

Vanessa Tavares Almeida

**Investigação do *Status* Genômico da Metilação na Síndrome *Cri Du Chat*
utilizando *Arrays***

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2023

Vanessa Tavares Almeida

**Investigação do *Status* Genômico da Metilação na Síndrome *Cri Du Chat*
utilizando *Arrays***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Doutor em Ciências.

Programa de Patologia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leslie Domenici Kulikowski

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Vanessa Tavares
Investigação do Status Genômico da Metilação na
Síndrome Cri Du Chat utilizando Arrays / Vanessa
Tavares Almeida. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.
Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1.Doenças raras 2.Genética humana
3.Síndrome Cri du Chat 4.Metilação do DNA
5.Epigenética 6.Array

USP/FM/DBD-076/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos pacientes com Cri Du Chat e portadores de doenças raras, que nunca falte amor e esperança. Eu vejo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** pela oportunidade de realizar esse trabalho e por todas as bênçãos que me incentivam a buscar o melhor para minha vida.

À minha mãe **Cleuza** por todo amor e dedicação e ao meu pai **Domingos** (*in memoriam*), por todos os ensinamentos. Tudo o que eu aprendi de mais bonito nessa vida foi graças a você.

Ao meu irmão **Guilmer** por sempre me mostrar o melhor caminho a ser percorrido e por ser quem você é. À minha irmã **Érika** por toda confiança e admiração, sempre.

Ao **Núcleo Cri Du Chat e às famílias** dos pacientes com 5p- por me permitirem realizar esse trabalho, vocês são essenciais.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof.^a Dr.^a **Leslie Kulikowski** por ter me aceitado como sua aluna e por toda contribuição no meu percurso na pesquisa científica e nos quatro anos de laboratório.

À Dr.^a **Samar Chehimi** por ter compartilhado comigo a sua pesquisa e pacientes, além de toda ajuda e ensinamentos sobre *Cri Du Chat* e genética. Estamos juntas!

Ao Dr. **Alexandre Torchio** por ter me apresentado à família citogenômica e por todo apoio. À Dr.^a **Marília Montenegro** por todo auxílio e por todos os ensinamentos.

À Dr.^a **Chong Kim e aos residentes e médicos** do serviço de genética, por todo auxílio e conhecimento compartilhado.

Aos companheiros de pesquisa e laboratório, **Yanca, Gleyson, Amom, Lucas** e **Beatriz** por tantos momentos compartilhados ao longo desses anos. Com vocês essa jornada se tornou muito mais leve, doce e prazerosa.

Às minhas irmãs de jornada, **Pamela, Tawany, Ana Paula, Adriana** e **Clara** por todo apoio e momentos de descontração tão necessários nessa grande escola que é a vida.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade coletiva por toda a humanidade."

Marie Curie

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	30
1.1 Considerações sobre a Síndrome <i>Cri Du Chat</i>	30
1.2 Considerações sobre Epigenética.....	31
1.2.1 <i>Metilação do DNA</i>	32
1.2.2 <i>Modificações das histonas</i>	34
1.3 Possíveis fontes de variabilidade fenotípica.....	36
1.3.1 <i>Pontos de quebra genômicos</i>	36
1.3.2 <i>Expressividade variável e efeito de posição</i>	37
1.3.3 <i>Modificadores genéticos</i>	38
1.3.4 <i>Metilação do DNA em síndromes raras</i>	39
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Principal.....	42
2.2 Objetivos Secundários.....	42
3 MÉTODOS	44
3.1 Casuística.....	44
3.2 Técnica de <i>array</i> epigenômico para o estudo da metilação.....	45
3.3 Análise dos dados.....	48
3.3.1 <i>Análise das amostras genotipadas por estudo anterior (array genômico)</i>	48
3.3.2 <i>Análise do experimento de metilação (array epigenômico)</i>	50
4 RESULTADOS	54
4.1 Resultados do array genômico (<i>HumanCyto-850K BeadChip</i>).....	54
4.2 Resultados obtidos pelo array epigenômico (<i>HumanMethylationEPIC</i>)..	56

4.2.1	<i>Análise 1: metilação diferencial global entre SCDC versus Controles</i>	
	- <i>HumanMethylationEPIC 850K</i>	57
4.2.1.2	<i>Análise da metilação diferencial fenotípica entre pacientes com SCDC</i>	63
4.2.1.3	<i>Análise do mapeamento da metilação nos pontos de quebra 5p-</i>	
	65
4.2.1.4	<i>Análise da idade biológica (DNAmAge</i>	66
4.2.2	<i>Análise 2: metilação diferencial global entre SCDC versus Controles</i>	
	- <i>HumanMethylation 450K</i>	67
5	DISCUSSÃO	72
5.1	Deleção 5p <i>versus</i> regiões teloméricas.....	72
5.2	Correlação genótipo-fenótipo.....	73
5.3	Considerações sobre o estudo da metilação do DNA em síndromes genéticas raras.....	81
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7	CONCLUSÕES	86
8	ANEXO A	88
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	APÊDICES	101

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do cromossomo 5, com destaque da região do braço curto (p).....	31
Figura 2	Cobertura da metilação do genoma completo.....	33
Figura 3	A metilação do DNA em regiões promotoras específicas evita a transcrição gênica ao inativar um determinado gene.....	35
Figura 4	A: o ensaio Infinium I contém duas sondas que interrogam o locus CpG, uma sonda específica para CpG metilado e outra para CpG não metilado.....	46
Figura 5	A desaminação da citosina consiste na remoção de um grupo amino (NH ₂), que resulta em uracila.....	47
Figura 6	Imagem do cromossomo 5 da amostra da Paciente 1.....	54
Figura 7	Representação esquemática da extensão das deleções detectadas (barras lilás, com start e end).....	56
Figura 8	Heatmap do ponto de quebra dos 15 pacientes (HumanMethylationEPIC850K), mostrando o mapa de coordenadas genômicas da região crítica (5p-).....	65
Figura 9	Heatmap dos 7 pacientes e 3 controles (HumanMethylation450K), os irmãos 16 e 17 estão destacados em vermelho e os controles em azul.....	68
Figura 10	Heatmap do ponto de quebra dos 2 irmãos (destaque vermelho) e 3 controles (destaque azul).....	70
Figura 11	Top 4 sondas diferencialmente metiladas entre a paciente 2 e os pacientes 5p.....	74
Figura 12	Heatmap evidenciando o perfil de metilação da paciente 2 x pacientes com 5p-.....	75
Figura 13	Top 4 sondas diferencialmente metiladas entre a paciente 12 e os pacientes 5p-.....	76
Figura 14	Heatmap evidenciando o perfil de metilação da paciente 12 x pacientes com 5p-.....	77
Figura 15	Ontologia gênica de processo biológico do paciente 13, evidenciando as vias de metilação das histonas.....	79

Figura 16	Heatmap evidenciando o perfil de metilação do paciente 13 x pacientes com 5p-.....	79
Figura 17	Heatmap evidenciando o perfil de metilação da paciente 3 x pacientes com 5p-.....	80
Figura 18	Heatmap evidenciando o perfil de metilação dos pacientes 8 e 11 x pacientes com 5p-.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição das amostras estudadas.....	44
Tabela 2	Principais bancos de dados disponíveis online para classificação das CNVs.....	49
Tabela 3	Principais pacotes utilizados para as etapas realizadas.....	50
Tabela 4	Resultados obtidos por meio do array de genotipagem para a deleção em 5p, mostrando os pontos de quebra para cada paciente.....	55
Tabela 5	Lista detalhada das Top 30 regiões diferencialmente metiladas (DMRs).....	57
Tabela 6	Descrição das 10 DMRs significativas fora da região 5p.....	60
Tabela 7	Descrição das principais vias biológicas com base nas DMPs.....	61
Tabela 8	Características fenotípicas dos pacientes com 5p-.....	63
Tabela 9	Diferenças das características fenotípicas entre os pacientes com 5p-.....	64
Tabela 10	Estimativa de DNAmAge com base em marcadores de metilação..	66
Tabela 11	Características fenotípicas dos irmãos com o mesmo tamanho de deleção 5p.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Gráfico de barras apresentando as médias dos valores de P58
- Gráfico 2** Gráficos de densidade mostrando a distribuição dos valores β59
- Gráfico 3** Gráfico global de PCoA (Análise de Coordenada Principal)60
- Gráfico 4** Gráfico de dispersão com distribuição de idades cronológicas.....66

