridization buffer* 2X e desnaturação por 3 min a 95ºC, seguindo-se 30 min a 37ºC. Adicionou-se todo o volume das amostras à lâmina de suporte do *microarray* (*GASKET slide*), com superposição da lâmina de *microarray* sobre ela. A hibridação ocorreu a 65ºC por aproximadamente 20 horas. Após esse período, as lavagens foram realizadas em *Buffer* 1 por 5 min, em *Buffer* 2 (previamente aquecido a 37ºC) por 1 min, seguindo 10s em acetonitrila (*Sigma-Aldrich*, Missouri, USA).

As imagens do *microarray*, obtidas com o *Agilent High-Resolution Microarrayscanner*, foram processadas e analisadas utilizando o pacote de programas*Feature Extraction* e *Agilent Genomic Workbench* (ambos da *Agilent Technologies*), usando o algoritmo estatístico ADM-2 e o limiar de sensibilidade 6,0. Apenas as alterações de número de cópias abrangendo no mínimo 3 oligonucleotídeos consecutivos com razão $\log_2$ Cy3/Cy5 alterada foram consideradas como possíveis alterações de ganhos ($\log_2$ Cy3/Cy5 > 0.4) ou perdas ($\log_2$ Cy3/Cy5 < 0.4) de determinado segmento genômico. Todas as alterações identificadas pelo software seguindo os parâmetros descritos acima foram visualmente inspecionadas.

Alterações de número cópias genômicas frequentes na população em geral (*banco de dados Database of Genomic Variants*) foram consideradas polimorfismos e excluídas de análises posteriores.

3.3.4) Análises dos *microarrays*

As coordenadas genômicas dos segmentos cromossômicos considerados CNVs na análise dos *microarrays* foram apresentadas de acordo com o *Human Genome Building* GRCh37/hg19 (*Genome Reference Consortium Human Genome:* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc)

Todas as variações encontradas nas pacientes foram comparadas com os dados de CNVs detectadas em indivíduos sem doenças genéticas referidas

(controles), compilados nos bancos de dados *Database of Genomic Variants* – DGV (http://projects.tcag.ca/variation)

O banco de dados DGV compila CNVs detectadas em mais de 20.000 indivíduos saudáveis estudados, e tem sido usado como referência de população controle em inúmeros estudos (MacDonald *et al*, 2013). As CNVs reportadas com frequência elevada nesses bancos de dados foram consideradas polimorfismos, portanto provavelmente sem relação com o fenótipo em análise, sendo assim excluídas nesse presente estudo.

Após isso, analisamos se as coordenadas genômicas das alterações identificadas nas pacientes apresentavam sobreposição com os desequilíbrios genômicos de um banco de dados de indivíduos portadores de doenças genéticas congênitas: *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resource*- DECIPHER (http://decipher.sanger.ac.uk/). Os fenótipos descritos para tais pacientes portadores de CNVs sobrepostas às de nossas pacientes foram inspecionados para verificar sobreposição com o fenótipo do presente estudo.

A última etapa foi analisar o conteúdo gênico das CNVs encontradas, utilizando a ferramenta *Genome Browser* UCSC (*University of California, Santa CruzGenome Browser*: http://genome.uscs.edu). Para análise do papeldos genes contidos nos segmentos dessas CNVs, consultamos o banco de dados OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Men*; http://www.nvbi.nlm.nih.gov/omim), *PubMed* (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), *Ovarian Kaleidoscope Database* (http://okdb.appliedbioinfo.net/) e *Mouse Genome Informatics* (http://www.informatics.jax.org/)

A avaliação conjunta desses dados para cada alteração detectada foi a base para sua classificação de acordo com o efeito clínico provável (patogenicidade), considerando os critérios utilizados no *Consensus Statement of Chromosomal Microarray,* assim como as publicações de Lee *et al*, que se encontram na Tabela 4. (Miller *et al*.,2010; Lee *et al*, 2007)

Tabela 4: Critérios utilizados para a classificação das CNVs de acordo com sua patogenicidade

Critériosprincipais	**CNVs patogênicas**	**CNVs benignas**
Alteração sobreposta a regiões descritas em indivíduos saudáveis como apresentando número de cópias variável em frequência aumentada (por exemplo, DGV)		X
Alteração sobreposta a regiões com duplicações e deleções reportadas em pacientes com fenótipos alterados (por exemplo, DECIPHER)	X	
CNV contém gene(s) OMIM(categoria *morbid*) ou járelacionados a doenças genéticas (PubMed)	X	
CNV rica em genes	X	
CNV pobre em genes		X
Critérios secundários		
CNV é uma deleção	X	
CNV é uma duplicação		X
CNV é uma amplificação (ganho de mais de uma cópia)	X	
CNV de tamanho > 3 Mb	X	
CNV não tem genes e é desprovida de elementos regulatórios conhecidos		X

DGV*: Database of Genomic Variants*, DECIPHER: *Database of Chrmossomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources,* OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*. (adaptada de Lee *et al*)

Considerando os critérios descritos acima as CNVs foram classificadas como:

1. ***1.*** **Patogênicas**- preenche todos os critérios maiores: a CNV faz sobreposiçãoa regiões com alterações de número de cópias descritas em pacientes com fenótipos alterados, é uma região rica em genes e contém genes reconhecidamente relacionados a doenças (OMIM e *PubMed*).
2. **Provavelmente patogênica**- preenche parcialmente os critérios das patogênicas. Exemplos: alterações não reportadas no DGV com tamanho acima de 3 Mb, contendo genes, OMIM ou não; alterações que não contem genes OMIM mas abrangem regiões regulatórias conhecidas que reconhecidamente alteram o funcionamento de genes se deletadas ou amplificadas e por último alterações não reportadas no DGV que englobam gene diretamente associado ao fenótipo, independente do tamanho.
3. **Benignas**- todas aquelasCNVs que foram amplamente relatadas no banco de dados de indivíduos saudáveis- DGV
4. **Variantes de Significado Clínico Incerto (VUS)-** CNVs que não foram descritas no banco de dados de indivíduos saudáveis-DGV; ou seja não podem ser classificadas como benignas, mas também não fecharam critérios para serem consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas.
5. **Provavelmente benigna-** preenche parcialmente os critérios de benigna. Exemplo: CNVs contendo genes OMIM, porém amplamente descritas no banco de dados DGV.

Análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado clínico incerto

No intuito de caracterizarmos o conteúdo gênico e o relacionarmos com o fenótipo de Insuficiência Ovaria Primária, lançamos mão de ferramentas de bioinformática acessíveis na rede e que funcionam como facilitadoras de pesquisa clínica (Tabela 5)

Tabela 5: Ferramentas utilizadas de análise de bioinformática

FERRAMENTA	URL	ANÁLISE
UCSC	http://genome.ucsc.edu/	Avaliação das posições genômicas dos desbalanços, denotando conteúdo gênico
DGV	http://projects.tcag.ca/variation/	Avaliações dos desbalanços genômicos na população saudável
DECIPHER	http://decipher.sanger.ac.uk/	Banco de dados de indivíduos não saudáveis. Foi utilizado na busca de outros indivíduos portadores de IOP com desequilíbrios genômicos que se sobrepusessem aos dos nossos pacientes
OMIM	http://www.nvbi.nlm.nih.gov/omim	Busca de genes já relacionados à fenótipo em humanos
Pub Med	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	Pesquisa da correlação entre genes encontrados e fenótipo em estudo
Ovarian kaleidoscope database	http://okdb.appliedbioinfo.net/	Pesquisa da relação do conteúdo gênico encontrado nas CNVs com a fisiologia ovariana

URL – Uniform Resource Locator. UCSC- University of California, Santa Cruz Genome Browse. DGV- Database of Genomic Variants. DECIPHER- Database of Chrmossomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man

Na análisedas CNVs identificadas e conteúdo gênico, todas as ferramentas enumeradas na Tabela 5 foram utilizadas.

Lançamos mão também, de algumas outras ferramentas, a saber:

-*Mouse genome informatics* (http://www.informatics.jax.org/): pesquisa de genes relacionados ao fenótipo em estudos animais

-gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/):faz a análise de tolerabilidade da variação de perda de função-LoF.

-*The Human Protein Atlas* (https://www.proteinatlas.org/):com o objetivo de, em alguns casos, analisar individualmente a expressão gênica nos diversos tecido

4) RESULTADOS

Características das CNVs identificadas nesta coorte de pacientes com IOP

Dezenove CNVs raras foram identificadas em dezoito pacientes (24% dos casos estudados). Destas, cinco CNVs foram classificadas como patogênicas, duas CNV como provavelmente patogênica e doze CNVs como VUS.

As CNVs se apresentaram com as seguintes características:

- **Tamanho:** entre 0,10 a 41,4 Mb, sendo que todas as patogênicas tinham tamanho maior ou igual a 1Mb e todas as patogênicas e provavelmente patogênicas foram ricas em conteúdo gênico.

- **Tipo:** ao todo foram sete deleções e doze duplicações, conforme representado esquematicamente na figura 3:

Figura 3- Resumo dos resultados do *microarray* no grupo estudado

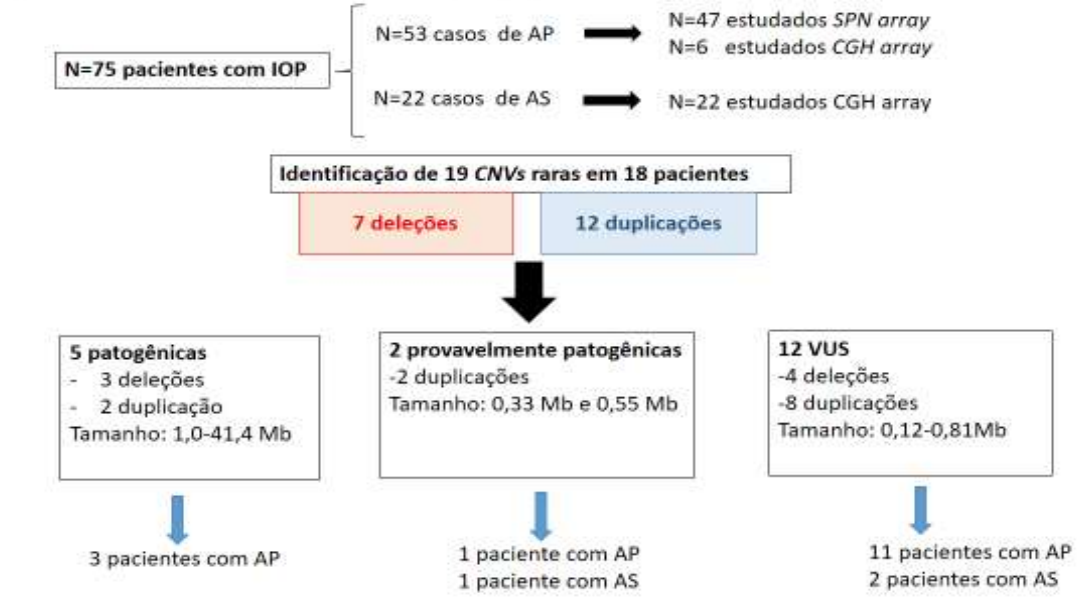

Figura 3: Resumo dos resultados do microarray no grupo de mulheres poratdoras de IOP estudadas. AP-amenorréia primária; AS-amenorréia secundária; VUS-variante de significado incerto

Dentre as CNVs classificadas como patogênicas e provavelmente patogênicas, houve uma maior prevalência de duplicações (4 em 7 duplicações); esse mesmo padrão foi observado nas CNVs classificadas como VUS (8 em 12 duplicações) (Tabela 6).

Os desequilíbrios genômicos foram identificados mais frequentemente em autossomos (14 CNVs), correspondendo a 74% de todas as CNVs raras encontradas nesta coorte de pacientes. Apenas cinco CNVs estavam localizadas no cromossomo X (26% das CNVs identificadas), porem três delas foram categorizadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, representando 43% das CNVs com maior potencial de associação a doença (Tabela 6).

As CNVs raras ocorreram com maior frequência nas pacientes com amenorréia primária (16 CNVs em 15 pacientes); uma prevalência de 28% nesse grupo e de 20% considerando-se toda a coorte de pacientes avaliadas. Nas pacientes com amenorréia secundária (três CNVs em três pacientes) observamos uma prevalência de 14% nesse grupo de pacientes e 4% considerando-se toda a coorte.

Quatro porcento das CNVs raras encontradas nesta coorte de IOP ocorreram em casos familiais e em 5% foi relatado pelas pacientes consanguinidade parental (Tabela 6)

Todas as CNVs classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas apresentavam conteúdo gênico rico. Em relação às VUS, quatro delas não apresentaram genes em sua extensão (Tabela7).

Tabela 6: Categorização de acordo com a patogenidade das CNVs encontradas e achados clínicos

Lócus	Coordenadas genômicas (hg19)[1]	CNV tamanho (Mb)	Tipo de CNV	Classificação	Paciente	Idade início IOP	Achados clínicos	Caso familiar	Consanguinidade Parental
1p31.1	Chr1:78617051_79429792	0,81	dup	VUS	IOP 5	18	-	não	não
2p23.1	Chr2:31451382_31629439	0,18	del	VUS	IOP 11	15	Encurtamento 4ºmetacarpo, palato ogival	não	não
2q23.3	Chr2:154541630_154674188	0,13	del	VUS	IOP 14	AP	-	ND	sim
2q37.3	chr2:239074572_239629478	0,55	dup	Prov patogênica	IOP 4	AP	-	sim	sim
5q23.2	Chr5:124700962_125131805	0,43	dup	VUS	IOP 6	AP	cúbito valgo, retardo mental leve, discreto epicanto,	não	não
7p22.1	Chr7:5749102_6065236	0,32	dup	VUS	IOP 8	AP	dentes extranumerários, manchas café com leite	ND	não
9p24.1	Chr9:6973531_7090261	0,12	dup	VUS	IOP 15[2]	AP	-	sim	sim
9p24.1	Chr9:6965885_7090261	0,12	dup	VUS	IOP 16[2]	AP	-	sim	sim
10p15.3	Chr10:992115_1168862	0,18	dup	VUS	IOP 12	AP	-	ND	ND
15q25.2	Chr15:83198902_84915080	1,7	del	Patogênica	IOP 2	AP	-	não	
11q22.3	Chr11:103636307_103760085	0,12	del	VUS	IOP 17	AP	cúbito valgo, déficit auditivo	ND	ND
19q13.43	Chr19:56379654_56705420	0,33	dup	Prov patogênica	IOP 7	13	Clitoromegalia	não	não
22q12.1	Chr22:29353366_29499619	0,15	dup	VUS	IOP 13	AP	encurtamento 4º metacarpo, palato ogival, cúbito valgo, hipertelorismo mamário	não	não
22q12.3	Chr22:36614296_36716248	0,1	dup	VUS	IOP 18	AP	-	não	não
Xp22.33	ChrX:2031805_2271484	0,24	dup	VUS	IOP 9	AP	-	não	não
Xq13.2	chrX:72142816_73135548	1	del	Patogênica	IOP 3	AP	Cúbito valgo	não	não
Xq21.31	ChrX:89691648_89878515	0,19	del	VUS	IOP 10	AP	Doença de Wilson, ceratocone	sim	sim
Xq27.2q28	ChrX:140666275_155233731	14,5	del	Patogênica	IOP 1	AP	Palato ogival, cúbito valgo	não	não
Xq22.1q27.1	ChrX:98752106_140159954	41,4	dup	Patogênica					
20p13	Chr20:61568_2761280	2,7	dup	Patogênica					

Dup- duplicação; del- deleção; AP- amenorréia primária; Mb- Megabase; Chr- cromossomo; Prov Patogênica- Provavelmente Patogênica; VUS- Variante de significado incerto; ND- não disponível; [1]posições genômicas estabelecidas de acordo com o *Human Genome Building* GCRh37, hg19; [2]Pacientes irmãs

Tabela 7: Genes contidos nas CNVs raras identificadas nesta coorte de pacientes com IOP