LISTA DE ABREVIATURAS

Ctrl	Controle
5p-	Deleção no braço curto do cromossomo 5
22q-	Deleção no braço longo do cromossomo 22
Dr.	Doutor
Dr. ^a	Doutora
et al.	E outros (as)
F	Feminino
Fig.	Figura
InDel	Inserção/Deleção
M	Masculino

LISTA DE SIMBOLOS

~	Aproximadamente
β	Beta
p	Braço curto do cromossomo
q	Braço longo do cromossomo
CpG	CG-dinucleotídeo onde o C é comumente metilado
CH ₃	Grupo metil
COCH ₃	Grupo acetil
NH ₂	Grupo amino
Kb	Kilobase
>	Maior que
<	Menor que
Mb	Megabase
μ L	Microlitro
ng	Nanograma
%	Porcentagem
hg19	Referência de nucleotídeos do genoma humano
<i>P</i>	Valor de <i>P</i>

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
ACMG	Colégio Americano de Genética Médica e Genômica
ADNPM	Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor
BP	Processos Biológicos
C	Citosina
CC	Componentes Celulares
CGH-array	Hibridação Genômica Comparativa
ClinGen	<i>Clinical Genome Resource</i>
CNV	Varição no Número de Cópias
DECIPHER	<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DI	Deficiência Intelectual
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAmAge	Idade biológica por meio de marcadores de metilação do DNA
DMPs	Sondas Diferencialmente Metiladas
DMRs	Regiões Diferencialmente Metiladas
FISH	Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência
G	Guanina
GO	<i>Gene Ontology</i>
GRCh37	<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICr	Instituto da Criança
ICR	Regiões de controle de <i>imprinting</i>
K	Lisina
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>

LCRs	Regiões de repetições com baixo número de cópias
MBP	Proteínas de domínio de ligação metil-CpG
MF	Funções Moleculares
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PCoA</i>	Análise de coordenada principal
PWS	<i>Prader-Willi</i>
R	Arginina
ROHs	Regiões de Homozigosidade
RNA	Ácido Ribonucleico
SCDC	Síndrome <i>Cri Du Chat</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SNV	Variante de Nucleotídeo Único
SV	Variantes Estruturais
SW	Síndrome de Williams
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TERRA	RNA contendo repetição telomérica
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
UPD	Dissomia Uniparental
VOUS	<i>Variants of Uncertain clinical Significance</i>

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Almeida, VT. *Investigação do Status Genômico da Metilação na Síndrome Cri Du Chat utilizando Arrays* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A síndrome *Cri Du Chat*, ou síndrome 5p- (OMIM #123450) é caracterizada por uma deleção terminal ou intersticial no braço curto do cromossomo 5 que acarreta manifestações clínicas variáveis, incluindo um choro estridente nos recém-nascidos, baixo peso, microcefalia, hipertelorismo ocular, micrognatia, hipotonia, alterações neurológicas e comportamentais, atraso no crescimento e no desenvolvimento global. Diferentes rearranjos citogenômicos, antecedentes familiares e fatores ambientais podem dificultar a associação genótipo-fenótipo. Assim, a variabilidade fenotípica desta síndrome pode não estar limitada apenas a variações na estrutura dos genes, como deleções, duplicações, inversões, inserções e translocações, sendo possível que outros mecanismos relacionados à ativação ou inativação de promotores e/ou éxons de genes ativamente transcritos, como a metilação do DNA, que ocorre principalmente nas “ilhas CpG”, estejam envolvidos. Sendo assim, estudamos o perfil do *status* da metilação do genoma completo de pacientes com 5p- para verificar as regiões diferencialmente metiladas. Avaliamos amostras de sangue periférico de 22 pacientes com 5p- e 12 amostras controles previamente genotipadas por *array* genômico (*HumanCyto850KBeadChip® - Illumina*), para delinear o ponto de quebra genômico e caracterizar os rearranjos estruturais, realizamos o ensaio de *array* epigenômico (*MethylationEPICBeadChip® - Illumina*), a fim de identificar as regiões diferencialmente metiladas. A análise dos resultados do *array* genômico foi realizada pelo programa *BlueFuse™ Multi v4.5 (BlueGnome®)* e a análise dos resultados do *array* epigenômico foi feita por meio do programa de linguagem *R v4.0.2*. Foi possível identificar que o perfil de metilação dos pacientes com síndrome Cri Du Chat são distintos entre si, mesmo alguns pacientes possuindo praticamente o mesmo tamanho de deleção. Verificamos que as regiões diferencialmente metiladas fora da região 5p estão

principalmente associadas a atividade da regulação da transcrição gênica, *splicing* e remodelação da cromatina, e a maioria das vias biológicas encontradas estão relacionadas a transcrição, ligação de histonas e cromatina, complexo de spliceossomo e ribossomal e processamento de RNAs, sugerindo que as alterações em 5p podem causar um desequilíbrio em outras regiões cromossômicas capazes de afetar a modulação gênica e, assim, explicar as diferenças fenotípicas em pacientes com 5p-. Nossa análise poderá ser aplicada para outras síndromes com alteração no número de cópias, como um novo modelo de abordagem epigenética para ampliar o conhecimento sobre a complexidade da variabilidade clínica nesses pacientes.

Descritores: Doenças raras, Genética humana, Síndrome *Cri Du Chat*, Metilação do DNA, Epigenética.

ABSTRACT

Almeida, VT. *Investigation of the Genomic Status of Methylation in Cri Du Chat Syndrome using Arrays* [Dissertation]. Sao Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo; 2023.

Cri Du Chat syndrome, or 5p- syndrome (OMIM #123450), is characterized by a terminal or interstitial deletion on the short arm of chromosome 5 that causes variable clinical manifestations, including high-pitched crying in newborns, low birth weight, microcephaly, ocular hypertelorism, micrognathia, hypotonia, neurological and behavioral modifications, delayed growth, and global development. Different cytogenomic rearrangements, family history, and environmental factors may hinder the genotype-phenotype association. Thus, the phenotypic variability of this syndrome may not be limited only to variations in gene structure, such as deletions, duplications, inversions, insertions, and translocations. It is possible that other mechanisms related to the activation or inactivation of promoters and/or exons of actively transcribed genes, such as DNA methylation, which occurs mainly in "CpG islands," are involved. Therefore, we studied the genome-wide methylation status profile of 5p- patients to look for Differentially Methylated Regions. We evaluated peripheral blood samples from 22 patients with 5p- and 12 control samples previously genotyped by a genomic array (*HumanCyto850KBeadChip® - Illumina*). To delineate the genomic breakpoint and characterize the structural rearrangements, we performed the epigenomic array assay (*MethylationEPICBeadChip® - Illumina*) to identify differentially methylated regions. The genomic array results were analyzed using the BlueFuse™ Multi v4.5 (BlueGnome®) program, and the epigenomic array results were analyzed using the R language program v4.0.2. It was possible to identify that the methylation profiles of patients with Cri Du Chat Syndrome are different in between, even though some patients have practically the same deletion size. We found that Differentially Methylated Regions outside the 5p region are mainly associated with regulating gene transcription, splicing, and chromatin remodeling. Most biological pathways are related to transcription, histone and chromatin binding, spliceosome and ribosomal complex, and RNA

processing, suggesting that changes in 5p can cause an imbalance in other chromosomal regions capable of affecting gene modulation and thus explain the phenotypic differences in patients with 5p-. Our analysis may be applied to other syndromes with alteration in copy number as a new model of epigenetic approach to increase knowledge about the complexity of clinical variability in these patients.

Descriptors: Rare diseases, Human genetics, Cri Du Chat Syndrome, DNA methylation, Epigenetics.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre a Síndrome *Cri Du Chat*

A síndrome de *Cri Du Chat* (SCDC), também conhecida como síndrome 5p- é caracterizada pela deleção parcial (terminal e/ou intersticial) do braço curto do cromossomo 5 (Mainardi et al., 2006), sendo considerada uma síndrome rara, com incidência de 1/15000 a 1/50000 em nascidos vivos (Niebuhr, 1978).

Portadores desta síndrome genética podem apresentar características clínicas variadas como: baixo peso, microcefalia (perímetro cefálico reduzido), hipertelorismo ocular, hipotonia, micrognatia, orelhas de implantação baixa, ponte nasal proeminente, alterações neurológicas e comportamentais, atraso no crescimento e no desenvolvimento, entre outras (Mainardi et al., 2006). Os recém-nascidos portadores desta síndrome costumam apresentar um choro estridente, parecido ao miado de gato (Burns e Bottino, 1991). Em virtude disso, o médico francês Jérôme Jean Louis, em 1963, a nomeou como: *Cri Du chat* (Lejeune et al., 1963).

A etiologia do choro característico e deficiências da fala e desenvolvimento da linguagem podem estar associadas a alterações na laringe e alterações no sistema nervoso (Virbalas et al., 2012). Além disso, as crianças podem apresentar dificuldades de sucção e deglutição, bem como infecções das vias aéreas superiores, otite média e diarreia nos primeiros meses e anos de vida (Kim, 2018).

Em 80-90% dos portadores de SCDC são considerados eventos *de novo*, ou seja, a alteração genômica surgiu naquele indivíduo, e em 10-15% são casos herdados decorrentes de rearranjos cromossômicos presente nos pais, sendo a maioria de origem paterna, segundo os dados reportados na literatura (Niebuhr, 1978; Mainardi et al., 2001).

A correlação genótipo-fenótipo foi limitada pelo uso de técnicas de investigação disponíveis, como o bandamento G e a Hibridação *in situ* por Fluorescência (FISH), no entanto, com o avanço das metodologias moleculares

de análise do genoma essa associação foi sendo refinada com a técnica de *array* genômico.

Uma região crítica (entre 5p15.2 e 5p15.3) para a síndrome foi definida por Nguyen, que classificou cinco genes envolvidos nesta região como haploinsuficientes e relacionados ao fenótipo em pacientes com a SCDC. Estes genes são: *TERT*, *SEMA5A*, *MARCH6*, *CTNND2* e *NPR3* (Nguyen et al., 2015).

A importância desse segmento genômico para os sinais patognomônicos da SCDC permitiram o refinamento dos genes específicos que afetam individualmente diferentes componentes do fenótipo clássico.

Dessa forma, algumas regiões já foram identificadas como relacionadas ao fenótipo da SCDC, por exemplo, a região 5p15.2 para deficiência intelectual e dismorfismos faciais, a região 5p15.33 para o choro característico, e a região 5p15.32 ao atraso da linguagem (Figura 1) (Mainardi et al., 2006; Elmakky et al., 2014). No entanto, a elevada variabilidade clínica encontrada nesses pacientes representa um enorme desafio para a compreensão aprofundada dos mecanismos que levam a essas diferenças.

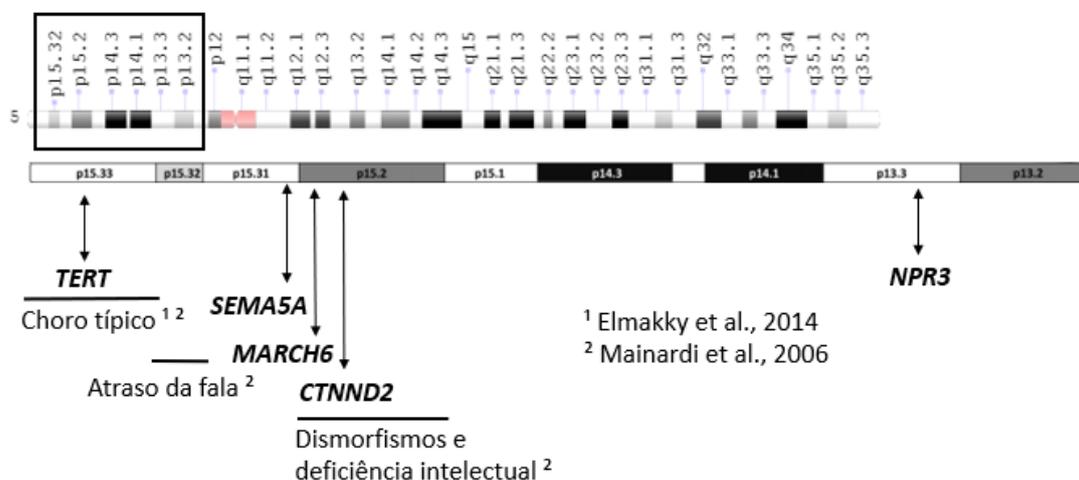


Figura 1 – Representação do cromossomo 5, com destaque da região do braço curto (p), juntamente com a posição dos 5 genes haploinsuficientes definidos por Nguyen et al., 2015, e correlações genótipo-fenótipo segundo estudos de Mainardi et al., 2006 e Elmakky et al., 2006. Figura adaptada de Chehimi et al., 2020.

1.2 Considerações sobre Epigenética

A epigenética consiste na alteração da expressão gênica sem modificar a sequência de nucleotídeos de DNA, ou seja, ocorre a ativação ou silenciamento de genes sem alterar a estrutura do DNA. Embasa-se na modificação da cromatina ligada às proteínas histonas. Esse mecanismo está associado a diversas doenças descritas (Archer et al., 2011).

As alterações epigenéticas são definidas como informações celulares hereditárias e que podem ser transmitidas através da divisão celular (Wu, Sarkissyan e Vadgama, 2015). Dentro das células, existem três sistemas principais que registram a epigenética: metilação do DNA, modificações de histonas e mecanismos baseados em RNA (Zhang, 2021).

A modificação epigenética é dinâmica e varia entre os tecidos em resposta a uma série de estímulos ambientais, abrangendo aqueles que direcionam a diferenciação tecidual durante o desenvolvimento, crescimento e os graves riscos que provocam uma resposta adaptativa das células (Estampador e Franks 2014).

1.2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais estudado e compreende a adição de um grupo metil (CH₃) ao carbono 5 do anel de pirimidina do nucleotídeo citosina. Esse mecanismo gera modificações na cromatina e pode ocorrer em diversos locais dentro de um gene, porém, a metilação é mais frequente nas “ilhas CpG” (citosina-guanina), região do genoma localizada em promotores e/ou éxons de genes ativamente transcritos, podendo assim, controlar a expressão gênica. A metilação pode ser diferente para cada CpG, sendo: sem metilação, com hemimetilação (metilação em apenas uma fita de DNA) e, com a metilação completa (em ambas as fitas de DNA) (Day e Sweatt, 2011).

Mesmo dentro de uma pequena extensão do genoma, os locais de CpG podem apresentar essas três possibilidades de metilação, o que pode levar a variabilidade genômica daquele local. Além disso, a metilação pode ocorrer em um sítio de ligação de fator de transcrição ou em um sítio de iniciação da transcrição (Day e Sweatt, 2011). Dessa forma, a compreensão de como a metilação do DNA naquele ponto do genoma contribui para a transcrição de um

determinado gene requer um exame detalhado acerca de mudanças de metilação do DNA ao nível de um único nucleotídeo (Weber et al., 2007).

A metilação do DNA também é importante na modulação de vários processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, diferenciação e proliferação celular. Sendo assim, a metilação pode resultar no silenciamento de genes supressores de tumor e/ou ativação oncogênica, levando à tumorigênese (Li, 2021).

Além da região promotora de um gene, a metilação também pode estar presente nas regiões *shelf* e *shore* (ao redor da ilha CpG). Com isso, se ocorrer hipometilação, esta pode causar instabilidade genômica, assim como, a hipermetilação pode causar uma repressão transcricional. Essas modificações podem alterar a transcrição gênica e podem ocasionar diversas doenças, como mostrado na figura 2.