Lócus	Tamanho da CNV (Mb)	Tipo de CNV	Genes contidos na CNV	Genes Afetados, *n*	Genes OMIM, *n*	Paciente
CNVs patogênicas						
15q25.2	1,7	del	*RPS17[1], RPS17L[1], CPEB1, LOC283692, AP3B2[1], LOC338963, LOC28369. SCARNA15, FSD2, WHAMM, HOMER2[1], FAM103A1, C15orf40, BTBD1, MIR4515, TM6SF1, HDGFRP3, BNC1[1], SH3GL3, ADAMTSL3, EFTUD1P1, LOC100505679, LOC440300, LOC388152, LOC642423, GOLGA6L4*	26	5	IOP 2
Xq13.2	1	del	*LINC00684, FAM226B, FAM226A, PABPC1L2B, PABPC1L2A, NAP1L6, NAP CDX4, MAP2K4P1, CHIC1, TSIX, XIST[1]*	12	1	IOP 3
Xq27.2q28	14,5	del	*SPANXA2-OT1...FMR1[1], FMR2[1]… IL9[2]*	178	37	IOP 1
Xq22.1q27.1	41,4	dup	*XRCC6P5, NXF5, COL4A6[1], PGRMCI, XPNPEP2[1]…SPANXF1 [2]*	300	59	
20p13	2,7	dup	*DEFB125...EBF4[2]*	54	11	
CNVs Provavelmente Patogênicas						
2q37.3	0,55	dup	*ILKAP, LOC151174, LOC643387, HES6, PER2[1], TRAF3IP1[1], ASB1, LOC151*	8	2	IOP 4
19q13.43	0,33	dup	*NLRP4, NLRP5, NLRP8, NLRP13, ZNF444, GALP, ZSCAN5B, ZNF787*	8	0	IOP 7
Variante de significado incerto						
1p31.1	0,81	dup	*PTGFR, IFI44L, IFI44, ADGRL4*	4	0	IOP5
2p23.1	0,18	del	*XDH[1], EHD3, CAPN14*	3	1	IOP 11
2q23.3	0,13	del	*Sem genes*	0	0	IOP 14
5q23.2	0,43	dup	*Sem genes*	0	0	IOP 6
7p22.1	0,32	dup	*RNF216[1], ZNF815P, OCM, CCZ1, RSPH10B, RSPH10B2, PMS2[1], AIMP2[1], EIF2AK1[1]*	9	4	IOP 8
19q13.43	0,33	dup	*NLRP4, NLRP5, NLRP8, NLRP13, ZNF444, GALP, ZSCAN5B, ZNF787*	8	0	IOP 7
9p24.1	0,12	dup	*KDM4C*	1	0	IOP 15*
9p24.1	0,12	dup	*KDM4C*	1	0	IOP 16*
10p15.3	0,18	dup	*WDR37[1], IDI2, IDI2-AS1, IDI1, GTPBP4, AX748285*	6	1	IOP 12
11q22.3	0,12	del	*MIR4693*	1	1	IOP 17
22q12.1	0,15	dup	*ZNRF3, ZNRF3-AS1, C22orf31, KREMEN1[1]*	4	1	IOP 13
22q12.3	0,1	dup	*APOL2[1], APOL1[1], MYH9[1]*	3	3	IOP 18
Xp22.33	0,24	dup	*DHRSX*	1	1	IOP 9
Xq21.31	0,19	del	*Sem genes*	0	0	IOP 10

Dup- duplicação; del- deleção; Mb- Megabase; *n*- número; * irmãs; [1]genes OMIM; [2] conteúdo gênico no intervalo cromossômico>50 genes

Uma ampla análise do conteúdo gênico das CNVs raras foi realizada utilizando-se diferentes ferramentas de bioinformática (OMIM, *Pubmed*, *Ovarian Kaleidoscope Database* e *Mouse Genome Informatics*) porém nas pacientes 8, 9, 12, 17 e 18 essa análise não permitiu correlacionar os genes contidos nos seguimentos cromossômicos alterados a funções ovarianase/ou à fisiologia reprodutiva feminina.

Nas CNVs localizadas no cromossomo X, o conteúdo gênico identificado no SNP-*array* da paciente 1, é extremamente denso e vários genes contidos nessas regiões, como o *FMR1, FMR2*, *XPNPEP2, COL4A6, NXF5* e *PGRMCI,* já foram amplamente associados a IOP (Simpson.,2008; Qin *et al*.,2015;Parissone et al.,2020). Na última década, estudos de *microarray* e sequenciamente paralelo em larga escala permitiram a identificação de novos genes, como o *CPEB1* e *BNC1* relacionados a IOP (McGuire *et al*.,2011; Tsuiko *et al*.,2016; Zhang *et al*.,2018; Bestetti *et al*.,2019; França *et al*.,2020) Dentre as outras CNVs que apresentaram conteúdo gênico, identificamos os seguintes genes potencialmente envolvidos com a etiologia da IOP: *PTGFR, XDH, EHD3, PER2, KDM4C, NLRP5, ZNRF3* e *XIST.* Natabela 8estão dispostos os lócus onde se encontram e a função ovariana a que se relacionam.

Tabela 8-Novos genes candidatos e genes previamente associados à etiologia da IOP

Genes candidatos	Lócus	Função Ovariana[2]	Estudos em humanos e/ou em modelos animais
		Genes previamente associados a IOP	
CPEB1	15q25.2	Maturação oócito	Bestetti *et al*.,2019; França *et al*.,2020
BNC1[1]		Oogênese, Desenvolvimento embrionário precoce	Ma J *et al*.2006, Zhang *et al*.,2018
		Novos genes candidatos a IOP	
PTGFR	1p31.1	Ovulação, metabolismo esteroidal, luteólise	Berisha *et al*.,2019
XDH[1]	2p23.1	Metabolismo oxidativo, apoptose celular	Liu e Li *et al*.,2017
EHD3		Apoptose celular	Zielak *et al*.,2007
PER2[1]	2q37.3	Ovulação, metabolismo esteroidal	Shimizu *et al*.,2011
KDM4C	9p24.1	Desenvolvimento embrionário precoce	Wang *et al*.,2009
NLRP5	19q13.43	Desenvolvimento embrionário precoce,formação folículo primordial	Docherty *et al*.,2015, Mu *et al*.,2018 Fowler *et al*.,2009
ZNRF3	22q12.1	Desenvolvimento de células germinativas	Hao *et al*.,2012
XIST	Xq13.2	Desenvolvimento embrionário precoce	Simpson *et al*.,2008

[1]genes OMIM; [2]informações obtidas pelo site Ovarian Kaleidoscope Database (http://okdb.appliedbioinfo.net)

4.1) PACIENTES COM CNVs CLASSIFICADAS COMO PATOGÊNICAS E PROVAVELMENTE PATOGÊNICAS:descrição clínica e análise dos microarranjos genômicos

Paciente 1

A paciente procurou serviço médico aos 17 anos com queixa de amenorréia primária e ausência de desenvolvimento mamário, quando foi orientada ao uso de terapia de reposição hormonal feminina. Em nosso serviço, iniciou seguimento aos 24 anos em uso de reposição hormonal cíclica e relatando a presença de ciclos menstruais regulares em uso da reposição hormonal. Negava casos semelhantes ou infertilidade na família e consanguinidade parental. Neste momento, apresentava no exame físico Peso 63 kg, Estatura 166 cm (DP+0,45), IMC 22.8 Kg/m², desenvolvimento mamário e de pelos pubianos no estádio 5 de Tanner, genitália externa feminina, cúbito valgo e palato em ogiva, sem outros dismorfismos. Não houve relato de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, e tampouco foram percebidos déficits de cognição durante as consultas. Realizou os seguintes exames laboratoriais e de imagem em vigência do uso da reposição hormonal: FSH 99.1 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 45.1 UI/l (VN- 2.4 a 12.6 UI/L), estradiol 27 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml), testosterona 35ng/dl (VN- 30 a 60 ng/dl); ultrassonografia pélvica: volume uterino de 17,4cm³, ovário direito 2,7 cm³, ovário esquerdo 2,2 cm³ (valores de referência para menacme: útero 30 a 90 cm³, ovários 3 a 10 cm³). Nos antecedentes pessoais apresentava hipotireoidismo primário com anticorpo anti-peroxidade positivo.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayda paciente 1

Na análise por*SNP-array*, essa paciente apresentou uma duplicação de 41,4 Mb, seguida por uma deleção de 14,5 Mb no braço longo do cromossomo X, cujas coordenadas genômicas foram respectivamente: arr [GRCh37] Xq22.1q27.1(98752106_140159954) x3 e arr [GRCh37] Xq27.2q28(140666275_155233731) x1 (Figura 4).

O conteúdo gênico da duplicação do braço longo do X foi de 300 genes e dentre esses, 59 são genes OMIM *Morbid* (previamente relacionados a doenças em humanos) (Tabela 7). Essaregião abrange alguns genes que já foram previamente relacionados à IOP em humanos, a saber: *NXF5*, *COL4A6*, PGRMC*1* e*XPNPEP2* (Qin *et al*.,2015; Parissone *et al*.,2020).

Sobrepostos às coordenadas genômicas da duplicação no braço longo do cromossomo X arr[GRCh37] Xq22.1q27.1(98752106_140159954) x3, existem relatadas mais de 90 duplicações no banco de dados DECIPHER, a maior parte delas apresentava tamanho menor que a da nossa paciente (41,4 Mb). Entre essas descrições, se encontra a da paciente de número 319602 com uma triplicação de 14,9 Mb, que apresenta o fenótipo de insuficiência ovariana primária e anormalidades no sistema genito-urinário. Nas descrições de duplicações na região foi bastante comum o relato de atraso intelectual.

O conteúdo gênico da deleção em Xq27.2q28consistia em 178 genes e dentre esses, 37 eram genes OMIM *Morbid*. Os genes *FMR1* e *FMR2* contidos por inteiro nessa deleção*,*estão sabidamente associados a IOP. A pre mutação do *FMR1* é causa conhecida de IOP (Fortuño e Labarta.,2014) e Murray *et al*., associou a microdeleção do *FMR2* à 1,5% dos casos de IOP na coorte que estudou (Murray et al.,1999)

No banco de dados DECIPHER estão descritos mais de 100 pacientes com deleções que se sobrepõem às coordenadas genômicas arr[GRCh37]Xq27.2q28(140666275_155233731)x1, região deletada do braço longo do cromossomo X dessa paciente. Dentre essas descrições, está a paciente 265891, que tem sobresposta à região de CNV da paciente 1, uma deleção de 80,9 Mb, e também apresentou fenótipo de IOP, associado a outros achados, como: anormalidades do lobo da orelha, palato ogival, encurtamento de quarto metacarpo, hipoplasia hemifacial, estrabismo unilateral, atraso do desenvolvimento da fala e esteatose hepática. Entre os outros indivíduos, cujos desbalanços se sobrepunham a de nossa paciente, foi comum o relato de baixa estatura.

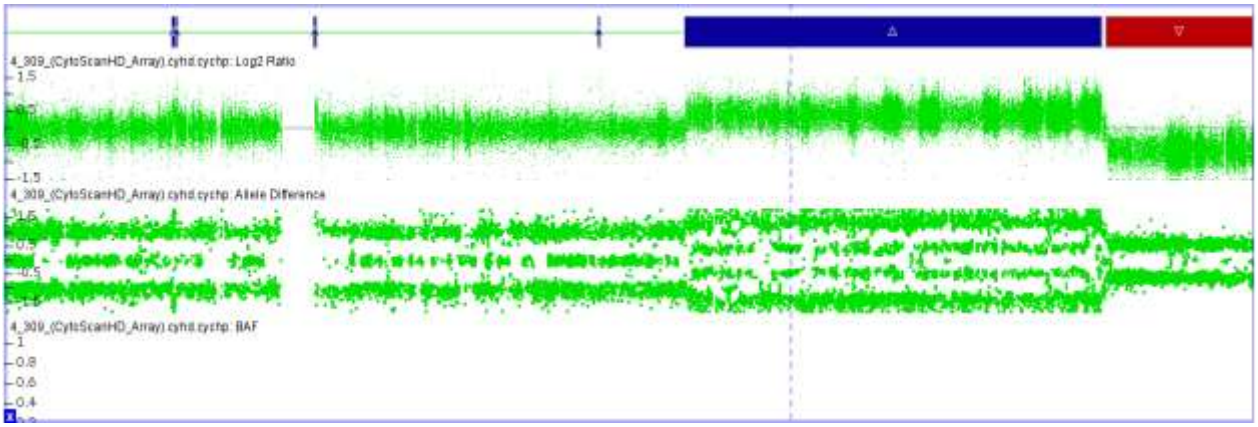

Figura 4- Dados derivados do SNP-*array* 2M Affymetrix, mostrando parte do braço longo do cromossomo X da paciente 1:a barra azul evidencia a extensão da duplicação identificada arr [GRCh37] Xq22.1q27.1(98752106-140159954) x3,com média de log2 ratio 0,5 das sondas da região duplicada (perfil de número de cópias na linha abaixo da barra azul); a barra vermelha evidencia a extensão da deleção identificada arr [GRCh37]Xq27.2q28(140,666,275-155,233,731)x1, com média de log2 ratio -0,5 das sondas da região deletada.Perfil de genotipagem por SNP mostrado abaixo (em *allele difference*). Imagem extraída do software AGCC version 3.2.2

Essa paciente apresentou também uma duplicação de 2,7 Mb no braço curto do cromossomo 20 (Figura 5), cujas coordenadas genômicas foram: arr[GRCh37] 20p13(20:61568_2761280)x3. Essa região continha 54 genes, e dentre esses 11 genes OMIM *Morbid:RBCK1* (610924), *TBC1D20* (611663), *CSNK2A1* (115440), *SLC52A3* (613350), *RSPO4* (610573), *PDYN* (131340), *TGM3* (600238), *TGM6* (613900), *SNRPB* (182282), *NOP56* (614154), *IDH3B* (604526).

No DECIPHER foram descritos 46 indivíduos com duplicações, cujas coordenadas genômicas se sobrepõem à duplicação no braço curto do cromossomo 20 apresentada pela paciente 1. Dentre os casos descritos, a paciente 1578 apresentava anormalidades da genitália feminina sem relato de IOP.

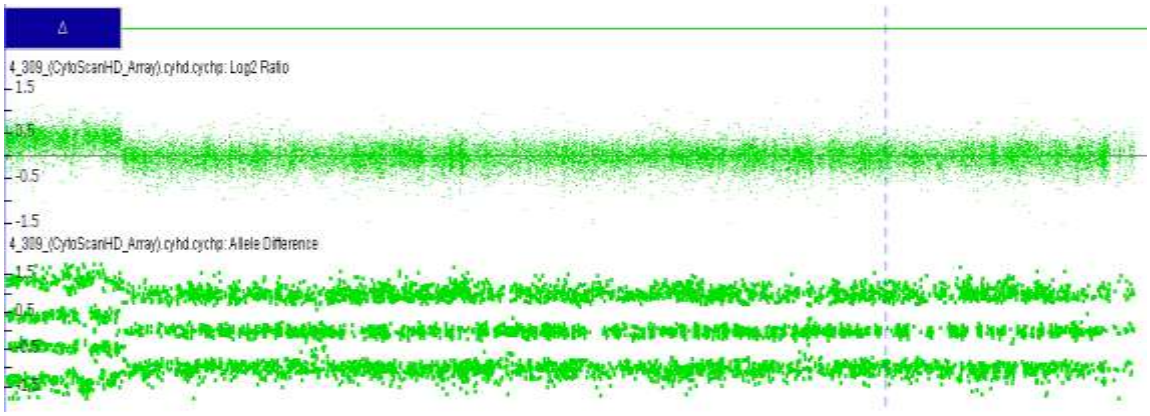

Figura 5- Dados derivados do SNP-*array*2M Affymetrix, mostrando parte do braço curto do cromossomo 20 da paciente 1: a barra azul evidencia a extensão da duplicação identificada arr [GRCh37]20p13(61568-2761280)x3] com média de log2 ratio 0,5 das sondas da região duplicada (perfil de número de cópias na linha abaixo da barra azul); perfil de genotipagem por SNP mostrado abaixo (em *allele difference*). Imagem extraída do software AGCC version 3.2.2

Os resultados da análise do microarray da paciente revelaram um rearranjo cromossômico complexo provavelmente secundário a uma translocação envolvendo o braço longo do cromossomo X e o braço curto do cromossomo 20. Não foi possível a realização de técnicas complementares, como Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), para a confirmação dessa hipótese diagnóstica por falta de acesso à paciente que atualmente não reside no país.