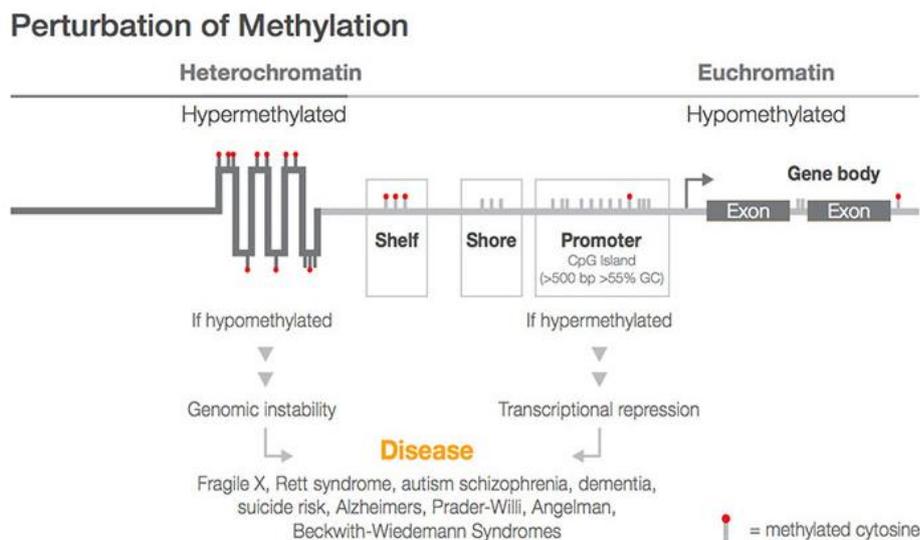


Figura 2 – Cobertura da metilação do genoma completo. A hipermetilação das ilhas CpG na região reguladora do gene, como o promotor, está normalmente associada a uma estrutura de cromatina compactada ou fechada, resultando no silenciamento transcricional do gene associado. Por outro lado, a hipometilação das ilhas CpG leva a uma estrutura de cromatina aberta, que geralmente está associada à ativação da transcrição de um gene previamente metilado (desmetilação), resultando em uma desregulação gênica. Figura disponível em: (emea.illumina.com/techniques/sequencing/methylation-sequencing.html).

À vista disso, as alterações genéticas da SCDC podem não estar limitadas apenas a alterações na estrutura dos genes. É possível que determinadas

alterações estejam relacionadas à ativação ou inativação de genes por mecanismos como a metilação do DNA.

A utilização da metodologia de *array* genômico, incluindo diferentes plataformas (oligo-*array*, SNP-*array*, Bead-*array*, Bac-*array* e CGH-*array*) permitiu mapear detalhadamente os rearranjos do DNA e caracterizar as variantes que circundam os pontos de quebra. Paralelamente o aperfeiçoamento dessas plataformas possibilitou o estudo das regiões metiladas (*array* epigenômico) impulsionando o entendimento de mecanismos moleculares associados aos fenótipos clínicos em diferentes doenças (Li, 2021).

A investigação do padrão de metilação genômica pode ser complicada devido à sua natureza hereditária e reversível, mas, ao mesmo tempo, pode contribuir substancialmente para esclarecer a complexidade dos mecanismos epigenéticos promotores e reguladores em diferentes doenças. Essa investigação, que ainda tem sido pouco explorada, é capaz de melhorar a compreensão da configuração do genoma humano.

1.2.2 Modificações das histonas

As modificações das histonas também regulam a expressão gênica. As histonas são proteínas básicas encontradas nos núcleos celulares dos eucariotos, que auxiliam na compactação do DNA nos nucleossomos, os blocos de ligação da cromatina. A cromatina deve ser remodelada, modificando a acessibilidade das ferramentas de transcrição do DNA para controlar o processo de transcrição gênica (Ornellas et al., 2017). Há cinco diferentes tipos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) e estas são distinguidas de acordo com a proporção de lisina (K) e arginina (R) presentes em suas estruturas (Biterge e Schneider, 2014).

As modificações pós-traducionais que influenciam a condensação da cromatina e, conseqüentemente, a acessibilidade do DNA abrangem a: acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação e sumoilação. Essas modificações pós-traducionais podem alterar a carga eletrônica e as estruturas das caudas N- e C- terminais das proteínas histonas, que se ligam ao DNA, para alterar o status da cromatina e a subsequente expressão gênica. As

modificações das histonas desempenham papéis importantes numa variedade de processos celulares (Figura 3) (Zhang et al., 2021).

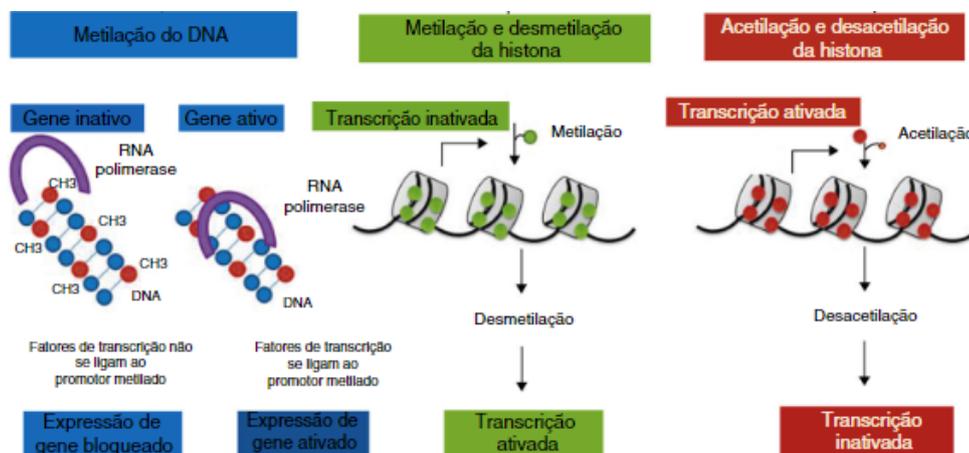


Figura 3 – A metilação do DNA em regiões promotoras específicas evita a transcrição gênica ao inativar um determinado gene. As modificações das histonas: a metilação das histonas envolve a adição de um grupo metil (CH₃) às caudas das histonas (dependendo do tipo da histona e do aminoácido) favorece a condensação da cromatina e conseqüentemente dificulta o acesso às proteínas reguladoras que promovem a transcrição. Já as histonas não metiladas (desmetilação) sem o grupo metil, garantem a cromatina descondensada e assegura a transcrição gênica. Além disso, a acetilação das histonas, que envolve a adição de um grupo acetil (COCH₃), abre a cromatina e permite o acoplamento da maquinaria transcricional e a desacetilação (remoção do grupo acetil) leva a uma estrutura de cromatina inativa e condensada (Figura adaptada de: Ornellas et al., 2017).

As proteínas de domínio de ligação metil-CpG (MBP) se ligam ao DNA metilado e potencialmente guiam ou direcionam complexos de proteínas com atividade de remodelação da cromatina e/ou modificação de histonas para locais específicos no genoma. Esses complexos de proteínas geralmente induzem mudanças repressivas na cromatina local, como catalisar marcas repressivas de histonas ou criar um ambiente repressivo geral da cromatina através da remodelação do nucleossomo e da organização da cromatina (Du et al., 2015).

Para analisar as modificações das histonas em loci's do genoma, comumente utiliza-se o método de imunoprecipitação da cromatina (ChIP). Esse ensaio baseia-se em anticorpos específicos que podem reconhecer determinados marcadores de modificação de histonas ou moduladores epigenéticos. À vista disso, a análise das interações dinâmicas entre a metilação do DNA e a modificação das histonas que levam a modificação da cromatina é

uma tarefa desafiadora e novos métodos estão sendo desenvolvidos para determinar as interações complexas entre esses diferentes estados epigenômicos (Li, 2021).

1.3 Possíveis fontes de variabilidade fenotípica

1.3.1 Pontos de quebra genômicos

Até o momento, as consequências fenotípicas da SCDC estão associadas principalmente as alterações estruturais que afetam os genes localizados no braço curto do cromossomo 5. A descrição precisa dos pontos de quebra estruturais pode ser complexa devido às diferentes resoluções de que as variantes são relatadas, a partir de coordenadas citogenéticas até as posições reais dos pares de bases. Além disso, múltiplos rearranjos em uma única área do genoma podem fazer a interpretação e seus efeitos desafiadores.

Esses rearranjos podem envolver perdas e ganhos genômicos, inversões, inserções e translocações. Novas funções gênicas podem ser geradas dependendo do tipo de junções que ocorrem nos pontos de quebra, como por exemplo, as fusões gênicas em diferentes regiões (Liu et al., 2012).

Vários fatores podem contribuir para uma maior suscetibilidade de determinadas regiões cromossômicas sofrerem quebras e rearranjos como: a presença de sequências em *tandem* nas porções terminais cromossômicas; os sítios frágeis do DNA; as regiões de repetições com baixo número de cópias (LCRs), que são pequenas sequências repetitivas, frequentemente encontradas em regiões centroméricas e teloméricas, possuindo de 1 a 4 kb de tamanho, sendo conhecidas como sequências *motif*, e os *hotspots* para quebras subteloiméricas (Guilherme et al., 2015; Luo et al., 2011).

Os rearranjos cromossômicos podem também envolver as regiões subteloiméricas que possuem alta densidade gênica ocasionando a perda ou quebra de alguns genes importantes para o equilíbrio do genoma (Mefford e Trask, 2002).

Em um estudo realizado por Chehimi et al., 2022, foram investigados 29 pacientes com síndrome 5p-, utilizando a técnica de *microarray*, a fim de correlacionar o tamanho da deleção com os sinais clínicos dos pacientes

(associação genótipo-fenótipo). Os resultados mostraram 23 deleções terminais puras, uma deleção intersticial, uma deleção seguida por uma duplicação de 3 Mb em 5p, três casos de deleção de 5p concomitante a duplicações maiores que 20 Mb nos cromossomos 2, 9 e 18, e uma deleção 5p com uma deleção do cromossomo Y.

Foram descobertos rearranjos entre o cromossomo 5 e outros cromossomos autossomos e sexuais. Para esses casos foi possível desvendar alguns fenótipos sobrepostos, mas para os casos de deleções em 5p puras ainda não foi possível correlacionar o tamanho da deleção com as características fenotípicas variável e/ou gravidade do fenótipo (Chehimi et al., 2022).

Além disso, no estudo de (Almeida et al., 2022) foram descritos dois irmãos com SCDC, com fenótipo destinto, e com o mesmo tamanho de deleção herdada da mãe. Foi destacada a importância de investigar outras modificações acima da arquitetura genômica do cromossomo 5, como, por exemplo, o estudo da metilação do DNA, que também pode oferecer respostas para a investigação do fenótipo dos pacientes com 5p- e para avaliar a consequência das alterações estruturais do cromossomo 5.

1.3.2 Expressividade variável e efeito de posição

Rearranjos genômicos envolvendo deleções e duplicações podem causar um fenótipo por vários mecanismos moleculares. O rearranjo em um cromossomo pode afetar ou é afetado pelo alelo no outro cromossomo naquele *locus*. Estes incluem polimorfismos funcionais do alelo remanescente quando ocorre uma deleção e efeitos de transvecção (comunicação entre alelos em cromossomos homólogos) (Lupski e Stankiewicz, 2005).

Além disso, as deleções e duplicações podem provocar diversos tipos de desarranjos genômicos como alterações na dosagem gênica, interrupção de genes haploinsuficientes, fusão de genes que podem provocar novas sequências codificantes, efeito de posição em regiões que impactam na regulação da expressão gênica, que podem estar próximas ao ponto de quebra, expressão de alelos recessivos, entre outros (Lupski e Stankiewicz, 2005).

A proporção de indivíduos que possuem um determinado genótipo e apresentam os sintomas clínicos esperados é definida como a penetrância

completa, em contrapartida abaixo disso, há penetrância reduzida ou incompleta. Os genótipos também podem apresentar expressividade variável, onde a gravidade do fenótipo causado pelo genótipo pode variar entre os indivíduos afetados. Isso difere da pleiotropia, onde diferentes variantes no mesmo gene podem causar diferentes fenótipos potencialmente não relacionados que podem até ser classificados como doenças diferentes (Kingdom e Wright, 2022).

Embora penetrância, expressividade e pleiotropia sejam três conceitos bem definidos, a realidade biológica significa que seus efeitos gerais muitas vezes se sobrepõem, especialmente em coortes populacionais onde é difícil identificar a causa da diversidade fenotípica. Múltiplos fenótipos distintos, em conjunto, podem ser classificados como um único fenótipo mais grave ou diferentes subtipos de doença (Gruber e Bogunovic, 2020).

1.3.3 Modificadores genéticos

Os modificadores genéticos, definidos como variantes genéticas, podem modificar o resultado fenotípico da alteração causadora de doença primária. Eles podem suprimir ou exacerbar a gravidade da condição da doença. Variantes modificadoras podem alterar o fenótipo de um gene alvo por ter uma interação genética, bioquímica ou funcional com um ou mais genes ou produto gênico. O grau do efeito dos modificadores pode variar, o que pode resultar em grande variabilidade fenotípica e mudanças na penetrância (Rahit e Tarailo-Graovac, 2020).

Os modificadores genéticos permanecem muitas vezes não identificados em doenças genéticas raras, onde reunir pacientes suficientes para alcançar significância estatística é um desafio. A acessibilidade de tecnologias de alto rendimento, cooperação internacional, algoritmos de computação aprimorados e opções terapêuticas emergentes abriram novas possibilidades para investigar o papel dos modificadores genéticos em doenças raras, a fim de melhorar o entendimento da sua interação a nível molecular (Mroczek e Sanchez, 2020).

As variantes do genoma humano: substituições de um único nucleotídeo (SNP/SNV), inserções/deleções curtas (InDels) e variantes estruturais/variação do número de cópias (SV/CNV) podem impactar o fenótipo a partir da sua localização genômica, se em regiões funcionais e/ou regulatórias e ainda devido

a sua frequência na população. Portanto, é importante se atentar ao tipo de variante estudada e se esta pode ter alguma sobreposição significativa que irá contribuir em novas descobertas fenotípicas para o paciente.

1.3.4 Metilação do DNA em síndromes raras

Nosso conhecimento de *imprinting* genômico em humanos foi formado por uma série de doenças pediátricas do desenvolvimento, que apresentam fenótipos sobrepostos e etiologia diversa, e que sofrem modificações na dosagem de genes imprintados. Mutações ou epimutações em regiões de controle de *imprinting* (ICR), ou ganho de determinado segmento cromossômico de um único genitor, a dissomia uniparental (UPD), resultam em genes imprintados podendo ser super expressos ou não expressos paternalmente ou materno (Cassidy e Charalambous, 2018).

Algumas síndromes de imprinting genômico conhecidas são: síndrome de Prader-Willi e Angelman, síndrome de Beckwith-Wiedemann e Silver-Russell e síndrome de Kagami-Ogata e Temple. O diagnóstico de cada síndrome é realizado por meio da análise da metilação do alelo paterno e materno, ou seja, verifica-se a perda ou ganho de metilação em genes unicamente expressos por determinado alelo.

A literatura mostra que em paralelo com as doenças que possuem mecanismos diretamente associados com a metilação do DNA, há também outras síndromes genéticas raras sendo investigadas para as regiões diferencialmente metiladas (DMRs), a fim de correlacionar os achados com as características da doença. Porém, até o momento, esses estudos ainda não estabeleceram associações diretas entre a metilação do DNA e o fenótipo específico do paciente, mas sim, de maneira geral, comparando grupos casos *versus* grupos controles (Kimura et al., 2020; Rooney, et al., 2021).

A síndrome de Williams (SW) é uma doença genética rara, causada por uma microdeleção na região 7q11.23. Nessa região, há diversos genes relacionados à regulação epigenética. No estudo realizado por Kimura et al., 2020, foi encontrada uma DMR relevante no gene *ANKRD30B*, a sua função biológica ainda não é clara, porém, um estudo recente mostrou que esse gene é hipermetilado e regulado negativamente no cérebro de pacientes com doença

de Alzheimer, e esse achado fornece uma visão epigenética sobre alguns pacientes com SW que exibem declínio cognitivo precoce, como a demência senil.

Em um estudo de (Rooney et al., 2021) foi investigada a metilação do DNA na síndrome da deleção 22q11.2. O objetivo principal deste estudo foi investigar se existe uma assinatura epigenética específica em todo o genoma em pacientes com a deleção típica de 22q11.2, por meio de um modelo classificador de bioinformática que gera pontuações de 0 a 1 em relação a patogenicidade, ou seja, com base no perfil de metilação dos pacientes com 22q-. Além disso, nos últimos anos, (Sadikovic et al., 2021) fizeram evidências de assinaturas epigenéticas em diversas síndromes raras, demonstrando que estas exibem biomarcadores de metilação de DNA altamente sensíveis e específicos.