Paciente 2

A paciente 2 iniciou seguimento em nosso serviço aos 30 anos de idade. Aos 17 anos procurou serviço médico com queixa de amenorréia primária e ausência de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, quando iniciou reposição com estrogênios conjugados e medroxiprogesterona, que promoveram desenvolvimento mamário e ciclos menstruais regulares. Ao exame físico: peso 81.2 Kg, estatura 158 cm (DP+0,8), IMC 32,5 Kg/m², (obesidade grau I), mamas bem desenvolvidas- M5, pelos pubianos - P5 e genitália externa feminina, não foram observados estigmas nessa paciente. Os exames iniciais em nosso serviço, em uso irregular da reposição hormonal,evidenciaram: FSH 40.7 UI/L (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 20 UI/L (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol 11.1

pg/ml (VN- 20 a 233pg/ml), testosterona 24 ng/dl (30 a 60 ng/dl). A ultrassonografia pélvica suprapúbica evidenciou útero (volume 11 cm^3), sem evidência de eco endometrial, volume do ovário direito de 0,8 cm^3 e do ovário esquerdo de 1,0 cm^3, sem evidência de folículos em ambos os ovários (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários 3 a 10 cm^3)

Ao longo do acompanhamento essa paciente apresentou transtorno depressivo e obesidade severa, e após a estabilização do quadro depressivo realizou cirurgia bariátrica. Na história familiar negou outros casos semelhantes e negou também a presença de consanguinidade.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayda paciente 2

A análise por SNP-*array* identificouuma deleção no cromossomo 15 de aproximadamente 1,7 Mb, com as seguintes coordenadas genômicas:arr [GRCh37]15q25.2(83228992_84847653)x1 (Figura 6).Essa região contém 26 genes: *RPS17, RPS17L*, *CPEB1, LOC283692, AP3B2, LOC338963, LOC283693, SCARNA15, FSD2, WHAMM, HOMER2, FAM103A1, C15orf40, BTBD1, MIR4515, TM6SF1, HDGFRP3, BNC1, SH3GL3, ADAMTSL3, EFTUD1P1, LOC100505679, LOC440300, LOC388152, LOC642423, GOLGA6L4* (Tabela 7). Todos os genes estão contidos por inteiro na deleção, com exceção do *CPEB1* e *LOC100505679,* que estão parcialmente contidos .O gene *RPS17* foi descrito associado à Anemia Diamond-Blackfan 4 (OMIM #612527), condição de herança dominante; o gene *AP3B2* está associado à Encefalopatia epiléptica e Desenvolvimento 48 (OMIM #617276), condição de herança recessiva; o gene *HOMER2* está associado à Surdez autossômica dominante 68 (OMIM #616707) e o gene *BNC1* está associado à Falência Ovariana Prematura 16 (OMIM #618723).

No DECIPHER foram encontradas descrições de dezesseis pacientes com deleções que se sobrepõem a da paciente 2. Nessas descrições não houve nenhum relato de IOP e os achados mais comuns foram: atraso do desenvolvimento motor, atraso no desenvolvimento da fala, escoliose, anormalidades faciais, baixa estatura e obesidade.

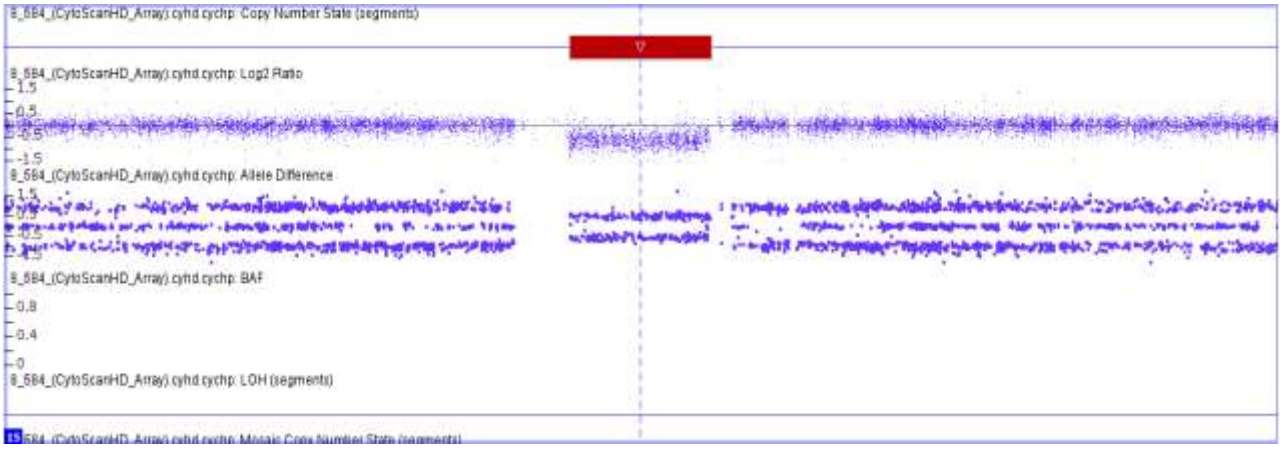

Figura 6- Dados derivados do SNP-*array* 2M Affymetrix, mostrando parte do braço longo do cromossomo 15 da paciente 2: a barra vermelha evidencia a extensão da deleção identificada arr [GRCh37] 15q25.2(83228992-84847653)x1 com média de log2 ratio -0,5 das sondas da região deletada (perfil de número de cópias na linha abaixo da barra vermelha); perfil de genotipagem por SNP mostrado abaixo (em *allele difference*). Imagem extraída do software AGCC version 3.

Paciente 3

A paciente 3 procurou serviço médico aos 14 anos, com queixa de amenorreia primária e obesidade. Ao exame físico: peso 90 kg, estatura 166 cm (DP+0,45), IMC 32,9 Kg/m², pelos axilares presentes e pubianos estadio III de Tanner, ausência de desenvolvimento mamário, genitália externa feminina, cúbito valgo, acne facial, acantose nigricans cervical e ausência de hirsutismo. Seus exames laboratoriais evidenciaram um hipogonadismo hipergonadotrófico, com FSH 65 UI/l (VN-3.5 a 12.5 UI/L), LH 25 UI/l (VN-2.4 a 12.6UI/L), estradiol < 6.8 pg/ml (VN- 20 a 233pg/ml) etestosterona 78 ng/dl (VN- 30 a 60 ng/dl). Realizou ultrassonografiapélvica em outro serviço antes do início da reposição hormonal, que evidenciou a presença de útero infantil (não foi realizada aferição do volume) e ovários não visualizados. Cinco anos após o início da reposição estrogênica associada a medroxiprogesterona, o US pélvico mostrou a presença de útero medindo 6,5 x 3,4 x 2,2 cm (volume 22 cm³) com eco endometrial linear e ovários não visualizados (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm³,

ovários 3 a 10 cm^3). Paciente não relatava casos semelhantes na família, infertilidade ou consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por SNP-array da paciente 3

Essa paciente apresentou uma deleção no braço longo do cromossomo X, de aproximadamente 1 Mb, cujas coordenadas genômicas foram:arr [GRCh37]Xq13.2(72142816_73135548)x1] (Figura 7) . Essa região contém por inteiro doze genes: *LINC00684, FAM226B, FAM226A, PABPC1L2B, PABPC1L2A, NAP1L6, NAP1L2, CDX4, MAP2K4P1, CHIC1, TSIX, XIST* (Tabela 7). Os genes encontram-se contidos por inteiro na duplicação, com exceção dos genes *FAM132B* e *ILKAP*, que estão parcialmente contidos. O gene *XIST* está descrito associado à Síndrome de Inativação do X, *Familial Skewed*(OMIM #300087).

No DECIPHER foram descritos 15 pacientes com deleções que envolvem essa mesma região cromossômica; com relatos frequentes de baixa estatura, atraso no desenvolvimento da fala, anormalidades do quadril, escoliose e estrabismo. A descrição de uma paciente (265891) com uma duplicação de 1,33 Mb, sobreposta às coordenadas genômicas da paciente 3, e portadora de IOP foi identificada.

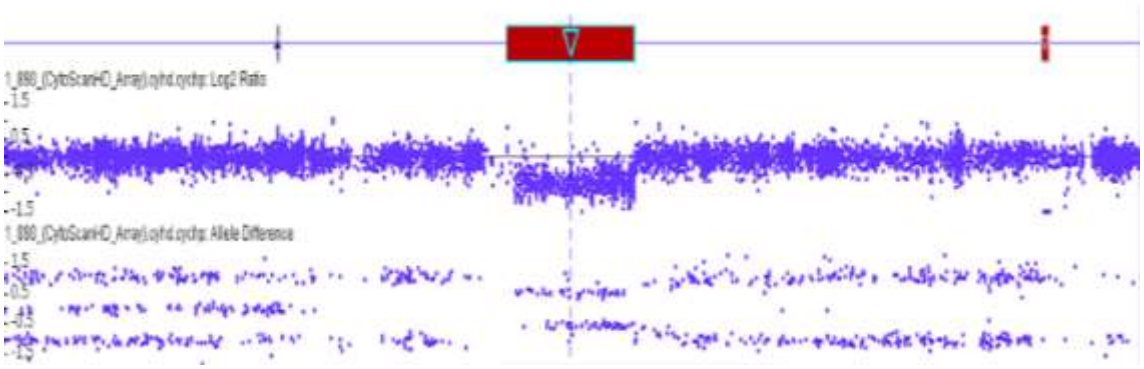

Figura 7- Dados derivados do SNP-*array* 2M Affymetrix, mostrando parte do braço longo do cromossomo X da paciente 3: a barra vermelha evidencia a extensão da deleção identificada arr [GRCh37]Xq13.2(72142816-73135548)x1com média de log2 ratio -0,5 das sondas da região deletada (perfil de número de cópias na linha abaixo da barra vermelha); perfil de genotipagem por SNP mostrado abaixo (em *allele difference*). Imagem extraída do software AGCC version 3.2.2.

Paciente 4

A paciente 4 iniciou seguimento por volta dos 18 anos em outro serviço, com queixa de amenorreia primária e ausência do desenvolvimento de caracteres sexuais secundários. Após o iniciou do tratamento com contraceptivo oral desenvolveu mamas e ciclos menstruais regulares. Aos 25 anos procurou o serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMUSP por desejo reprodutivo. O exame físico foi: peso 69 kg, estatura 170 cm (DP+1,12), IMC 23,9 Kg/m², pelos axilares,pubianos e mamas no estádio V de Tanner, genitália externa feminina e não foram observados estigmas. Realizou dosagens hormonais sem uso de reposição estrogênica que evidenciaram FSH 98.5 UI/L(VN3.5 a 12.5 UI/L), LH 42 UI/L (VN- 2.4 a 12.6UI/L) e estradiol < 5 pg/ml (VN- 20 a 233pg/ml). A ultrassonografia pélvica transvaginal evidenciou útero infantil (volume 7,2 cm³) e ovários não visualizados (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm³, ovários 3 a 10 cm³). Paciente negava casos semelhantes na família e relatava pais consanguíneos (primos de 1º grau).

Resultado da análise cromossômica por SNP-array da paciente 4

A análise por *SNP-array* identificou uma duplicação de 0,55 Mb no cromossomo 2, cujas coordenadas genômicas foram: arr[GRCh37] 2q37.3(239074572_239629478)x3(Figura 8). Essa CNV envolve oito genes, a saber: *ILKAP, LOC151174, LOC643387, HES6, PER2, TRAF3IP1, ASB1, LOC151171* (Tabela 7). O gene *PER2*foi associado à Síndrome Familiar da Fase Avançada do Sono (OMIM #604348), condição de herança dominante e o gene*TRAF3IP1* associado a Síndrome Senior-Loken 9 (OMIM #616629), caracterizada por uma nefropatia, secundária a disfunção ciliar, condição de herança recessiva.

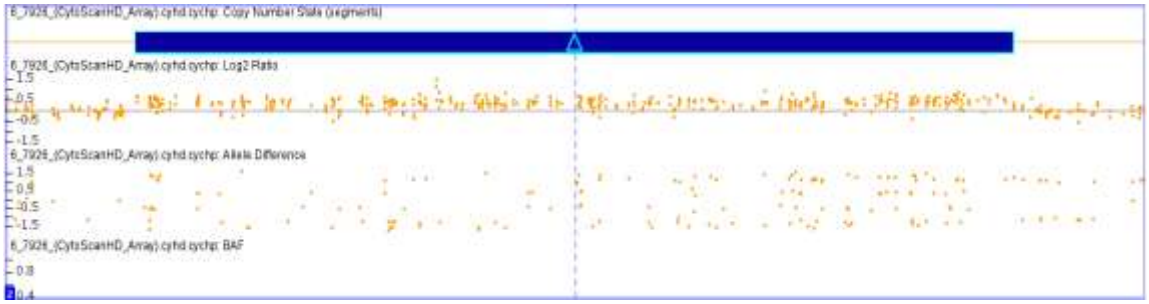

Figura 8- Dados derivados do SNP-*array* 2M Affymetrix, mostrando parte do braço longo do cromossomo 2 da paciente 4: a barra azul evidencia a extensão da duplicação identificada arr [GRCh37] 2q37.3(239074572-239629478)x3.com média de log2 ratio 0,5 das sondas da região duplicada (perfil de número de cópias na linha abaixo da barra azul); perfil de genotipagem por SNP mostrado abaixo (em *allele difference*). Imagem extraída do software AGCC version 3.2.2

No DECIPHER foram descritos 21 indivíduos com duplicações sobrepostas às coordenadas genômicas da CNV identificada na paciente 4. Dentre esses relatos, uma paciente (265082) com amenorréia secundária, catarata, coloboma, nistagmo congênito e microftalmia apresentava uma duplicação sobreposta de 11,4 Mb. Nos outros pacientes, cuja duplicação se sobrepõe a da paciente 4, foi bastante comum o achado de criptorquidia, atraso global do desenvolvimento e anormalidades cardíacas.

Além disso, no *SNP array* essa paciente apresenta vários blocos de homozigose, o que denota consanguinidade parental, fato que é relatado na história da paciente. As coordenadas genômicas desses blocos são: arr[GRCh37] 12q23.1q23.3(99982871_105873401),
arr[GRCh37] 2p13.3p12(69072655_76650806),
arr[GRCh37] 12q23.3q24.21(106333728_115177389),
arr[GRCh37] 16p13.12p12.2(14137089_24024308),
arr [GRCh37] 10p14p12.33(7883894_18329756),
arr[GRCh37] 3q12.2q13.2(100592216_111735961),
arr[GRCh37] 4p15.2p14(24889100_38330209),
arr[GRCh37] 22q12.1q13.31(27154014_44612253),
arr[GRCh37] 3p22.3p14.2(33963570_59417186)(Figura 9).

Figura 9-Ideograma representando o genoma da paciente. As setas em vermelho evidenciam os segmentos genômicos em homozigose (barras roxas), sem alteração do número de cópias, nas seguintes regiões cromossômicas:2p13.3p12, 3q12.2q13.2, 3p22.3p14.2, 4p15.2p14, 10p14p12.33, 12q23.3q24.21, 12q23.1q23.3,16p13.12p12.2, 22q12.1q13.31. Imagem extraída do software AGCC version 3.2.2.

Paciente 7

A paciente 7 relatou desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e menarca espontânea aos 13 anos, que consistiu em um único episódio de sangramento vaginal evoluindo com amenorreia.Fez uso de anticoncepcional oral a partir dos 18 anos, com ciclos regulares durante o uso hormonal. Refere que a partir dos 20 anos observou aumento do clitóris não acompanhado de outros sinais de hiperandrogenismo.Procurou o ambulatório de Ginecologia do HC aos 33 anos iniciando acompanhamento. No exame físico peso 58 kg, estatura 158 cm (DP+0,88), IMC 23 Kg/m², apresentava desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários completo, genitália feminina com clitoromegalia (4,5cm), sem acne ou hirsutismo. Negava uso de medicações no momento da avaliação. Os exames laboratoriais iniciais mostravam um hipogonadismo hipergonadotrófico, com FSH 82 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 38 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol 15 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml) e um valor aumentado de

testosterona de 99 ng/dl (VN- 30 a 60 ng/dl). A US pélvica mostrou útero reduzido de volume (volume-17 cm^3; valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3) e ovários pequenos<2 cm^3 (valores de referência para menacme:ovários 3 a 10 cm^3). As investigações para elucidar a origem da hiperandrogenemia indicaram uma provável origem gonadal do hiperandrogenismo (Testosterona basal-119 ng/dl, Testosterona após um mês da injeção IM de análogo de GnRH –Leuprolide 3,75mg - 38 ng/dl)

Nessa ocasião realizou clitoroplastia e gonadectomia bilateral (Anátomo patológico anexo direito: gônada disgenética, associada a hiperplasia de células hilares/ anexo esquerdo: gônada disgenética, associada a hiperplasia de células hilares e agregados celulares sugestivos de cordões sexuais primitivos). Após a gonadectomia os níveis de testosterona mantiveram-se sempre na faixa da normalidade. A paciente referiu duas tias paternas com infertilidade e negava consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por CGH-arrayna paciente 7

Na análise por *CGH-array* foi detectada uma duplicação de 325 Kb no cromossomo 19, arr[GRCh37] 19q13.43(56379654_56705420) x3. No segmento duplicado foram identificados oito genes, a saber: *NALRP4, NALRP13, NALRP8, NALRP5, ZNF444, ZNF787, ZSCAN5B* e *GALP*; todos contidos inteiramente na duplicação, com exceção do *NALRP4* (Tabela 7) Nenhum desses genes está associado a doenças segundo o banco de dados OMIM.

No banco de dados DECIPHER foram descritas 46 pacientes com duplicações sobrepostas e 7 pacientes com deleções sobrepostas. Dentre os indivíduos que apresentam duplicação nessa região, quatro delas são de tamanhos menores que a apresentada pela paciente 7 e as outras são bem maiores. A paciente 398425 do banco de dados DECIPHER, apresenta uma duplicação sobreposta, mas de tamanho bem maior (5,4Mb) e dentre os achados fenotípicos está descrita a presença de hipertrofia clitoriana (aspecto semelhante ao fenótipo da nossa paciente). Não estão descritos casos de IOP.

4.2) PACIENTES COM CNVs CLASSIFICADAS COMO VUS, CONTENDO GENES CANDIDATOS A IOP: descrição clínica e análise dos microarranjos genômicos

Paciente 5

A paciente 5 apresentou desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e teve menarca espontânea aos 13 anos; porém aos 18 anos, teve cessação dos ciclos menstruais associado ao aumento das gonadotrofinas e hipoestrogenismo, demonstrado pelos valores hormonais da época: FSH 60UI/l (VN-3.5 a 12.5 UI/L), LH 20 UI/l (VN-2.4 a 12.6UI/L), estradiol < 5,0 pg/ml (VN-20 a 233pg/ml). Ao exame físico: peso 67 kg, estatura 167 cm (DP+0,62), IMC 24Kg/m², pelos axilares, pubianos e mamas (estadio V de Tanner), genitália externa feminina. Paciente negava casos semelhantes na família e consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por CGH-arrayna paciente 5

A análise por CGH-array identificou na paciente 5 uma duplicação de 813 Kb no cromossomo 1, cujas coordenadas genômicas foram: arr[GRCh37]1p31.1(78617051_79429792) x3. O segmento duplicado contém quatro genes (*PTGFR*, *IFI44L, IFI44* e *ADGRL4*), todos inteiramente contidos na região, com exceção do *ADGRL4* (Tabela 7).Nenhum destes genes foi associado a doenças, segundo o banco de dados OMIM.

No DECIPHER há descrição de 18 CNVs que se sobrepõem à de nossa paciente, sendo 13 deleções e 5 duplicações. Dentre as duplicações, quatro apresentam tamanho menor ao da duplicação aqui detectada, e dentre as deleções, cinco delas são de tamanho inferior á CNV apresentada por nossa paciente. Não houve descrição de quadros de IOP nesses referidos indivíduos.

Paciente 11

A paciente 11 apresentou desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e teve menarca espontânea aos 12 anos; porém aos 15 anos, teve cessação dos ciclos menstruais, associado a aumento das gonadotrofinas e hipoestrogenismo: FSH 79UI/l (VN-3.5 a 12.5 UI/L), LH 38 UI/l (VN-2.4 a 12.6UI/L), estradiol < 13 pg/ml (VN- 20 a 233pg/ml). Ao exame físico: peso 50 kg, estatura 147 cm (DP-2,7), IMC 23Kg/m², pelos axilares, pubianos e mamas (estadio V de Tanner), genitália externa tipicamente feminina. Além da baixa estatura, essa paciente também apresentou palato ogival e encurtamento do quarto metacarpo. Tem associado um quadro de hipotireoidismo primário, com anticorpos anti peroxidase e anti tireoglobulina positivos. Negou fenótipos semelhantes na família, sem relato de infertilidade em parentes e também sem consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por CGH-arrayna paciente 11

Na análise por *CGH-array* foi identificada uma deleção de 180 Kb no cromossomo 2, arr[GRCh37] 2p23.1(31451382_31629439) x1. O segmento deletado contém três genes, a saber: *XDH, EHD3, CAPN14*. Apenas o *EDH3* está contido inteiramente na deleção, os outros dois contidos parcialmente (Tabela 7). O gene *XDH*foi associado à Xantinúria tipo1 (OMIM #278300), uma condição de herança recessiva.

No banco de dados DECIPHER foram descritas 21 CNVs, que se sobrepõem à da paciente 11, constituídas por 6 deleções e 15 duplicações. Todas as CNVs sobrepostas à encontrada na paciente 11 apresentavam um tamanho maior, exceto uma deleção. O fenótipo de baixa estatura foi descrito nos pacientes portadores dessas CNVs e em nenhum deles foi relatado IOP.

Paciente 13

Paciente procurou serviço médico aos 18 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário. Terapia de reposição hormonal feminina foi iniciada aos 19 anos. Ao exame físico apresentava estatura 152 cm (DP-1,8), desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio III de Tanner, genitália externa feminina, cúbito valgo, palato em ogiva, encurtamento do 4º metacarpo e hipertelorismo mamário. Paciente não apresentava déficits cognitivos ou de aprendizagem. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 118 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 64 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <10 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml), testosterona 24,6 ng/dl (VN- 30 a 60 ng/dl); ultrassonografia pélvica: útero 3,2x2,0x1,2 cm (volume uterino 4cm³), ovários não visualizados (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm³, ovários 3 a 10 cm). Fenótipos semelhantes na família, casos de infertilidade em parentes e consanguinidade parental não foram relatados.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayna paciente 13

A análise por *SNP-array* identificou uma duplicação de 146 Kb no cromossomo 22, cujas coordenadas genômicas foram: arr[GRCh37]22q12.1(29353366_29499619) x3(Tabela 7). O segmento cromossômico duplicado contém três genes, a saber:*C22orf31*(inteiramente contido na duplicação), e *ZNRF e KREMEN1*, com duplicação parcial. O gene *KREMEN1*é associado à Displasia Ectodermal 13, tipo cabelo/dente (OMIM #617392), condição de herança recessiva.

No banco de dados DECIPHER estão descritos 13 pacientes com duplicação e 14 pacientes com deleção nessa região. Dentre os indivíduos com duplicações sobrepostas ao segmento duplicado da paciente 13, foram relatados três casos nos quais o hipertelorismo mamário faz parte dos achados clínicos e um paciente portador de palato ogival, entre outros sinais. Em quatro pacientes foram descritos sinais clínicos de diferenças do desenvolvimento sexual, como: criptorquidismo, hipoplasia escrotal e hipospádia. No entanto, é importante ressaltar, que todas as CNVs documentadas no DECIPHER sobrepostas ao

segmento duplicado (22q12.1) na paciente desta coorte, tinham grandes extensões, maiores do que 300 Kb com conteúdo de muitos genes.

Pacientes 15 e 16 (irmãs)

Paciente 15 procurou serviço médico aos 23 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário. Ao exame físico apresentava desenvolvimento mamário ausente e pelos pubianos no estádio II de Tanner, genitália externa feminina. Não houve relato de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 82,1 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 14,7UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml); ultrassonografia pélvica: útero 4,8x0,7x2,0 cm (volume uterino-3,5cm^3), ovário direito 2,0 cm^3, ovário esquerdo 1,8 cm^3 (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários 3 a 10 cm^3).

A paciente 16 procurou serviço médico aos 25 anos, com a mesma queixa apresentada pela irmã (amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário). Ao exame físico apresentava desenvolvimento mamário ausente e pelos pubianos no estádio III de Tanner, genitália externa feminina.Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 66,75 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 10,40 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml); ultrassonografia pélvica: útero 4,2x2,5x1,0 cm (volume uterino-5,5cm^3), ovário direito 1,8 cm^3, ovário esquerdo 2,0 cm^3 (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários 3 a 10 cm^3).

As irmãs são fruto de um casamento consanguíneo (pais primos de 1º grau). Além das duas irmãs não foram relatados outros casos semelhantes na familia.

Resultado da análise cromossômica por SNP-array nas pacientes 15 e 16:

A análise por *SNP*-array identificou uma duplicação de 120 Kb no cromossomo 9, com as coordenadas genômicas:arr[GRCh37] 9p24.1(6965885_7090261)x3. No segmento duplicado está presente o gene *KDM4C*, com duplicação parcial (Tabela 7). Esse gene não é associado a doenças, segundo o banco de dados OMIM.

No DECIPHER foram descritos mais de 100 CNVs que se sobrepõem à das irmãs, todas com tamanho maior àquela identificada nas pacientes 15 e 16. Duas pacientes (402717e 409186) com fenótipo de IOP e outros três pacientes com disgenesia gonadal XY (396404, 396376 e 397228) foram relatados na base de dados, porém todos os indivíduos descritosapresentavam deleções, e de tamanhos bem maiores à CNV apresentada pelas irmãs.

4.3) PACIENTES COM CNVs CLASSIFICADAS COMO VUS, SEM CONTEÚDO GÊNICO E/OU COM GENES QUE NÃO FORAM ASSOCIADOS À FUNÇÃO OVARIANA: descrição clínica e análise dos microarranjos genômicos.

Paciente 6

Paciente procurou serviço médico aos 15 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário; iniciando o uso de reposição estrogênica aos 15 anos após investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava estatura 169 cm, desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio III de Tanner, genitália externa feminina, cúbito valgo e epicanto discreto. Um retardo mental leve foi observado na avaliação clínica. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 95,9 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 21,2 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml). Negou fenótipos semelhantes na família, infertilidade em parentes e também consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por SNP-array na paciente 6

A análise por SNP-array identificou uma duplicação de 430 Kb no cromossomo 5, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] 5q23.2(124700962_125131805) x3; uma região cromossômica que não contém genes (Tabela 7).

No DECIPHER foram descritas 25 CNVs que se sobrepõem à da paciente 6, compostas por 5 duplicações e 20 deleções. Todas as CNVs descritas na base de dados apresentam tamanho maior que a da duplicação identificada na paciente 6 e diferentemente com rico conteúdo gênico. A descrição de deficiência intelectual foi frequente nos pacientes relatados, porém nenhum relato de IOP foi realizado.

Paciente 8

Paciente procurou serviço médico aos 14 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário; iniciando o uso da terapia de reposição hormonal feminina aos 15 anos após investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava estatura 166 cm, desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio III de Tanner, genitália externa feminina, dentes extranumerários e manchas café com leite. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 158 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 43 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml); ultrassonografia pélvica: útero com volume de 3,22 cm^3, ovário esquerdo não visualizado e ovário direito com volume de 1,4 cm^3 (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários 3 a 10 cm^3). Paciente negava a presença de fenótipos semelhantes na família, infertilidade em parentes e consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por SNP-array na paciente 8

A análise por SNP-*array*identificou uma duplicação de 320 Kb no cromossomo 7, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] 7p22.1(5749102_6065236) x3. O segmento duplicado contem 9 genes, à saber: *RNF216, ZNF815P, OCM, CCZ1, RSPH10B, RSPH10B2, PMS2, AIMP2, EIF2AK1;* todos contidos inteiramente nessa duplicação, com exceção do *RNF216* e *EIF2AK1,* que estão parcialmente duplicados (Tabela 7).O gene*RNF216* foi relacionado à Ataxia Cerebelar e Hipogonadismo Hipogonadotrófico (OMIM #212840) condição de herança recessiva, o gene *PMS2*foirelacionado à Câncer hereditário colorretal não-polipose tipo 4 (OMIM#614337) e também à Síndrome de Câncer *Mismatch Repair* (OMIM #276300), condição de herança recessiva, o gene *AIMP2*foi associado a Leucodistrofia Hipomielinizante (OMIM #618006) condição de herança recessiva; e por último, o gene *EIF2AK1*foi associado à Leucoencefalopatia, atraso motor, espasticidade e Síndrome Disártrica (OMIM #618878).

No DECIPHER foram descritas mais de 100 CNVs, que se sobrepõem à da paciente 8, 41 duplicaçõesforam relatadas. Cincodas CNVs descritas na base de dados apresentam tamanho menor que a da duplicação identificada na paciente 8. Nenhum paciente com IOP foi identificado nos pacientes relatadosna base de dados.

Paciente 9

Paciente procurou serviço médico aos 14 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário; iniciando o usoda terapia de reposição hormonal feminina aos 16 anos, após realização de investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava estatura 163 cm, desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio III de Tanner, genitália externa feminina. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 86 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 34 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml). Paciente negava a presença de fenótipos semelhantes na família, infertilidade em parentes e consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayda paciente 9

A análise por SNP-*array* identificou uma duplicação de 240 Kb no cromossomo X, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] Xp22.33 (2031805_2271484) x3. O gene *DHRSX*está contido parcialmente na região duplicadaesegundo o banco de dados OMIM, esse genenão está relacionado a doenças (Tabela7).

No banco de dados DECIPHER foram descritas 93 CNVs, que se sobrepõem à da paciente 9. A paciente 289882, apresenta uma duplicação de 245 Kb e o fenótipo descrito desta paciente inclui hipogonadismo hipergonadotrófico, insuficiência adrenal e diabete melito.

Paciente 10

Paciente procurou serviço médico aos 15 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário; iniciando o uso de da terapia de reposição hormonal feminina após realização de investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava estatura 165 cm, desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio 3 de Tanner, genitália externa feminina e ausência de estigmas. No decorrer do seu seguimento foi feito diagnóstico de Doença de Wilson e Ceratocone. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 98 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 38 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml).

A irmã da paciente também apresentou quadro de amenorréia primária e também é acompanhada em nosso ambulatório. Diferente da paciente 10, ela não é portadora de Doença de Wilson e ceratocone. Ela também foi avaliada nesta coorte de estudo (paciente 28), porém não apresentou CNVs raras nas análises.

As irmãs são fruto de um casamento consanguíneo (pais primos de 1º grau). Além das duas irmãs não foram relatados outros casos semelhantes na família.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayda paciente 10

A análise por SNP-array identificou uma deleção de 190 Kb no cromossomo X, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] Xq21.31 (89691648_89878515) x1. A região cromossômica deletada não contém nenhum gene (Tabela 7).

No banco de dados DECIPHER são descritas 26 deleções sobrepostas à essa região, todas de tamanho maior à encontrada na paciente 10. Dentre as descrições, está a paciente 265891, que apresentava uma deleção de 80 Mb, que envolve inúmeros genes. A paciente descrita no banco de dados apresentava IOP, associada a outros sinais clínicos como anormalidades do lobo da orelha, palato ogival, encurtamento de quarto metacarpo, hipoplasia hemifacial, estrabismo unilateral, atraso do desenvolvimento da fala e esteatose hepática.

Paciente 12

Paciente procurou o serviço médico aos 18 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário. Iniciou o usoda terapia de reposição hormonal feminina aos 18 anos após realização de investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava ausência de desenvolvimento mamário, pelos pubianos no estádio III de Tanner, genitália externa feminina, sem estigmas. Paciente negava a presença de fenótipos semelhantes na família, infertilidade em parentes e consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por SNP-array da paciente 12

A análise por SNP-*array* identificou uma deleção de 180 Kb no cromossomo 10, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] 10p15.3 (992115_1168862) x3. A região cromossômica deletada contém 6 genes à saber: *WDR37, IDI2, IDI2-AS1, IDI1, GTPBP4, AX748285,* todos contidos inteiramente na região duplicada, com exceção do*WDR37,* que está parcialmente duplicado (Tabela 7). O gene *WDR37* foi associado à Síndrome

Neuro-Óculo-Cardio-Genitourinária (OMIM #618652), condição de herança dominante.

No banco de dados DECIPHER são descritas mais de 100 CNVs sobrepostas a da paciente 12, dentre elas mais de 50 duplicações; todas elas de tamanho maior à encontrada na paciente 12. Nenhuma descrição de IOP foi observada nos pacientes relatados na base de dados.

Paciente 14

Paciente procurou serviço médico aos 15 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário. Iniciou o uso da terapia de reposição hormonal feminina aos 15 anos após realização de investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio II de Tanner, genitália externa feminina. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 114 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 33,9 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml); ultrassonografia pélvica: volume uterino de 9,2 cm^3, ovário esquerdo com volume de 1,2 cm^3 e ovário direito com volume de 1,4 cm^3 (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários 3 a 10 cm^3). Paciente é fruto de um casamento consanguíneo (pais primos de 1º grau) e não soube referir sobre outros fenótipos de IOP na família.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayda paciente 14

A análise por SNP-*array* identificou uma deleção de 130 Kb no cromossomo 2, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] 2q23.3 (154541630_154674188) x1. A região cromossômica deletada não contém nenhum gene (Tabela 7).

No banco de dados DECIPHER foram descritas 20 CNVs sobrepostas à da paciente 14; todas elas apresentavam tamanho maior à da deleção identificada na paciente desta coorte. Nenhuma descrição de IOP foi observada nos pacientes relatados na base de dados.

Paciente 17

A paciente procurou serviço médico aos 16 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário. Iniciou o uso de da terapia de reposição hormonal feminina aos 16 anos após realização de investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio III de Tanner, genitália externa feminina; apresentava cúbito valgo e tinha um diagnóstico de déficit auditivo. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 89 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 28 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml); ultrassonografia pélvica: volume uterino de 9,8 cm^3, ovário esquerdo não visualizado e ovário direito com volume de 1,4 cm^3 (valores referência para menacme: útero 30 a 90 cm^3, ovários 3 a 10 cm^3). Paciente não sabia referir sobre fenótipos de IOP ou infertilidade na família bem como de consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayda paciente 17

A análise por SNP-*array* identificou uma deleção de 120 Kb no cromossomo 11, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] 11q22.3 (103636307_103760085) x1. A região cromossômica deletada contém o gene *MIR4693* completamente (Tabela 7). Esse gene não está associado a doenças segundo o banco de dados OMIM.