Dessarte, escolhemos investigar, a partir de uma abordagem inédita, um perfil epigenômico clinicamente relevante na síndrome *Cri Du Chat*, focando na metilação do DNA, principalmente nas ilhas CpGs, por meio do método de *array* epigenômico, a fim de correlacionar os achados à expressividade fenotípica muito variável, ainda não completamente compreendida para essa doença, evidenciando as características individuais dos pacientes. Além disso, os achados podem auxiliar a abrir um novo caminho para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

- Construir o perfil de metilação do DNA de pacientes com a deleção 5p.

2.2. Objetivos secundários

- Mapear o *status* da metilação na região do ponto de quebra utilizando o ensaio *Infinium MethylationEPIC BeadChip* da Illumina®;
- Investigar os elementos genômicos afetados pela metilação;
- Relacionar as regiões mapeadas com o fenótipo clínico.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo retrospectivo e prospectivo, cuja casuística foi composta por 22 amostras de DNA de sangue periférico de pacientes com a síndrome de *Cri Du Chat* acompanhados no Ambulatório de Genética do Instituto da Criança e do Adolescente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HCFMUSP) e 12 amostras controles previamente genotipadas e classificadas como normais de acordo com seu perfil genômico. A descrição das amostras encontra-se na Tabela 1.

Foram incluídas no estudo amostras de pacientes com deleção em 5p pura e foram excluídas deste estudo amostras de pacientes com outras deleções/duplicações patogênicas concomitantes. Essas alterações foram avaliadas previamente com o *array* genômico. Para os controles, os critérios de seleção foram relacionados aos dados demográficos de sexo e idade, além da ausência de CNVs relevantes clinicamente.

Os dados clínicos foram coletados por meio de análise de prontuário e por meio de um *checklist* (Anexo A) desenvolvido em conjunto com a equipe da Unidade de Genética do ICr contendo informações clínicas relevantes (Anexo A). Além disso, os pacientes foram fotografados para a documentação dos distúrbios. Os pacientes selecionados compareceram aos encontros anuais promovidos pelo Núcleo *Cri Du Chat* (São Caetano do Sul – SP) para coleta de dados clínicos realizada entre os anos de 2017 e 2019.

Os pacientes ou pais e/ou responsáveis foram informados da realização da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição – CAAE: 24390719.1.0000.0068, e um documento autorizando o uso de fotografias.

Tabela 1 – Descrição das amostras estudadas

Identificação das amostras estudadas	Sexo	Idade
1	F	22 anos
2	F	13 anos
3	F	2 anos
4	F	8 anos

5	M	18 anos
6	F	13 anos
7	M	38 anos
8	F	4 anos
9	F	9 anos
10	F	13 anos
11	F	15 anos
12	F	10 anos
13	M	20 anos
14	F	3 anos
15	F	18 anos
16	M	10 anos
17	F	15 anos
18	F	9 anos
19	M	10 anos
20	M	9 anos
21	M	8 anos
22	F	22 anos
Ctrl 1	M	10 anos
Ctrl 2	F	3 anos
Ctrl 3	F	3 anos
Ctrl 4	F	4 anos
Ctrl 5	F	10 anos
Ctrl 6	F	10 anos
Ctrl 7	M	7 anos
Ctrl 8	M	7 anos
Ctrl 9	M	11 anos
Ctrl 10	F	6 anos
Ctrl 11	M	6 anos
Ctrl 12	M	10 anos

Legenda: Ctrl- Controle; F- Feminino; M- Masculino

3.2 Técnica de *Array* epigenômico para o estudo da metilação

Para esse projeto foram utilizadas amostras de DNA de sangue periférico já extraídas pelo *kit QIAamp DNA Blood (Qiagen®)* e armazenadas em freezer à -80°C.

A integridade das amostras e identificação de possíveis impurezas foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando reagentes e equipamentos do fabricante (*Kasvi®*).

A quantificação das amostras também foi realizada por meio do fluorímetro *Qubit (Invitrogen®)*, a fim de garantir maior precisão e acurácia na concentração final de 50 ng/μl.

Para estudar o perfil de metilação, realizamos a técnica de *array* epigenômico da plataforma do fabricante (*Illumina®*) utilizando o kit *HumanMethylationEPIC BeadChip 850K*. Essa plataforma foi escolhida uma vez que interroga em torno de 853.307 sítios de metilação por amostra, distribuídos em regiões intensificadoras, promotoras e intergênicas. Nesse experimento, há dois ensaios químicos diferentes que reportam a informação sobre o *status* de metilação, conforme mostrado na figura 4.

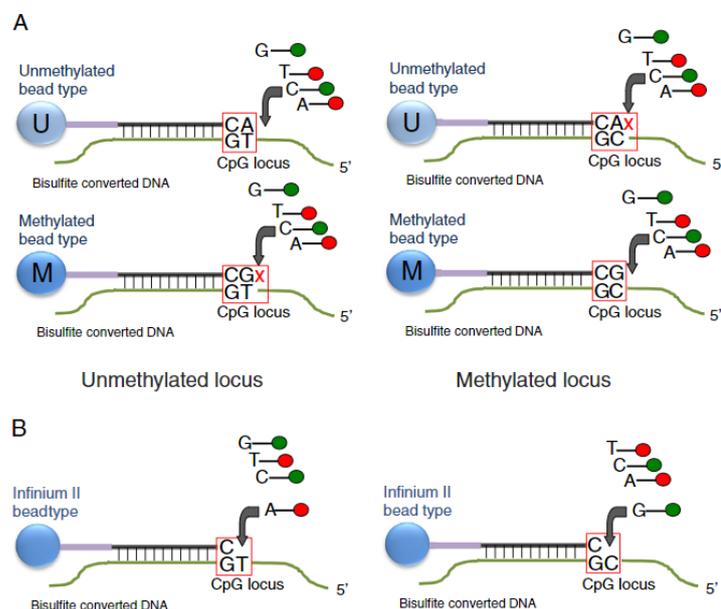


Figura 4 - A: o ensaio *Infinium I* contém duas sondas que interrogam o *locus* CpG, uma sonda específica para CpG metilado e outra para CpG não metilado, há a incorporação do mesmo nucleotídeo marcado por fluorescência. **B:** o ensaio *Infinium II*, contendo apenas uma sonda por *locus* CpG, é responsável por complementar a base anterior do sítio de interesse (C pareado com G), (T pareado com A), a extensão resulta na adição de uma guanina (G) marcada complementar a citosina (C) (estado metilado, sinal da cor verde) ou adenina (A) marcada complementar a timina (T) (estado não metilado, sinal da cor vermelha), a intensidade da marcação e permite calcular a quantidade de sondas metiladas e não metiladas. (Figura: Babivoka *et al.*, 2011).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Citogenômica (LIM 03) do (HC-FMUSP), e os ensaios foram realizados seguindo o protocolo do fabricante.

As amostras foram inicialmente tratadas com bissulfito, utilizando o *kit EZ DNA Methylation (Zymo Research®)*, esse tratamento foi usado para desaminar citosinas não metiladas convertendo-as em uracila. As citosinas metiladas não se alteram (Figura 5).

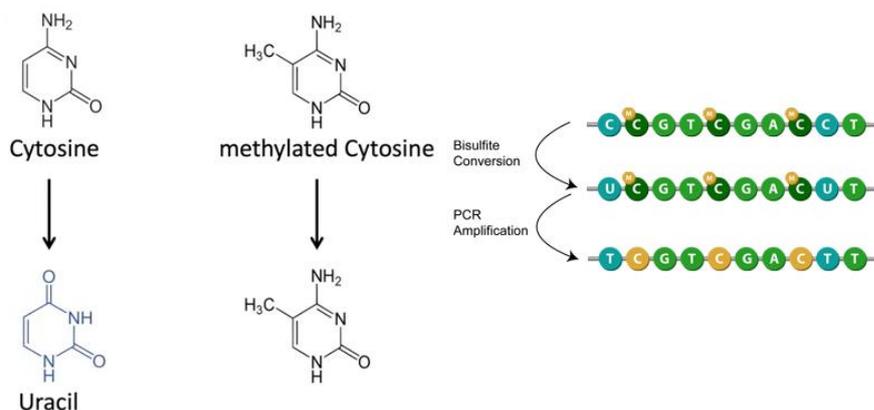


Figura 5 – A desaminação da citosina consiste na remoção de um grupo amino (NH₂), que resulta em uracila. As citosinas metiladas possuem a adição de um grupo metil (CH₃), sendo assim, permanecem sem alterações. Após a amplificação por PCR para a síntese da nova fita convertida (5' 3') as uracilas são reconhecidas como timinas, uma vez que, U para com A na fita complementar (3' 5'). (Figura adaptada de: epigentek.com)

Assim, as amostras convertidas foram transferidas para uma placa específica, onde o DNA foi denaturado quimicamente, seguido pela neutralização por reagentes fornecidos no *kit*. A etapa seguinte foi a de amplificação genômica isotérmica, na qual as amostras foram incubadas a 37°C por um período de 20-24 horas.