No banco de dados DECIPHER são descritas 14 deleções sobrepostas a da paciente 17. Todas as CNVs relatadas no banco de dados apresentavam tamanho maior do que a da paciente desta coorte. Nenhuma descrição de IOP foi observada nos pacientes relatados na base de dados.

Paciente 18

Paciente procurou serviço médico aos 14 anos com queixa de amenorreia primária e ausência de desenvolvimento mamário. Iniciou o uso da terapia de reposição hormonal feminina aos 15 anos após realização de investigação diagnóstica. Ao exame físico apresentava desenvolvimento mamário ausente e de pelos pubianos no estádio II de Tanner, genitália externa feminina. Realizou os seguintes exames laboratoriais: FSH 99,9 UI/l (VN- 3.5 a 12.5 UI/L), LH 29 UI/l (VN- 2.4 a 12.6UI/L), estradiol <13 pg/ml (VN- 20 a 233 pg/ml). A paciente negava a presença de fenótipos semelhantes na família, infertilidade em parentes e consanguinidade parental.

Resultado da análise cromossômica por SNP-arrayda paciente 18

A análise por SNP-*array* identificou uma deleção de 100 Kb no cromossomo 22, cujas coordenadas genômicas foram arr[GRCh37] 22q12.3 (36614296_36716248)x3. Essa deleção contém os genes *APOL2, APOL1* por inteiro e o gene *MYH9*está parcialmente deletado (Tabela 7). O gene *APOL2* foi associado à Esquizofrenia (OMIM #181500) condição de herança dominante, o gene *APOL1* foi associado à susceptibilidade à doença renal diabética em estágio final (OMIM # 612551) e à Glomeruloesclerose focal segmentar 4 (OMIM #612551), e o gene *MYH9*foi associado à Surdez autossômica dominante 17 (OMIM #603622) e à Macrotrombocitopenia e Inclusões de granulócitos com ou sem nefrite ou com perda auditiva neurossensorial (OMIM #155100).

No banco de dados DECIPHER foram descritas 22 duplicações sobrepostas a da paciente 18, duas delas de tamanho inferior à CNV aqui relatada. Todas as CNVs relatadas no banco de dados apresentavam tamanho maior do que a da paciente desta coorte. Nenhuma descrição de IOP foi observada nos pacientes relatados no banco de dados.

5) DISCUSSÃO

A implementação de novas tecnologias nas últimas duas décadas, que possibilitam a investigação do genoma inteiro, como os *microarrays*; tem revolucionado a pesquisa diagnóstica na prática clínica, com a identificação da base de inúmeras doenças genéticas. Essas plataformas foram desenvolvidas primeiramente como ferramentas na investigação de desequilíbrios genômicos em câncer, e paulatinamente foram substituindo os métodos citogenéticos convencionais, tendo sido reconhecidas como um teste diagnóstico de primeira linha, para pacientes com deficiências de desenvolvimento e anomalias congênitas, entre outras desordens complexas, que apresentam uma grande heterogeneidade genética (Cheung SW e Bi.,2018)

No campo da endocrinologia, a utilização da técnica de *microarray* em coortes de mulheres com IOP, tem contribuído para que seja estabelecido um diagnóstico etiológico, além da identificação de novos genes candidatos na patogênese da doença.(Aboura *et al*., 2009 ; Dudding *et al*., 2010 ; Ledig *et al*., 2010 ; Ledig *et al.,* 2010 ; Quilter *et al*., 2010 ; Knauff *et al*., 2011 ; McGuire *et al.,* 2011 ; Norling *et al*., 2014 ; Hyon *et al*., 2016 ; Jaillard *et al*., 2016 ; Tsuiko *et al.*, 2016;.Bestetti *et al.,*2019)

Em nosso estudo identificamos 19 CNVs raras em 75 pacientes avaliadas. Mulheres com amenorréia primária apresentaram uma prevalência maior de CNVs raras (16 em 19 CNVs identificadas), em relação às pacientes com amenorréia secundária (3 em 19 CNVs identificadas). Similarmente, Tsuiko *et als,* mostraram que o número de CNVs raras foi inversamente proporcional à idade de início da falência ovariana, numa coorte de 301 pacientes com IOP. Esses achados sugerem que fenótipos mais severos de IOP, como os que cursam com amenorréia primária, tenham mais provavelmente uma origem genética; do que os casos que se desenvolvem em uma idade maior e que cursam como amenorréia secundária.

Trinta e cinco por cento das CNVs em nossa coorte foram microdeleções; que são reconhecidamente desequilíbrios que frequentemente causam doenças, uma vez que determinam haploinsuficiência de genes contidos nas regiões deletadas. As duplicações, que representaram 65% das CNVs raras, podem

causar fenótipos alterados, por meio da perda de função, ganho de função, tripossensibilidade e/ou desregulação de genes dentro ou perto da região duplicada. Enquanto as deleções tem um efeito mais direto na estrutura genômica, as duplicações podem ter efeitos muito diferentes na função do gene, dependendo dos pontos de quebra e localização dessa duplicação, além da orientação do segmento duplicado. (Newman *et al*, 2015).

Nessa coorte de pacientes brasileiras identificamos CNVs já descritas previamente em pacientes com IOP, caracterizando CNVs recorrentes, e regiões cromossômicas potencialmente associadas à IOP não descritas ainda na literatura

CNVs previamente relacionadas a IOP

A deleção de 1,7 Mb no 15q25.2 identificada na paciente 2, envolve o gene *CPEB1* (Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding protein 1) um regulador translacional, que tem importante papel nos estágios mais precoces de diferenciação e desenvolvimento das células germinativas em camundongos. Em modelos animais nocaute para esse gene observou-se um crescimento normal até a vida adulta, porém com defeitos severos na função reprodutiva (Tay e Ritchter, 2001). Em camundongos adultos fêmeas nocaute para o *Cpeb* foram encontrados ovários vestigiais, desprovidos de oócitos, além disso, não foram detectados complexos sinaptonemais nos ovários desses animais (Welk *et al*., 2001).

A deleção da região cromossômica 15q25.2, que envolve o *CPEB1,* já foi previamente descrita em seis pacientes portadoras de IOP (McGuire *et al.*,2011, Hyon*et al.,*2016, Tsuiko *et al*.,2016. Bestetti *et al*., 2019). A haploinsuficiência do *CPEB*em humanos parece acelerar a perda de células germinativas durante a vida reprodutiva determinando insuficiência ovariana (McGuire *et al*.,2011).

A região 15q25.2 deve ser considerada um lócus específico de IOP, já que além de conter o gene *CPEB1*, envolve também o gene*BNC1*(Basonuclin 1)OMIM #618723, associado a fenótipo de IOP. A Basonuclina é uma proteína *zinc-finger* encontrada em abundância nos oócitos; sua deficiência prejudica a

transcrição mediada pela polimerase RNA I e II, alterando a morfologia dos oócitos (Ma *et al*.,2006).

Zhang et al., identificou variantes alélicas patogênicas no *BNC1* emseis pacientes portadoras de IOP. A análise por imunofluorescência de oócitos humanos *knockdown*para*BNC1*mostrou uma redução dos níveis de expressão de *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein 15) e de PI3K-AKT, levando a inibição da meiose em oócitos(Zhang *et al*.,2018).

CNVs envolvendo genes associados ao desenvolvimento folicular, ovulação e esteroidogênese

Localização da CNV: 2q37.3;
Gene candidato: *PER 2* (Period Circadian Regulator 2)

A duplicação em 2q37.3 de 0,55 Mb identificada na paciente 4, contém o gene*PER2*(OMIM #604348)

Uma variante alélica *missense* no gene *PER2* do relógio biológico foi associado em humanos à Síndrome Familiar da Fase Avançada do Sono (Familial advanced sleep phase syndrome -FASPS) (Toh *et al*.,2001).

Os genes *PER2*, *BMAL1* (Brain and Muscle ARNT-like1), *CLOCK* (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), *PER 1* e *3* (Period Circadian Regulator 1 e 3) e *CRY 1* e *2* (Cryptochrome 1 e 2) compõem o “relógio molecular” existente na maioria das células dos mamíferos. Os transcritos desses genes gerados em níveis celulares, atuam por alças de retroalimentação positivase negativas, regulando as oscilações no metabolismo, níveis hormonais e expressão gênica nas 24 horas do ciclo dia-noite (Kume K *et al*.,1999, Sciarra *et al*.,2020). Os processos fisiológicos que regem a fertilidade precisam estar adequadamente sincronizados com o ambiente externo para garantir o sucesso reprodutivo. Inúmeros estudos em animais demonstraram a influência dos genes do ciclo circadiano na regulação da fertilidade tanto masculina quanto feminina (Kennaway *et al*.,2012).

A teoria da presença de um “relógio ovariano” (figura 10) nas células foliculares foi proposta para explicar a regulação do tempo de sensibilidade e/ou

preparação do folículo pré-ovulatório para coincidir com o pico de LH e promover a ovulação (Sellix,2015). Acredita-se que a expressão gênica induzida pelo pico de LH seja mediada por esse relógio circadiano ovariano (Sem and Hoffmann.,2020). Shimizu *et al*.,2011 demonstrou que o *knockdown* do *Per2* ou do *Clock* mediado por um *small interfering* RNA (siRNA) nas células granulosas bovinas causa um *downregulation* na expressão do receptor de LH, sugerindo que a expressão do receptor de LH seria diretamente regulada por esses genes do relógio circadiano. Os estudos em camundongos*knockout* para os genes *Per 1* e *Per 2* demonstraram um decréscimo significativo dos folículos ovarianos e um consequente declínio nas taxas de fertilidade desses animais (Zheng *et al*.,2019).

Chen *et al*. confirmou a presença das proteínas PER2 e CLOCK no folículo dominante antral, e a ausência das mesmas nos folículos primordiais, primário e pré antral em humanos. Além disso, identificou a presença de mRNAs de *PER, CLOCK* e *BMAL1 em* células granulosas luteinizadas humanas. Como o folículo dominante antral e o corpo lúteo podem produzir hormônios esteroidais, a expressão de genes circadianos nesses sítios indica um potencial efeito desses genes na esteroidogênese do ovário humano (Chen *et al*.,2016).

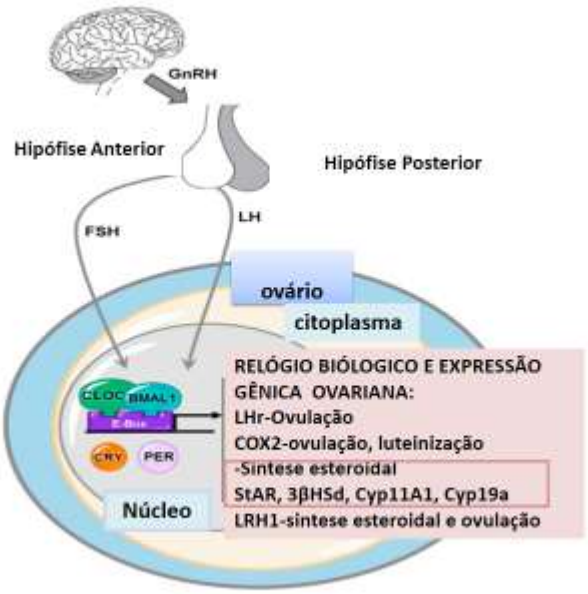

Figura 10: Interação das gonadotrofinas e genes do relógio biológico (*PER* e *BMAL1*) na regulação da expressão de genes críticos para o funcionamento ovariano normal.LHr: receptor LH, Cox2: ciclooxigenase 2, StAR: proteína reguladora aguda da esteredoigênese, 3b HSD: 3-beta deidrogenase hidroxiesteroide, Cyp11A: enzima de clivagem do colesterol, Cyp19a: aromatase
Adaptado de Sen e Hoffmann.,2020

Localização da CNV: 1p31.1;

Gene candidato: *PTGFR* (Prostaglandin Receptor F 2-alpha)

A duplicação em 1p31.1, de 0,81 Mb identificada na paciente 5, contém entre outros o gene *PTGFR.*

Estudos em modelos animais do *PTGFR* indicam um importante papel na das prostaglandinas e receptores na fisiologia ovarianae reprodutiva feminina (Berisha *et al.* 2018; Trau *et al.* 2015).

A análise da expressão proteica utilizando as técnicas de PCR quantitativo em tempo real e de imunofluorescência em ovários de vacas evidenciou que o padrão de expressão dos membros da família de prostaglandinas, PTGF (prostaglandin F2alpha) e PTGE (prostaglandin E2) é influenciado pelo estágio de desenvolvimento dos folículos, nas condições pré e

após o pico de LH e no período pós ovulatório (corpo lúteo inicial). O pico de LH e o processo de ovulação influenciam a produção da cicloxigenase, das prostaglandinas sintases (PTGFS e PTGES), dos ligantes de prostaglandinas (PTGF e PTGE) e também regulam a expressão dos receptores de prostaglandinas (*PTGFR, PTGER2* e *PTGE4*). Assim, o pico de LH parece induzir enzimas que modulam a produção de prostaglandinas e de seus receptores específicos nos folículos pré-ovulatórios (Berisha *el at*,2019).

As prostaglandinas podem estimular a secreção de progesterona pelas células foliculares, havendo um retrocontrole positivo entre a progesterona e as prostaglandinas (Fortune JE.,1994). Além disso, Brigdes e Fortune (2007) demonstraram que ambos, teca e células granulosas de folículos pré-ovulatórios são alvos da PTGF e PTGE produzidos pelas células granulosas.

O processo de ovulação em vacas é dependente da produção folicular das prostaglandinas (Skarzynski *et al*.,2013).

O aumento significativo de todos os receptores de prostaglandina, incluindo o *PTGFR*, logo após a ovulação (corpo lúteo inicial), demonstra um importante papel das prostaglandinas no processo de ovulação, luteinização e formação do corpo lúteo. Além disso, PTGF e PTGE podem suprimir a apoptose de células esteroidogênicas e endoteliais no corpo lúteo bovino; corroborando para hipótese que os membros da família de prostaglandinas exerçam um papel de remodelação das células da granulosa e da teca interna, durante o processo de ovulação (Berisha *el at*,2019).

O gene *PTGFR* está altamente expresso nos tecidos do sistema reprodutor feminino (útero, trompas de Falópio e ovários) https://www.proteinatlas.org/ENSG00000122420-PTGFR.

A duplicação apresentada pela paciente 5 contém todo o gene *PTGFR*, condição que poderia gerar uma anormalidade na função do mesmo, caso este gene seja sensível à efeito de dose. O fato de inúmeros estudos em animais evidenciarem a participação das prostaglandinas e *PTGFR* em processos biológicos ovarianos bem como sua alta expressão nos tecidos gonadais humanos, nos alerta para seu potencial papel nos distúrbios da fertilização e da IOP em humanos, e que requer estudos complementares.

CNVs envolvendo genes relacionados à oôgenese e desenvolvimento embrionário precoce

Localização da CNV: 19q13.43;
Gene candidato: *NLRP5* (Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing receptor protein 5)

A duplicação de 330 Kb no 19q13.43 identificada na paciente 7 contém entre outros o gene *NLRP5*, membro da família *NLRP,* o primeiro gene de efeito materno descrito em ratos (Tong ZB.2000).

Em mamíferos foi demonstrado que durante o desenvolvimento folicular, ocorre concomitantemente um incremento no volume dos oócitos de até 300 vezes, secundário ao acúmulode uma quantidade substancial de proteínas e RNAs maternos (Liu *et al*.,2006). O desenvolvimento embrionário inicial depende quase inteiramente do material materno armazenado em macromoléculas uma vez que a atividade transcricional é quiescente antes de haver a ativação do genoma zigótico (Zhu *et al*.,2015).

Em oócitos e em embriões em estágios iniciaisde ratos foi identificado um complexo, denominado complexo materno subcortical (SCMC- subcortical maternal complex), composto por pelo menos quatro proteínas, dentre elas o *NLRP5* (primeiramente denominado em estudos animais como MATER-Maternal AntigenThat Embryos Require), que foi originalmente identificado como um gene antígeno-associado a um tipo de ooforite em camundongos (Tong and Nelson, 1999)

Os genes dos componentes do complexo materno subcortical (SCMC) são transcritos e acumulados durante a oogênese, mas parecem ter um papel menor antes do desenvolvimento embrionário inicial. A interrupção de cópias de genes que codificam o *NLRP5* e as outras proteínas do SCMC, pode levar à infertilidade feminina, com ausência do SCMC e desenvolvimento embrionário interrompido na fase de clivagem (Tong *et al*.,2000)

Docherty *et al*.,2015 estudoumutações do gene *NLRP5* em mães de indivíduos com *Multilocus imprinting disturbance*-MLID (esses pacientes apresentavam manifestações clínicas heterogêneas, dentre elas: atraso do

desenvolvimento, autismo, alterações de comportamento e síndrome de Beckwith-Wiedemann; enquanto suas mães eram clinicamente saudáveis) e evidenciou que variantes deletérias de efeito-materno do gene *NLRP5*, acometeram 15% da coorte em questão. Além disso, o estudo demonstrou desfechos reprodutivos graves (entre eles múltiplas perdas gestacionais e períodos de infertilidade) nas mães com mutações bialélicas do *NLRP5*. Não se sabe ao certo, como essas mutações podem comprometer os oócitos.

Zhu *et al*.,2014 observou uma localização anômala do *NLRP5* em alguns oócitos e zigotos derivados de fertilizações *in vitro* que não obtiveram sucesso; o *NLRP5* perdeu sua localização subcortical e estava difundido no citoplasma, levando à uma interrupção do SCMC desses oócitos e parada de desenvolvimento de embriões em estágios iniciais.

Mu *et al*., 2019 estudou um grupo de mulheres com recorrentes falhas em fertilizações *in vitro*, devido parada precoce do desenvolvimento embrionário, e encontrou 3 pacientes, advindas de 2 famílias, carreando diferentes mutações bialélicas no *NLRP5*. Duas, entre 3 irmãs foram inférteis e ambas irmãs inférteis carreavam a mutação heterozigótica composta: c.292C>T (p.Gln98*) e c.2081C>T (p.Thr694Ile); enquanto a terceira irmã (fértil) não carreava nenhuma mutação no *NLRP5*. A terceira paciente infértil, advinda de outra família, apresentou uma mutação heterozigótica composta c.866G>A (p.Gly289Glu) e c.3320C>T (p.Thr1107Ile). Todas essas mutações levaram a perda de função. Esse estudo evidenciou ainda, a alta expressão do *NLRP5* em oócitos humanos e embriões em estágio precoce.

Um estudo foi desenhado para avaliar a expressão genica durante o início da formação de folículo primordial em fetos humanos (por volta de 18 semanas de gestação) e antes da conclusão de sua formação (por volta das 27 semanas de gestação); esse foi o primeiro estudo a demonstrar a regulação positiva de inúmeros genes (muitos deles oócitos específicos), na formação do folículo primordial. Alguns genes, já reconhecidamente associados à IOP, como o *FIGLA, SOHLH1, LHX8* e *CYP19A1* tiveram sua expressão bastante aumentada; mas surpreendentemente o *NLRP5* teve um aumento na expressão do transcrito em 40 vezes, levando à conclusão que o *NLRP5* tem um papel fundamental na formação do folículo primordial (Fowler *et al*.,2008)

Levando-se em consideração que a formação do folículo primordial está intimamente relacionada ao potencial reprodutivo da mulher (Skinner MK.,2005), conclui-se que o *NLRP5,* é essencial na determinação da reserva ovariana em mulheres (Fowler *et al*.,2008)

Considerando a alta expressão deste gene no tecido ovariano e as alterações na função de oócitos e seu papel na formação do folículo primordial, o *NLRP5* deve ser considerado um fator genético potencialmente envolvido nos processos reprodutivos femininos e na IOP, potencialmente dependentes da origem parental da alteração.

Localização da CNV: 9p24.1;
Gene candidato: *KDM4C* (Lysine Demethylase 4C)

A duplicação de 120 Kb em 9p24.1 identificada nas irmãs 15 e 16 contém parte da sequência do *KDM4C* (Lysine Demethylase 4C), localizando-se um dos pontos de quebra intragene.

Wang *et al*.,2009 demonstrou que a depleção do *KDM4C* em estágios embrionários precoces de camundongos (pré-implantacionais), leva à parada do desenvolvimento embrionário antes do estágio de blastocisto. A depleção do *KDM4C* causa ainda um *down-regulation* em genes pluripotenciais, como o *NANOG, POU5F1* e *SOX2*.Os genes *NANOG, POU5F1* e *SOX2* formam um circuito regulador de pluripotência em células tronco embrionárias indiferenciadas (Loh *et al*.,2007, Surani *et al.,*2007)
J Wang *et al*., 2011, publicou o primeiro estudo que identificou uma mutação não sinônima do *POU5F1* numa paciente chinesa com IOP, sugerindo que mutações nesse gene, podem aumentar o risco para esse fenótipo. Embora o papel do *POU5F1* na foliculogênese seja desconhecido, sua re-expressão no ovário do recém-nascido parece ser essencial para estabelecer o potencial de reprogramação do óvulo. Propomos que a depleção do *KDM4C* pode interferir na atividade do *POU5F1*, já previamente relacionado com IOP; e não deve ser descartada a hipótese de sua relação com o fenótipo apresentado por essas pacientes.

CNVs contendo genes relacionados às células germinativas/ desenvolvimento ovariano

Localização da CNV: 22q12.1;
Gene candidato: *ZNRF3* (*Zinc Finger and Ring Finger Protein 3*)

A duplicação de 146 Kb em 22q12.1 identificada napaciente 13 contém o gene *ZNRF3*dentre outros na região.

Estudos em camundongos mostraram que o gene *ZNRF3,* uma ligase ubiquitina E3, inibe a via de sinalização *WNT* e é alvo direto da *RSPO-1,* tornando-se importante na determinação testicular em camundongos (Harris *et al*.,2018). As R-espondinas em associação com receptores de superfície celular LGR4/5, promovem a sinalização da *WNT*, por meio da ligação e sequestro transmembrana das E3 ligases ubiquitinas *ZNRF3* e *RNF43. E*ssas duas moléculas por sua vez inibem a sinalização *WNT* via receptor Frizzled pela degradação por ubiquitinação e aumento do *turnover* de membrana (Hao *et al.*,2012)

A determinação sexual envolve interações antagônicas entre a via de determinação testicular (SRY-SOX9-FGF9) e a via de determinação ovariana (RSPO1-WNT/B-catenina-FOXL2), cujos mecanismos moleculares ainda não estão totalmente esclarecidos. A sinalização *WNT*/B-catenina é necessária para o desenvolvimento ovariano normal na gônada embrionária XX: a perda da *WNT4* ou Respondina-1 (*RSPO1*), afeta a estabilização da B-catenina, podendo resultar em reversão parcial do sexo gonadal XX em camundongos e diferenças do desenvolvimento sexual em indivíduos 46,XX, ou ainda virilização em humanos (Biason-Lauber *et al*.,2004, Vinio *et al*.,1999)

A duplicação apresentada pela paciente abrange parte da sequência do *ZNRF3*, com um dos pontos de quebra sendo intragênico.
Embora com a técnica de SNP-*array*, não seja possível determinar a localização e orientação do segmento duplicado, especulamos que estacondição poderia

determinar a haploinsuficiência do gene e repercussões na função, caso este gene fosse sensível à efeito de dose.

Na análise de probabilidade de tolerância a variantes gênicas com perda de função (*Loss-of-function* - LoF) utilizando o banco de dado GnomaD, observamos para o gene *ZNRF3* a classificação de extremamente intolerante a haploinsuficiência (pLI = 0.99). Essa análise suporta a hipótese de que a inativação de um dos alelos deste gene pode ocasionar fenótipos com impacto negativo. Assim, a duplicação parcial de *ZNRF3* surge como uma variante candidata para o fenótipo de nossa paciente, porem se impõem a realização de estudos complementares.

CNVs envolvendo genes associados à apoptose celular

Localização da CNV: 2p23.1

Genes candidatos: *XDH (Xanthine Dehydrogenase)*

***EHD3* (EH-Domain containing 3)**

A deleção de 0,18 Mb em 2p23.1 identificada na paciente 11 contém o gene *XDH* (OMIM #607633#), relacionado à Xantinuria tipo1. O *XDH* é um gene relacionado ao estresse oxidativo e um dos principais alvos do Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (Liu and Li *et al*.,2018). O DEHP é comumente utilizado como plastificante, amplamente utilizado na indústria, em dispositivos médicos e em utensílios domésticos. O descarte desses produtos contamina o meio ambiente e é altamente prejudicial à saúde humana (Kavlock *et al*.,2006).

O DEHP afeta vários processos durante o desenvolvimento ovariano. Estudos *in vitro*, utilizando ovários embrionários de ratos, mostram que a exposição ao DEHP altera a primeira divisão meiótica dos oócitos e aumenta a apoptose do oócito, associado a redução da expressão de genes específicos de células germinativas (Liu and Li *et al*.,2017). A exposição ao DEHP durante a maturação sexual em ratos, mostrou uma diminuição da esteroidogênese (por apresentar um efeito disruptor no receptor estrogênico) e redução na expressão de genes envolvidos na síntese androgênica (Mu *et al*.,2015).

O *XDH* codifica uma xantina desidrogenase, que é um membro do grupo das hidroxilases envolvidas no metabolismo oxidativo. Ou seja, essa proteína é convertida em xantina oxidase (XO), que produz espécies reativas de oxigênio (ROS); produtos que estão associados a dano no DNA e apoptose celular (Berry and Hare.,2004). O estudo de Liu and Li et al.,2018, demonstra que a exposição ao DEHP aumenta os níveis de *XDH* e consequentemente de ROS, com aumento da apoptose em cultura de ovários de ratos, além de uma diminuição significativa no número de oócitos.

Essa deleção em 2p23.1 também contém o gene *EHD3*, que pertence a uma família de genes constituída por quatro genes parálogos altamente homólogos: *EHD1, EHD2, EHD3* e *EHD4* (Mintz et al.,1999). As proteínas EHD desempenham vários papéis na transdução de sinal, inclusive podem regular a via de ativação Ras/MAPKinase (Tong et al.,2000). O *EHD3* é uma proteína intimamente relacionada com *EDH1*, com a qual se oligomeriza, e exibe um padrão de distribuição subcelular semelhante após a superexpressão (Galperin *et al*.,2002). *EDH1* é expresso em tecidos e células que são estimuladas pelo fator de crescimento *insulin-like-1* (IGF-1). Estudos indicam que o *EDH1* desempenha um papel supressorna via de sinalização do IGF-1 (Rotem-Yehudar *et al*.,2001).

Na pesquisa para identificar novos genes associados ao desenvolvimento do folículo dominante em vacas; demonstrou que o *EHD3* foi altamente expresso nas células da teca de folículos subordinados vs. folículos dominantes (Zielak *et al.*, 2007).

Sabidamente os fatores de crescimento *insulin-like* desempenham um papel importante no crescimento folicular, modulando a proliferação de células da granulosas isoladamente e, em sinergismo com as gonadotrofinas, promovendo a diferenciação das células foliculares (Poretsky *et al.,*1999). A similaridade entre as sequências dos genes *EHD3 eEDH1* é de cerca de 87%; o que indica que o *EHD3* também possa desempenhar um papel supressor na via de sinalização do IGF-1, promovendo o crescimento e estimulando a apoptose das células da teca. Zielak *et al*.,2007, demonstraram que os folículos subordinados tem mais mRNA para *EHD3*, determinando a fagocitose e apoptose celular e regressão do folículo subordinado.

Pelos dados disponíveis, os genes *XDH* e *EDH1* parecem desempenhar papéis importantes na fisiologia ovariana, e poderiam ser considerados genes candidatos para etiologia do fenótipo de IOP, embora seja necessário a realização de novos estudos que comprovem estas sugestões.

CNVS envolvendo o cromossomo X

Aberrações do cromossomo X são consideradas uma das principais causas de IOP (Beke *et al*.,2013). Tsuiko *et al*., (2016) observou que grandes rearranjos estruturais no cromossomo X e em autossomos foram identificados apenas numa coorte com IOP e não nos controles estudados, sugerindo que esses rearranjos possam impedir o pareamento cromossômico normal na meiose, levando à morte de células germinativas.

Quatro pacientes desta coorte apresentaram CNVs envolvendo o cromossomo X.

A paciente 1 apresentou uma deleção de 14,5 Mb em Xq27.22q28, uma duplicação de 41,4 Mb em Xq22.1q27.1 e outra duplicação de 2,7 Mb em 20p13. O conteúdo gênico do braço longo do cromossomo X é sabidamente necessário para a manutenção da fertilidade. Isso é claramente demonstrado na Síndrome de Turner, onde há perda parcial ou completa do cromossomo X (Oktay *et al*.,2016). Vários estudos utilizando a técnica de microarranjos, reiteraram a ocorrência de uma frequência aumentada de IOP em pacientes que perderam parte do braço longo do cromossomo X (Quilter *et al*.,2012, Mercer *et al*.,2013). A região crítica do Xq para desenvolvimento e função ovariana foi identificada na região de Xq13.3 a Xq27 (Therman *et al*., 1990)

A região deletada do cromossomo X contém mais de 150 genes, entre eles estão os genes *FMR1* e *FMR2* contidos por inteiro nessa deleção, estão sabidamente associados a IOP. A pre mutação do *FMR1* é causa conhecida de IOP (Fortuño e Labarta.,2014) e Murray *et al*., associou a microdeleção do *FMR2* à 1,5% dos casos de IOP na coorte que estudou (Murray et al.,1999)

A região duplicada do cromossomo X contém 300 genes, alguns deles já previamente associados a IOP: *XPNPEP2* (X-prolyl aminopeptidase P 2, membrane-bound) em Xq25, o *COL4A6*(Collagen type IV, alpha 6) em Xq22.3, o *NXF5* (Nuclear RNA export fator 5) em Xq22.1 e o *PGRMCI* (Progesterone receptor membrane componet I), localizado em Xq22-q24 (Qin *et al*.,2015). Rearranjos do cromossomo X, tanto duplicações, quanto deleções, causam alterações na estrutura da cromatina e interrupção de alguns genes, o que pode levar a um processo de inativação de genes ligados ao X, que normalmente seriam ativos (Shelling AN, 2010).

Sugerimos que o quadro de IOP nessa paciente se justifica pela presença de um rearranjo complexo envolvendo os cromossomos X (Xq) e 20 (20p). Segundo Sala *et al*. (1997), vários *loci* no cromossomo X são requeridos em dose dupla para o funcionamento ovariano normal; portanto a interrupção de alguns genes por rearranjos estruturais (translocações X:autossomos e grandes deleções terminais), podem levar a perda de função dos mesmos. Infelizmente não tivemos mais acesso a paciente para a realização de estudos complementares, como a técnica de *Hibridação in situ por Fluorescência* (FISH), que pudessem comprovar nossa hipótese diagnóstica.

A paciente 3 apresentou uma deleção de 1 Mb em Xq13.2. Essa deleção envolve o centro de inativação do cromossomo X (XCI), que contém o gene *XIST* (*X Inactive Specific Transcript*), que codifica um RNA não-codificante (IncRNA), de ação *cis* que reveste o cromossomo a ser silenciado. Esse processo resulta no silenciamento de genes do cromossomo X; exceto em aproximadamente 15% de genes, que escapam da inativação (Peterson *et al.,*2017). Esse mecanismo assegura que o material genético de apenas uma cópia do cromossomo X seja expresso, promovendo um desenvolvimento saudável. A ausência do gene *XIST* no cromossomo X impede a sua inativação, permitindo assim a expressão de genes que seriam normalmente silenciados.

Hoon *et al*.,(2017) relata o caso de uma paciente com disgenesia gonadal 46,XX portadora de uma deleção de 1,28 Mb em Xq13, região que contém o *XIST* e todos os elementos e genes que executam a regulação *cis* relacionada à inativação cromossômica. No estudo observou-se que a inativação do cromossomo X não afetado ocorria nas células carreadoras da deleção,

indicando que esse processo pode ser iniciado na presença de apenas um XCI. Os resultados de Hoon *et al*, indicam que mecanismos *trans* são necessários para a inativação do cromossomo X, e que os elementos responsáveis estão provavelmente localizados fora da deleção. Portanto, pode-se supor que a deleção por si só, poderia justificar a disgenesia gonadal (Hoon et al.,2017).

O pareamento cromossômico completo do X parece ser um pré-requisito para a viabilidade dos oócitos e para o desenvolvimento gonadal. Deleções envolvendo Xq13 podem prejudicar o emparelhamentocromossômico e causar a atresia de oócitos, de acordo com os relatos de Therman e Susman (1990). Os autores descreveram em pacientes com amenorréia primária a presença de um ponto de quebra nessa região cromossômica (Therman e Susman; 1990).

Mutações na região promotora do gene *XIST* foram associadas à inativação não aleatória ou distorcida cromossomo X *(skewed XCI)* em mulheres de famílias não relacionadas. (Plenge *et al*.,1997).

Embora não exista consenso sobre a associação da inativação distorcida do cromossomo X e IOP, vários autores relacionam a doença a um padrão de inativação anormal do cromossomo X (Pu *et al.*; 2010; Brethericket *al.*; 2007; Sato *et al*., 2004)

Miranda-Furtado et al. na avaliação de 46 pacientes portadoras de IOP não sindrômico e 75 mulheres controles observou que o fenômeno de inativação distorcida do cromossomo X era mais frequente nas mulheres com IOP, especialmente naquelas com distorção extrema (≥90%) presente em 15% das mulheres da coorte (Miranda-Furtado *et al*.; 2018)

O real papel desempenhado pelos genes da região Xq13 no desenvolvimento ovariano ainda não está totalmente claro, estudos futuros serão necessários para entender a associação entre as deleções nessa região e IOP.