Depois do período de incubação, ocorreu a etapa do pós-PCR, que compreende na fragmentação do DNA por meio da ação de uma enzima disponível no *kit*, e precipitação e ressuspensão do DNA por reagentes específicos para, então, seguir com a aplicação das amostras no *BeadChip*, onde estas foram distribuídas mesclando casos e controles. O *BeadChip* foi incubado a 48°C por cerca de 16 horas, onde ocorreu a hibridação do DNA fragmento às sondas complementares do *Beadchip*.

Posteriormente, o *Beadchip* foi lavado, para a remoção de DNA não hibridado, e preparado para as etapas de extensão de uma única base e

coloração, por meio da adição de nucleotídeos marcados com fluorocromos específicos.

Por fim, a leitura da fluorescência incorporada às sondas nas regiões nas quais houve hibridação do DNA, foi feita pelo *scanner iScan®* (Illumina®). Por meio dessa leitura de fluorescência e algoritmos específicos, regiões contendo regiões metiladas foram reconhecidas pelo *software* para posterior análise.

3.3 Análise dos dados

3.3.1 Análise das amostras genotipadas por estudo anterior (*array* genômico)

O ensaio de *array* genômico foi realizado anteriormente utilizando o *kit Infinium CytoSNP-850K BeadChip* (Illumina®), sendo capaz de verificar cerca de 850.000 sondas de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) distribuídas ao longo de todo o genoma, englobando genes de relevância clínica para pesquisa em alterações constitucionais e em cânceres. Os dados brutos (arquivos *.idats*), foram convertidos em arquivos (*.GTCs*) pelo *software Beeline v1.0.37* (Illumina®) e, então, foram analisados por meio do *software BlueFuse™ Multi v4.5* (*BlueGnome®*).

Neste *software*, os sinais de fluorescência emitidos pela hibridação das sondas foram identificados e normalizados para cálculos de algoritmos, com o propósito de determinar variações no número de cópias (CNVs) e a detecção de regiões de homozigosidade (ROHs). A determinação de uma CNV baseia-se na necessidade de, no mínimo, dez sondas consecutivas alteradas (~18 kb), e para a determinação da ROH, a necessidade de, ao menos, 500 sondas consecutivas alteradas (~3 Mb).

Para a correlação genótipo-fenótipo após a obtenção das CNVs, fizemos a classificação de acordo com a sua associação à causa e suscetibilidade de doenças em cinco principais grupos: benignas; provavelmente benignas; provavelmente patogênicas; patogênicas; e variantes de significado incerto (VOUS), segundo os critérios preconizados pelo Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (ACMG) (Riggs et al., 2020). Foram utilizados alguns bancos de dados disponíveis *online* que estão descritos na tabela 2. As CNVs foram

interpretadas em conjunto com as características clínicas dos pacientes e as informações disponíveis nos bancos de dados. As posições genômicas das alterações foram obtidas de acordo com o genoma de referência GRCh37/hg19.

Tabela 2 - Principais bancos de dados e portais disponíveis *online* para classificação das CNVs

Banco de dados e Portais	Descrição	Referência/Site
<i>UCSC Genome Browser</i>	Ferramenta pública de visualização gráfica do genoma e das informações nele contidas. Serve como um microscópio que permite aos pesquisadores visualizar todos os 23 cromossomos do genoma humano em qualquer escala, desde um cromossomo completo até um único nucleotídeo.	genome.ucsc.edu/index.html
<i>DGV (Database of Genomic Variants)</i>	Catálogo com curadoria de variações estruturais genômicas e humanas encontradas no genoma de indivíduos controles em diversas populações.	dgv.tcag.ca/dgv/app/home
<i>DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources)</i>	Plataforma utilizada pela comunidade clínica para compartilhar e comparar dados fenotípicos e genotípicos de pacientes com fenótipo bem estabelecido e afetados por doenças genéticas raras.	deciphergenomics.org/
<i>ClinGen (The Clinical Genome Resource)</i>	Ferramenta de investigação de genes e variantes de relevância clínica para uso na medicina de precisão e pesquisa.	clinicalgenome.org/
<i>NCBI (National Center for Biotechnology Information)</i>	Fonte americana de informações biomédicas e genômicas. Promove a divulgação científica e coordena diversos bancos de dados e <i>softwares</i> para a comunidade médica e científica.	ncbi.nlm.nih.gov/

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	Catálogo público que contém um complicado de informações confiáveis de genes humanos e doenças genéticas, sendo atualizado diariamente.	omim.org/about
Pubmed	Site para busca de referências mundiais. Possui mais de 34 milhões de citações de literatura, periódicos de ciências e livros <i>online</i> .	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/

3.3.2 Análise do experimento de metilação (*array* epigenômico)

A análise foi realizada por meio de linguagem de programação R (*Rstudio* v4.0.2) seguindo *pipeline* proposto por (Maksimovic et al., 2016), com modificações. Esse artigo fornece exemplos das etapas envolvidas na análise de dados de *array* de metilação usando pacotes do repositório *Bioconductor* (tabela 3) (Huber et al., 2015).

A sequência das etapas realizadas na análise dos dados de *array* de metilação por meio da linguagem de programação R foram: preparação das amostras; controle de qualidade dos dados; normalização; filtragem; análise de metilação diferencial; análise funcional; mapeamento da metilação nos pontos de quebra dos pacientes com 5p-, e determinação da idade biológica (DNAmAge).

Tabela 3 - Principais pacotes utilizados para as etapas realizadas

Pacote	Função	Referência
<i>Minfi</i>	Utilizado no pré-processamento de dados, avaliações de controle de qualidade, normalização e filtragem.	Aryee et al., 2014
<i>Limma</i>	Utilizado na análise de metilação diferencial para detecção de DMPs.	Ritchie et al., 2015
<i>DMRcate</i>	Utilizado para identificar DMRs.	Peters et al., 2015
<i>IlluminaHumanMethylationEPICmanifest</i>		Hansen et al., 2016

	Contém arquivos de anotação da localização de cada sonda contemplada no <i>array</i> de metilação EPIC da <i>Illumina</i> .	
<i>IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b2.hg19</i>	Contém arquivos de anotação de sondas de acordo com o genoma de referência GRCh37/hg19.	Hansen et al., 2016
<i>MinfiData</i>	Contém ferramentas para analisar e visualizar <i>arrays</i> de metilação <i>Illumina</i> .	Hansen et al., 2018
<i>Methylumi</i>	Contém uma estrutura para ler os dados brutos de arquivos <i>IDAT</i> e vários objetos especializados para armazenar e manipular os dados ao longo de uma análise.	Davis et al., 2015
<i>Gviz</i>	Fornecer ampla funcionalidade para personalizar gráficos de regiões genômicas.	Hahne e Ivanek, 2016
<i>MissMethyl</i>	Utilizado para realizar análise de enriquecimento de vias funcionais (KEEG) e ontologia gênica (GO).	Phipson et al., 2016
<i>Methylclock</i>	Utilizado para determinação da idade biológica por meio de marcadores de metilação do DNA (DNAmAge).	Pelegí-Sisó, et al., 2021

Para a preparação das amostras, realizamos a internalização dos dados brutos *.idats*, a identificação desses dados e separação por grupos caso/controles com base numa *samplesheet* previamente preparada. Para o controle de qualidade dos dados, realizamos a avaliação da média de detecção dos valores de *P*, representativos da intensidade do sinal fluorescente de cada sonda. Dessa forma, amostras que apresentarem média superior a 0,05 podem apresentar vieses, sendo então excluídas da análise. A etapa de normalização visa minimizar a variação indesejada intra e inter amostras, utilizando-se o método *preprocessQuantile* (adequado para conjuntos de dados de um único tecido). Após a normalização, as informações da intensidade de sondas metiladas e não metiladas foram convertidas em valores de *M* e β (beta), juntamente com as coordenadas genômicas associadas.