Outras duas CNVs menores no cromossomo X foram identificadas nesta coorte de pacientes. Uma microdeleção de 0,19 Mb em Xq21.31, que não contém genes, identificada na paciente 10 e uma microduplicação de 0,24 Mb em Xp22.33 na paciente 13, que contém o gene *DHRSX* (Dehydrogenase/reductase, X-Linked), aparentemente não relacionado a IOP.

6) CONCLUSÕES

1. A análise de regiões cromossômicas pela técnica de *microarray* permitiu identificar 19 variantes genômicas raras em 18 mulheres portadoras de IOP da coorte de pacientes selecionadas. A identificação de CNVs raras foi mais frequentes em pacientes com fenótipo severo (amenorreia primaria).

2. A técnica de *microarray* permitiu a elucidação diagnóstica e dos mecanismos patogênicos da IOP em 5 pacientes desta coorte (considerando os critérios de CNVs patogênicas e provavelmente patogênicas), corroborando para a proposição dessa metodologia como método de primeira linha na investigação.

3. Em sete pacientes foram identificadas diferentes regiões cromossômicas contendo novos genes candidatos e potencialmente envolvidos em mecanismos patogênicos e/ou em vias regulatórias do desenvolvimento, manutenção e função do tecido ovariano.
   - Os genes candidatos associados à disfunção ovariana identificados neste estudo foram *PTGFR* (1p31.1), *XDH* e *EHD3* (2p23.1), *PER2* (2q37.3), *KDM4C* (9p24.1), *ZNRF3* (22q12.1), gene *XIST* (Xq13.2) e *NLRP5* (19q13.43), o qual despertou um interesse particular.
   - Neste estudo associamos o gene *NLRP5* à condição de IOP pela primeira vez. Embora, ele já tenha sido relacionado à infertilidade feminina e implicado na formação do folículo primordial e no estabelecimento da reserva ovariana em fetos humanos, nosso achado fortalece as perspectivas de que variantes alélicas patogênicas no *NLRP5* podem representar uma nova causa de IOP.

4. A aplicação da metodologia de *microarray* se mostrou eficaz no diagnóstico etiológico da IOP, reforçando os dados disponíveis na

literatura e confirmando a relevância desse método no grande desafio, que é estabelecer as causas genéticas da insuficiência ovariana.

7) ANEXOS

ANEXO 1: História clínica e exame físico realizados na abordagem diagnóstica inicial de Insuficiência Ovariana Primária, realizada no Ambulatório do Desenvolvimento do HCFMUSP

HISTÓRIA CLÍNICA
História de intercorrências gestacionais e dados gerais de crescimento
Doenças e cirurgias prévias e uso de medicações
Presença de consanguinidade
Presença de fenótipo semelhante ao dos pacientes em irmãos ou outros familiares
Idade de menopausa da mãe, das irmãs e de outras mulheres da família
EXAME FÍSICO
Altura, peso, índice de massa corporal
Avaliação do desenvolvimento puberal
Características dismorficas
Avaliação da genitália
Exame físico geral

HCFMUSP: Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

ANEXO 2: Avaliação laboratorial e de imagem feitas inicialmente nas pacientes com IOP

EXAMES	Avaliação
FSH, LH, estradiol	Hipogonadismo hipergonadotrófico
Prolactina, TSH, T4livre, BHCG	Exclusão de outras causas de amenorréia
Ultrassonografia pélvica	Avaliar tamanho uterino e caracterização dos ovários
Anticorpos anti 21-hidroxilase	Afastar ooforite auto imune
Anticorpo anti TPO, anti TRG	Avaliar outras doenças auto-imunes
Cariótipo com bandamento G	Avaliar desordens cromossômicas

Anti-TPO: anti peroxidase, anti TRG: anti tireoglobulina, T4livre: tiroxina livre

Anexo 3

Descrição da investigação das pacientes do **Grupo I**- Pacientes com IOP e **Amenorréia Primária** que apresentavam ao exame físico clitoromegalia sem outros sinais de virilização, associada a valores elevados de testosterona sérica.

-Paciente 51: foi observada a presença de clitoromegalia (2,8 cm) sem outros sinais de virilização, associada a valores elevados de testosterona sérica (106ng/dl; valor referência sexo feminino dos 20-49 anos: < 12-48 ng/dl). A paciente realizou ressonância nuclear magnética pélvica, que não visualizou ovários; houve supressão dos níveis de testosterona com o uso de dexametasona, a complementação da investigação da origem da hiperandrogenemia esta sendo realizada.

-Paciente 66: foi observada a presença de clitoromegalia (2,5 cm) sem outros sinais de virilização, associada a valores elevados de testosterona sérica (146 ng/dl; valor referência sexo feminino dos 20-49 anos: < 12-48 ng/dl). Nesta paciente a hiperandrogenemia foi supressível com dexametasona e não supressível com análogo de GnRH. Realizou também um teste de estímulo com ACTH sintético, com resposta normal de incremento dos precursores hormonais ao estimulo. Nos exames de imagem submeteu-se a ressonância nuclear magnética de adrenal, que não mostrou anormalidades, e a ultrassonografia pélvica não conseguiu viasualizar os ovários.O diagnóstico de hiperandrogenemia funcional sem defeito de síntese, de provável origem adrenal foi estabelecido.

Anexo 4: Achados clínicos observados na coorte de 75 pacientes com IOP

ACHADOS CLÍNICOS	Amenorréia Primária N=53	Amenorréia Secundária N=22	Número Absoluto N=75 pacientes
Obesidade isoladamente	7	3	N=10
Obesidade e palato ogival	1	0	N=1
Obesidade e cúbito valgo	1	0	N=1
Palato ogival e cúbito valgo	1	1	N=2
Déficit cognitivo isolado	2	0	N=2
Clitoromegalia	2	1	N=3
Atraso DNPM, convulsões, dismorfismo facial, microcefalia, erupção dentária incompleta	1	0	N=1
Cúbito valgo, epicanto e retardo mental leve	1	0	N=1
Sindactilia em pododáctilos e palato ogival	1	0	N=1
Dentes extranumerários, manchas café com leite, cúbito valgo e palato ogival	1	0	N=1
Encurtamento de 4º metacarpo, baixa estatura e hipertelorismo mamário	1	0	N=1
Encurtamento 4º metacarpo, implantação em tridente dos cabelos na nuca e palato ogival	0	1	N=1
Cúbito valgo e déficit auditivo	1	0	N=1

8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboura A, Dupas C, Tachdijan G, et al. **Array comparative genomic hybridization profiling analysis reveals deoxyribonucleic acid copy number variations associated with premature ovarian failure**. J Clin Endocrinl Metab. 2009; 94(11), 4540-4546.

Achermann, JC, Domenice S, Bachega TA , et al. **Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics**. Nat Rev Endocrinol**.** 2015v. 11, n. 8,478-488.

Albertson DG, Pinkel D. **Genomic microarrays in human genetic disease and cancer**. Hum Mol Genet 2003;12 , No 2, 145–152.

Arboleda VA, Lee H, Sánchez FJ et al. **Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development**. Clin Genet2013 **,** 83, n. 1, 35-43.

Ballif BC, Kashork CD, Saleki R, et al**. Detecting sex chromosome anomalies and common triploidies in products of conception by array-based comparative genomic hybridization**. Prenat Diagn 2006,26,333–339.

Barasoain M., Barrenetxea G.,Huerta I., et al. **Study of the Genetic Etiology of Primary Ovarian Insufficiency: FMR1 Gene**. Genes 2016, 7, 123; doi:10.3390/genes7120123

Baronchelli S, Villa N, Redaelli S, et al. **Investigating the role of X chromosome breakpointsin premature ovarian failure.** Mol Cytogenet. 2012;5:32.

Beke A, Piko H, Haltrich I, Csomor J, *et al*. **Molecular cytogenetic analysis of Xq critical regions in premature ovarian failure**. Mol Cytogenet 2013;6:62.

Berisha B, Rodler D, Schams D**. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum.**Front. Endocrinol., 10 July 2019 | https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00467

Berry CE, Hare JM. **Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications**. J Physiol 2004;555(Pt 3):589-606.

Bestetti I, Castronovo C, Sironi A, Caslini C, Sala C, Rossetti R, et al. **High-resolution array-CGH analysis on 46,XX patients affected by early onset primary ovarian insufficiency discloses new genes involved in ovarian function**. Hum Reprod. 2019; 34(3):574–83. https://doi.org/10.1093/humrep/dey389 PMID: 30689869; PubMed Central PMCID: PMC6389867.

Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F*. et al*. **A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46, XX woman**. N Engl J Med. 2004;351:792–798.

Bione S, Rizzolio F, Sala C, Ricotti R, et al. **Mutation analysis of two candidate genes for premature ovarian failure, DACH2 and POF1B**. Hum Reprod. 2004, 19, 2759–2766.

Bouilly J, Roucher-Boulez F, Gompel A, et al. **New NOBOX mutations identified in a large cohort of women with primary ovarian insufficiency decrease KIT-L expression**. J Clin Endocrinol Metab 2015;3:994– 1001.

Bretherick KL, Metzger DL, Chanoine JP, et al . **Skewed X-chromosome inactivation is associated with primary but not secondary ovarian failure**. Am J Med Genet 2007;143A:945–51

Bridges PJ, Fortune JE. **Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle**. Mol Cell Endocrinol. 2007;15:1–9. doi: 10.1016/j.mce.2006.08.002

Brothman, AR. Et al. **Cytogenetics heteromorphisms. G-band regions that we have pondered for years**. Arch. Pathol. Lab. Med. 130, 947-949 (2006)

Castronovo C, Rossetti R, Rusconi D,et al. **Gene dosage as a relevant mechanism contributing to the determination of ovarian function in Turner syndrome**. Hum Reprod 2014;29:368–379.

Chapman C, Cree L, Shelling NA. **The genetics of premature ovarian failure: current perspectives**. International Journal of Women´s Health. 2015:7 799-810.

Chen H, Zhao L, Kumazawa M,*et al*. **Downregulation of core clock gene Bmal1 attenuates expression of progesterone and prostaglandin biosynthesis-related genes in rat luteinizing granulosa cells**. Am. J. Physiol. Cell Physiol.2013, 304 (12), C1131–C1140.

Cheung SW e Bi W. **Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics**, Expert Review of Molecular Diagnostics, (2018**)** DOI: 10.1080/14737159.2018.1479253

Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. **Incidence of premature ovarian failure**. Obstet Gynecol. 1986, 67,604–606.

Dixit H, Rao LK, Padmalatha V, Kanakavalli M,*et al*. **Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure**. Menopause 2005;6:749– 754.

Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL,et al. **Mutations in NLRP5 are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans**. Nat Commun 2015;6:8086.

Elassar, A., Liu, X., Scranton, V., Wu, C.-A., Peluso, J.J. **The relationship between follicle development and progesterone receptor membrane component-1 expression in women undergoing in vitro fertilization**. Fertil. Steril. 97, 572–578(2012)

Fahrenkrug J., Georg B.,Hannibal J., et al. **Diurnal rhythmicity of the Clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary**. Endocrinology 147 (2006) 3769–3776

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. **Structural variation in the human genome**. Nat Rev Genet 2006;7:85 – 97

Fonseca DJ, Garzon E, Lakhal B, *et al*.,.**Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients**. Reprod Biomed Online 2012a;3:339 –341.

Fortune JE**. Ovarian follicular growth and development in mammals.** Biol Reprod. (1994) 50:225–32. doi: 10.1095/biolreprod50.2.225

Fortuño C, Labarta E. **Genetics of primary ovarian insufficiency: a review**. J Assist Reprod Genet (2014) 31:1573–1585 DOI 10.1007/s10815-014-0342-9

França MM, Funari MFA , Lerario AM, et al. **Screening of targeted panel genes in Brazilian patients with primary ovarian insufficiency**. PLOS ONE | https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240795 October 23, 2020

Franic-Ivanisevic M, Franic D, Ivovic M, *et al*.**Genetic Etiology of Primary Premature Ovarian Insufficiency**. Acta Clin Croat2016 Dec;55(4):629-635. doi: 10.20471/acc.2016.55.04.14

Fusco, F., *et al*. **Genetic and molecular analysis of a new unbalanced X;18 rearrangement: localization of the diminished ovarian reserve disease locus in the distal Xq POF1 region.** Hum. Reprod. 26, 3186–3196 (2011).

Gabriel AS, Thornhill AR, Ottolini CS, et al. **Array comparative genomic hybridisation on first polar bodies suggests that non-disjunction is not the predominant mechanism leading to aneuploidy in humans**. J Med Genet 2011,48,433–437.

Galperin E, Benjamin S, Rapaport D, *et al*. **EHD3: a protein that resides in recycling tubular and vesicular membrane structures and interacts with EHD1.** Traffic 3. 2002;575–589. doi:10.1034/J.1600-0854.2002.30807.X

Giannini A, Genazzani AR, Simoncini T. **The long-term risks of premature ovarian insufficiency. Gynecol Endocrinol.** 2016; 3(8): 61-66

Goswami D, Conway GS. **Premature ovarian failure**. Human Reproduction Update. 2005, 11, 391-410

Handyside AH, Harton GL, Mariani B. **Karyomapping: a universal method for genome wide analysis of genetic disease based on mapping crossovers between parental haplotypes**. J Med Genet 2010, 47,651–658.

Hao HX, Xie Y, Zhang Y, *et al* **.ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner**. Nature. 2012; 485:195–200

Harris A, Siggers P, Corrochano S, *et al*.**ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling.** | PNAS | May 22, 2018 | vol. 115 | no. 21, 5474–5479

Hoon B., Splinter E., Eussen B., *et al*.**X chromosome inactivation in a female carrier of a 1.28 Mb deletion encompassing the human X inactivation centre**.Phil. Trans. R. Soc. B 372: 20160359.(2017)

Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, *et al*. **Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency**. Trends Endocrinol Metab. 2018; 29(6):400–19. Epub 2018/04/26. https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.03.010 PMID: 29706485

Hyon C., Mansour-Hendili L;,Chantot-Bastaraud S, *et al*. **Deletion of CPEB1 Gene: A Rare but Recurrent Cause of Premature Ovarian Insufficiency**J Clin Endocrinol Metab, May 2016, 101(5):2099 –2104

Jaillard S, Akloul L, Beaumont M, Hamdi-Roze H, Dubourg C, Odent S, *et al.***Array-CGH diagnosis in ovarian failure: identification of new molecular actors for ovarian physiology**. J Ovarian Res. 2016; 9 (1):63. Epub 2016/10/03. https://doi.org/10.1186/s13048-016-0272-5 PMID: 27716277; PubMed Central PMCID: PMC5048446.

Jonkers I, Barakat TS, Achame EM.**RNF12 is an X-encoded dosedependent activator of X chromosome inactivation**. Cell 139, 999 – 1011. (doi:10.1016/j.cell.2009.10. 034)- 2009

Jun M, Zeng F, Richard M. *et al.* **Basonuclin: a novel mammalian maternal-effect gene.** Development. 2006;133:2053-2062. doi:10.1242/dev.02371

Kavlock R, Barr D, Boekelheide K, *et al*. **NTP-CERHR Expert panel update on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate.** Reprod Toxicol. 2006; 22(3):291-399.

Kennaway DJ, Boden MJ, Varcoe TJ. **Circadian rhythms and fertility. Mol**. Cell Endocrinol. 2012;349:56–61.

Kennaway DJ, Boden MJ, Voultsios, A. **Reproductive performance in female clock delta19 mutant mice.** Reprod Fertil. Dez. 2004;16:801–810.

Klein DA e Poth MA**. Amenorrhea: An Approach to Diagnosis and Management.** American Family Physician, vol 87, number 11, 2013

Knoll JH, Rogan PK. **Sequence-based, *in situ* detection of chromosomal abnormalities at high resolution**. Am J Med Genet A. 2003, 121:245-257

Kulikowski LD. **Citogenômica Aplicada à Prática Médica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S*. et al***. Mcry1 and mcry2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop**. Cell 1999; 98:193–205.

Lacombe A, Lee H, Zahed L, Choucair M, et al**. Disruption of POF1B binding to nonmuscle actin filaments is associated with premature ovarian failure**. Am J Hum Genet 2006;1:113 –119.

LaFramboise T. **Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances**. Nucleic Acids Res. 2009,37, 4181–4193.

Ledig S, Ropke A, Wieacker P. **Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis.** Sex Dev. 2010,4,225–232.

Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. **Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders**. Nature Genetics, vol 39, july 2007; doi:10.1038/ng2092

Leppig KA, Brown CJ, Bressler SL,.*et al*.**Mapping of the distal boundary of the X-inactivation center in a rearranged X-chromosome from a female expressing XIST**. Hum. Mol. Genet. 2, 883 – 887. (doi:10.1093/hmg/2.7.883)-1993

Liu JC, Li L, Yan HC. **Identification of oxidative stress–related Xdh gene as a di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) target and the use of melatonin to alleviate the DEHP-induced impairments in newborn mouse ovaries**. J Pineal Res. 2019;67:e12577. wileyonlinelibrary.com/journal/jpi | 1 of 16https://doi.org/10.1111/jpi.12577

Liu JC, Lai FN, Li L, *et al*. **Di (2-ethylhexyl) phthalate exposure impairs meiotic progression and DNA damage repair in fetal mouse oocytes in vitro**. Cell Death Dis. 2017; 8 (8): e2966.

Liu K, Rajareddy S, Liu L. et al. **Control ofmammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer**. Dev Biol. 2006;299:1–11.

Loh YH, Zhang W, Chen X. *et al*. **Jmjd1a and Jmjd2c histoneH3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells**. Genes Dev. 2007; 21:2545–2557.

Lourenco D, Brauner R, Lin L, De Perdigo A, *et al*. **Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency**. N Engl J Med 2009;12:1200 –1210

Ma J**,** Zeng F, Schultz RM, Tseng H**.Basonuclin: a novel mammalian maternal-effect gene.**Development. 2006 May;133(10):2053-62. doi: 10.1242/dev.02371. Epub 2006 Apr 19.PMID: 16624857

MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, *et al*. **The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome**. Nucleic Acids Res. 2013;42:D986–D992.

Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, *et al*. **Alterations in the expression., structure and function of progesterone receptor membrane componente-I (PGRMCI) in premature ovarian failure**. Human Molecular Genetics (2008) 17 3776-3783. (doi:10.1093/hmg/ddn274)

McGuire MM, Bowden W, Engel NJ, Ahn HW, Kovanci E, Rajkovic A**. Genomic analysis using high-resolution single-nucleotide polymorphism arrays reveals novel microdeletions associated with premature ovarian failure.** Fertil Steril. 2011; 95(5):1595–600. Epub 2011/01/22. https://doi.org/10.1016/j. fertnstert.2010.12.052 PMID: 21256485; PubMed Central PMCID: PMC3062633.

Mercer CL, Lachlan K, Karcanias A. **Detailed clinical and molecular study of 20 females with Xq deletions with special reference to menstruation and fertility.** European Journal of Medical Genetics 56 (2013) 1-6

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, *et al*. **Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies**. The American Journal of Human Genetics 86, 749-764, May 14, 2010

Minghui C, Yanwen X, Benyu M. *et al*. **Expression pattern of circadian genes and steroidogenesis-related genes after testosterone stimulation in the human ovary.** Journal of Ovarian Research. 2016;9:56.

Mintz L, Galperin E, Pasmanik-Chor M, *et al*. **EHD1: an EH- domain containing protein with a specific expression pattern**. Genomics.1999; 59, 66 -76. doi:10.1006

Miranda-Furtado CL, Luchiari HR, Chielli DC, et al. **Skewed X-chromosome inactivation and shorter telomeres associate with idiopathic premature ovarian insufficiency**. -Fertil Steril 2018 Aug;110(3):476-485.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.017

Mu J, Wang W, Chen B, Wu L, Li B, Mao X, Zhang Z, Fu J, Kuang Y, Sun X, Li Q, Jin L et al. **Mutations in NLRP2 and NLRP5 cause female infertility characterised by early embryonic arrest**. J Med Genet 2019; DOI:10.1136/jmedgenet-2018-105936.

Mu X, Liao X, Chen X, *et al*. **DEHP exposure impairs mouse oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly through estrogen receptor-dependent and independent mechanisms.** J Hazard Mater. 2015; 298:232-240.

Murray A, Webb J, Dennis N, Conway G, Morton N. **Microdeletions in FMR2 may be a significant cause of premature ovarian failure**. J Med Genet. 1999;36:767–70.

Nelson LM. **Clinical features and diagnosis of autoimmune primary ovarian insufficiency (premature ovarian failure)**. UpToDate, Sep 2015 (literature review: Apr 2016). Acessível em: http://www.uptodate.com/contents/clinical-features-and-diagnosis-of-autoimmuneprimary-ovarian-insufficiency-premature-ovarian-failure

Newman S, Hermetz KE, Weckselblatt B, Rudd MK. **Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints**. Am J Hum Genet 2015;96:208 – 220.

Norling A, Hirschberg AL, Rodriguez-Wallberg KA, et al. **Identification of a duplication within the GDF9 gene and novel candidate genes for primary ovarian insufficiency (POI) by a customized high-resolution array comparative genomic hybridization platform.** Hum Reprod 2014;8:1818 – 1827.

Norling A, Linden Hirschberg A, Iwarson E, *et al*. **Novel candidate genes for 46,XY gonadal dysgenesis identified by a customized 1 M array-CGH platform**. Eur J Med Genet.2013,v. 56, n. 12, 661-668.

Oktay K, Bedoschi G, Berkowitz K, *et al*. **Fertility preservation in women with Turner syndrome: a comprehensive review and practical guidelines**. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2016;29(5):409-16. https://doi.org/10.1016/j.jpag.2015.10.011.

Parissone F, Pucci M, Meneghelli E, *et al*. **A novel de novo partial xq duplication in a girl with short stature, nonverbal learning disability and diminished ovarian reserve - effect of growth hormone treatment and fertility preservation strategies: a case report and up-to-date review**. International Journal of Pediatric Endocrinology. (2020); 2020:1

Peluso JJ., 2013. **Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth**. Front. Neurosci. 7, 99 (2013)

Perry JRB, Corre T, Esko T, *et al*. **A genome-wide association study of early menopause and the combined impact of identified variants**. Hum Mol Genet. 2013,22(7),1465–1472.

Persani L, Rossetti R, Cacciatore C. **Genes involved in human premature ovarian failure.** J Clin Endocrinl Metab. 2010; 45,257-279.

Peterson FJ, Basel DG,Bick DP**. A Rare Combination of Functional Disomy Xp, Deletion Xq13.2-q28 Spanning the XIST Gene, and Duplication 3q25.33-q29 in a Female with der(X)t(X;3)(q13.2;q25.33)**. J Pediatr Genet 2018;7:23–28. (2017)

Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, *et al*. **A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation**. Nat Genet. 1997;17:353-6.

Poretsky L, Cataldo N A, Rosenwaks Z, *et al*. **The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease**. Endocr Rev. 1999; 20, 535–582. doi:10.1210/ER.20.4.535

Pu D, Wu J, Liu J, *et al*.**Skewed X chromosome inactivation may be not associated with premature ovarian failure.** Gynecol Endocrinol. 2010 Jun;26(6):423-8. doi: 10.3109/09513591003632217

Qin Y, Jiao X, Simpson JL, *et al*. **Genetics of primary ovarian insufficiency: new developmentes and opportunities**. Human Reproduction Update, 2015, Vol 21, No 6, 787-808.

Qin Y, Shi Y, Zhao Y, Carson SA,*et al*. **Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure**. Fertil Steril 2009; 4(Suppl):1507 –1509.

Quilter CR, Karcanias AC, Bagga MR, Duncan S, Murray A, Conway GS, Sargent CA, Affara NA. **Analysis of X chromosome genomic DNA sequence copy number variation associated with premature ovarian failure (POF)**. Hum Reprod 2010;25:2139–2150.

Ravel C., Nazdar N., Leveque J. **Fertilité et insuffisance ovarienne: de nouveaux traitements en perspective ?Ovarian failure: New treatments in perspective?**Gynècologie Obstètrique & Fertilitè (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.gyobfe.2015.10.008

Reynaud K, Cortvrindt R, Verlinde F, *et al*. **Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45,X Karyotype**. Fertility and Sterility. 2003, 81, 1112-1119.

Riggs ER, Andersen EF,Cherry AM. **Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen**).Genetics in Medicine | Volume 0 | Number 0 | Month 2019

Rizzolio F, Bione S, Sala C, *et al*. **Chromosomal rearrangements in Xq and premature ovarian failure: mapping of 25 new cases and review of the literature**. Hum Reprod. 2006, 21,1477–1483

Rosen M, Cedars MI. Endocrinologia reprodutiva feminina e infertilidade. In: Greenspan FS, Gardner DG (Org.). **Endocrinologia Básica e Clínica**. Editora McGraw-Hill. 2006, 7ª edição, 417-460.

Rotem-Yehudar R, Galperin E, Horowitz M. **Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29**. J Biol Chem. 2001;276-33 054–33 060. doi:10.1074/JBC.M009913200

Ruth KS., Murray A. **Lessons from Genome-Wide Association Studies in Reproductive Medicine: Menopause.** Semin Reprod Med 2016;34:215–223

Sala, C., Arrigo, G., Torri, G. *et al.* **Eleven X chromosome breakpoints associated with premature ovarian failure (POF) map to a 15-Mb YAC contig spanning Xq21. Genomics**. 1997.40 **,** 123–131.

Sanlaville, D., Schluth-Bolard, C., Turleau, C. **Distal Xq duplication and functional Xq disomy**. Orphanet J. Rare Dis. 4, 4 (2009).

Sato K, Uehara S, Hashiyada M, Nabeshima H, Sugawara J, Terada Y, et al. **Genetic significance of skewed X-chromosome inactivation in premature ovarian failure**. Am J Med Genet A 2004; 130:240-4.

Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL**. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics**. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2011,12,25–51.
Schlessinger D, Herrera L, Crisponi L, et al. **Genes and translocations involved in POF**. Am J Med Genet2002;111:328–333

Schuster, J., Karlsson, T., Karlström, P.-O., Poromaa, I.S., Dahl, N. **Down-regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in peripheral nucleated blood cells associated with premature ovarian failure (POF) and polycystic ovary syndrome (PCOS)**. Reprod. Biol. Endocrinol. 8, 58 (2010).

Sciarra F, Franceschini E, Campolo F, *et al.***Disruption of Circadian Rhythms: A Crucial Factor.** Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 3943; doi:10.3390/ijms21113943

Sebat, J. et al. **Copy number polymorphism in the human genome**. Science 3-5, 525-528(2004).

Sellix MT.**Circadian Clock Function in the Mammalian Ovary**. J Biol Rhythms. 2015;30(1),7-19.

Sen A, Hoffmann HM. **Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis**. Mol. Cell Endocrinol. 2020; 501, 110655

Separovic ER. **Chromosome microarrays in human reproduction**. Human Reproduction Update, 2012, Vol 18, No5, 555-567.

Shaffer LG, Bejjani BA. **A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays**. Hum Reprod Update. 2004,10,221–226.

Shelling AN. **Premature ovarian failure**. Reproduction. 2010, 140(5), 633–641.

Shimizu, T., *et al.*.**Circadian Clock genes Per2 and clock regulate steroid production, cell proliferation, and luteinizing hormone receptor transcription in ovarian granulosa cells**. Biochem. Biophys. Res. Commun.2011, 412 (1), 132–135.

Simpson JL.**Genetic and Phenotypic Heterogeneity in Ovarian Failure Overview of Selected Candidate Genes**.Ann. N.Y. Acad. Sci. 1135: 146–154 (2008). C 2008 New York Academy of Sciences. doi: 10.1196/annals.1429.019

Sirko-Osada DA, Cassidy SB, Depinet TW,*et al*. **Molecular refinement of Karyotype: Beyond the cytogenetic band**. Genet Med 1999, 1, 245-261.

Skarzynski DJ, Piotrowska-Tomala KK, Lukasik K. *et al*. **Growth and regression in bovine corpora lutea: regulation by local survival and death pathways**. Reprod Domest Anim. 2013;48(Suppl.1):25–37. doi: 10.1111/rda.12203

Skinner MK.**Regulation of primordial follicle assembly and development**. Hum Reprod Update (2005) 11:461– 471

Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. **Genetic and epigenetic regulators of pluripotency**. Cell. 2007;128:747–762.

Tay,J.,and Richter,J.D.**Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice**. Dev. Cell 1, 201–213 (2001).

Therman E, Susman B. **The similarity of phenotypic effects caused by Xp and Xq deletions in the human female: a hypothesis**. Hum. Genet. 85, 175–183. (doi:10.1007/BF00193192)-1990

Toh KL, Jones CR., He Y, *et al*. **An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome.** Science. 2001; 291:1040-1043.

Tong XK, Hussain NK, Adams AG. *et al*. **Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis**. J Biol. Chem. 2000; 275, 29: 894–29 -899. doi:10.1074/JBC.M004096200

Tong Z B, Gold L, Pfeifer KE.*et al*. **Mater a maternal effect gene required for early embryonic development in mice**. Nat. Genet. 2000;26:267–268.

Tong ZB, Nelson LM. **A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure**. Endocrinology 1999;140:3720 – 3726.

Trau HA, Davis JS, Duffy DM**. Angiogenesis in the primate ovulatory follicle is stimulated by luteinizing hormone via prostaglandin E2.** Biol Reprod. (2015) 92:15. doi: 10.1095/biolreprod.114.123711.

Tsuiko O., Noukas M, Zilina O., *et al*.**Copy number variation analysis detects novel candidate genes involved in follicular growth and oocyte maturation in a cohort of premature ovarian failure cases**. Human Reproduction, Vol.31, No.8 pp. 1913–1925, 2016

User Manual CytoScan AffymetrixAssay, 2011-2012.

Vainio S, Heikkilä M, Kispert A. *et al.***Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling**

Van Kasteren YM, Handscheid RD, Smits AP, Cremers FP, van Zonneveld P, Bread DD. **Familial idiopathic premature ovarian failure – an overrated and underestimated genetic disease**. Hum Reprod. 1999;14:2455-9.

Van Kasteren YM, Handscheid RD, Smits AP, Cremers FP,*et al*.**Familial idiopathic premature ovarian failure** – an overrated and underestimated genetic disease. Hum Reprod. 1999;14:2455-9.

van Kasteren YM, Schoemaker J. **Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy**. Hum Reprod Update. 1999, 5, 483– 492.

Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, et al**. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos.** Nat Med 2009;15:577–583**.**

Vermeesch JR, Fiegler H, Leeuw N.*et al*.**Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis**. European Journal of Human Genetics (2007) 15, 1105–1114; doi:10.1038/sj.ejhg.5201896; published online 18 July 2007

Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K et al. **Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities**. Am J Hum Genet. 2003,73,1261–1270.

Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, van Bon BW. *et al*.. **Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation**. Hum Mutat 2013; 34:1679 – 1687.

Wang J, Wang B, Song J. **New candidate gene POU5F1 associated with premature ovarian failure in Chinese patients.** Reproductive BioMedicine Online (2011) 22: 312– 316

Wang J, Zhang M, Zhang Y.**The Histone Demethylase JMJD2C is Stage-Specifically Expressed in Preimplantation Mouse Embryos and Is Required for Embryonic Development**. Bilogy of Reproduction. 2010; 82, 105–111. Published online before print 19 August 2009. DOI 10.1095/biolreprod.109.078055

WatMJ, Enciso VB,WiszniewskiW, et al. **Recurrent microdeletions of 15q25.2 are associated with increased risk of congenital diaphragmatic hernia, cognitive deficits and possibly Diamond–Blackfan anaemia**. J Med Genet. 2010;47:777–781

Webber L, Davies M, Anderson R.**ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency.The ESHRE Guideline Group on POI**. Human Reproduction. 2016; No. pp. 1 –12.

Weise A, Mrasek K, Klein E, *et al*. **Microdeletion and microduplication syndromes.** J Histochem Cytochem. 2012;60:346 –358.

Welk JF, Charlesworth A, Smith GD, MacNicol AM. **Identification and characterization of the gene encoding human cytoplasmic polyadenylation element binding protein**. Gene. 2001;263:113–120.

Woad KJ, Prendergast D, Winship IM, *et al*. **FSH receptor gene variants are rarely associated with premature ovarian failure**. Reprod Biomed Online 2013; 4:396– 399

Yatsenko SA, Rajkovic A. **Genetics of human female infertility**. Biology of Reproduction, 2019, 0(0), 1–18 doi:10.1093/biolre/ioz084

Yunis JJ. **High resolution of human chromossomes**. Science, 1976; 191: 1268-1270

Zhang D, Liu Y, Zhang Z, *et al*. **Basonuclin 1 deficiency is a cause of primary ovarian insufficiency.** Human Molecular Genetics, 2018, Vol. 27, No. 21 3787–3800

Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, Shi Y,*et al*. **Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure**. Am J Hum Genet 2008; 6:1342 – 1348.

Zheng Y, Liu C, Li Y, *et al*. **Loss-of-function mutations with circadian rhythm regulator per1/per2 lead to premature ovarian insufficiencydagger**. Biol. Reprod. 2019.

Zhu K, Yan L, Zhang X. **Identification of a human subcortical maternal complex.** Molecular Human Reproduction. 2015; Vol.0, No.0 pp. 1–10, 201 doi:10.1093/molehr/gau116 Mol.

Zielak AE, Forde N, Parke SDE, *et al*. **Identification of novel genes associated with dominant follicle development in cattle.** Reproduction, Fertility and development. 2007; 19: 967–975.