Foram feitas algumas filtragens para remoção de sondas de baixo desempenho (com base no valor de *P*); sondas dos cromossomos X e Y; sondas

de SNPs no mesmo sítio CpG e sondas com reação cruzada que demonstraram mapear para vários sítios do genoma. A lista de sondas com reação cruzada foi publicada por Chen et al., 2013.

Depois dessas etapas seguimos, então, para a análise de metilação diferencial entre os pacientes com SCDC com base nas características fenotípicas e, também, comparando grupo casos/controles. Utilizamos os valores de M para os cálculos estatísticos, com o teste T de *Student*, por exemplo, e subsequente mensuração do *status* da metilação e identificação de potenciais sondas e regiões diferencialmente metiladas (DMRs e DMPs). O valor de β foi utilizado para representação gráfica final dos dados obtidos.

Para a análise funcional de ontologias genéticas (enriquecimento das vias biológicas) utilizamos o banco de dados com informações genômicas e funcionais: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), e o consórcio: *Gene Ontology* - GO (<http://www.geneontology.org/>), que fornece informações para descrever processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC). Essas análises funcionais foram baseadas nas listas completas de DMPs obtidas nas análises de metilação diferencial, a fim de compreender os processos biológicos que essas DMPs podem estar envolvidas. Foram definidas como enriquecidas todas as vias funcionais com um valor de P ajustado menor a 0,05.

Por fim, a determinação da idade biológica por meio de marcadores de metilação do DNA (DNAmAge), foi feita utilizando o método de Horvath (2013), que relatou um estimador de idade multi-tecido, referido como relógio epigenético, que usa padrões de metilação do DNA de locais específicos de 353 CpGs. Essa avaliação da metilação é baseada em genes previamente estudados ligados à senescência.

Assim, foram gerados arquivos em excel contendo informações das DMRs, DMPs, e ontologias com base na análise de metilação diferencial e funcional. Foram gerados arquivos de visualização gráfica das etapas realizadas, como a de normalização, gráficos de análise de coordenada principal (*PCoA*) para observar semelhanças e diferenças entre as amostras, gráficos de mapa de calor (*Heatmap*) para mapeamento do *status* de metilação, e gráficos de dispersão (*Scatter plot*) para distribuição de idades cronológicas/biológicas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Neste estudo, avaliamos o perfil de metilação de 22 pacientes com SCDC e 12 amostras controles, por meio do *array* epigenômico. Todas as amostras obtidas, casos e controles, também foram avaliadas por *array* genômico, previamente.

4.1 Resultados do array genômico (*HumanCyto-850K BeadChip*)

Entre as 22 amostras, identificamos pelo ensaio com o *HumanCyto-850K* as deleções terminais na região 5p em 21 pacientes (Figura 6) e uma deleção intersticial em 5p em 1 paciente. Todos apresentaram CNVs concomitantes à deleção 5p em outros cromossomos, porém, todas foram classificadas como benignas ou provavelmente benignas. As coordenadas genômicas das alterações em 5p estão listadas na tabela 4 e a correlação genótipo-fenótipo pode ser vista na Figura 7.

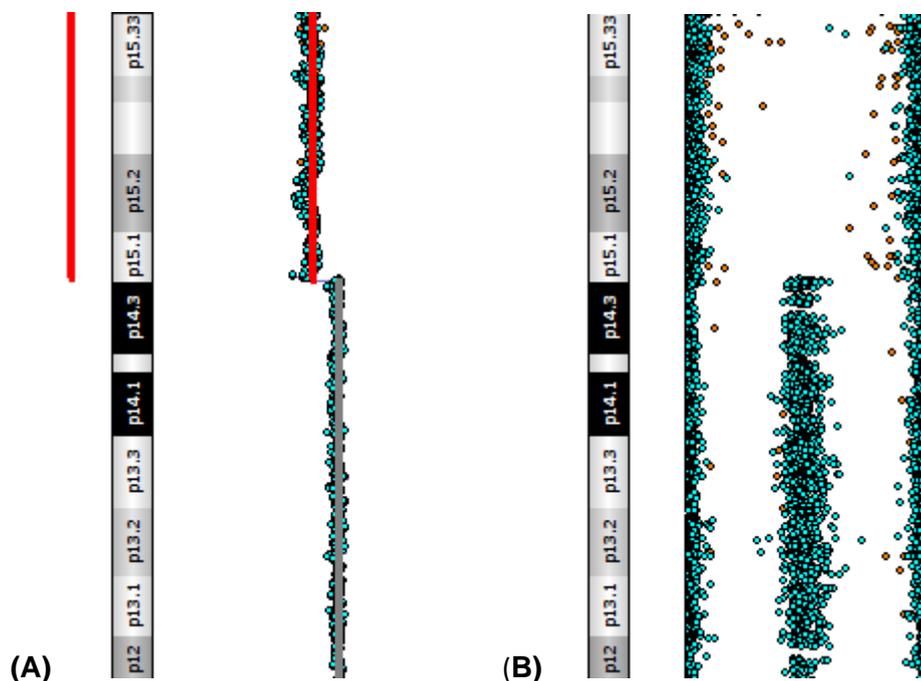


Figura 6 – Imagem do cromossomo 5 da amostra da Paciente 1, onde é possível observar a deleção terminal no braço curto. Todos os outros pacientes com deleção terminal apresentam imagem similar. (A) Resultado do desvio de sondas obtido pelo *array*. (B) Resultado do perfil alélico.

Tabela 4 – Resultados obtidos por meio do array de genotipagem para a deleção em 5p, mostrando os pontos de quebra para cada paciente.

Paciente	Resultado após o array de genotipagem	Tamanho da deleção
1	arr[GRCh37]5p15.33p15.1(25,328_18,022,107)x1	17.996 Mb
2	arr[GRCh37]5p15.32p14.3(4,788,892_22,219,836)x1	17.430 Mb
3	arr[GRCh37]5p15.33p15.1(25,328_18,099,766)x1	18.074 Mb
4	arr[GRCh37]5p15.33p14.1(25,328_25,027,618)x1	25.002 Mb
5	arr[GRCh37]5p15.33p14.3(25,328_23,212,267)x1	23.186 Mb
6	arr[GRCh37]5p15.33p14.3(25,328_22,039,679)x1	22.014 Mb
7	arr[GRCh37]5p15.33p13.3(25,328_29,863,566)x1	29.838 Mb
8	arr[GRCh37]5p15.33p15.1(25,328_18,168,945)x1	18,143 Mb
9	arr[GRCh37]5p15.33p15.1(25,328_17,656,351)x1	17,631 Mb
10	arr[GRCh37]5p15.33p14.1(25,328_26,551,516)x1	26,526 Mb
11	arr[GRCh37]5p15.33p13.2(25,328_34,402,152)x1	34,376 Mb
12	arr[GRCh37]5p15.33p14.1(25,328_25,658,882)x1	25,633 Mb
13	arr[GRCh37]5p15.33p14.3(38,139_22,670,144)x1	22,632 Mb
14	arr[GRCh37]5p15.33p13.3(38,139_31,075,755)x1	31,037 Mb
15	arr[GRCh37]5p15.33p15.1(38,139_18,300,739)x1	18,262 Mb
16	arr[GRCh37]5p15.33p15.32(25,328_6,189,781)x1	6,164 Mb
17	arr[GRCh37]5p15.33p15.32(25,328_6,197,044)x1	6,171 Mb
18	arr[GRCh37]5p15.33-p14.3(25,328_23,243,400)x1	23,218 Mb
19	arr[GRCh37]5p15.33p14.3(25,328_18,895,407)x1	18,870 Mb
20	arr[GRCh37]5p15.33p14.3(25,328_19,087,783)x1	19,062 Mb
21	arr[GRCh37]5p15.33p14.1(25,328_25,351,609)x1	25,326 Mb
22	arr[GRCh37]5p15.33p13.3(25,328_29,305,055)x1	29,279 Mb

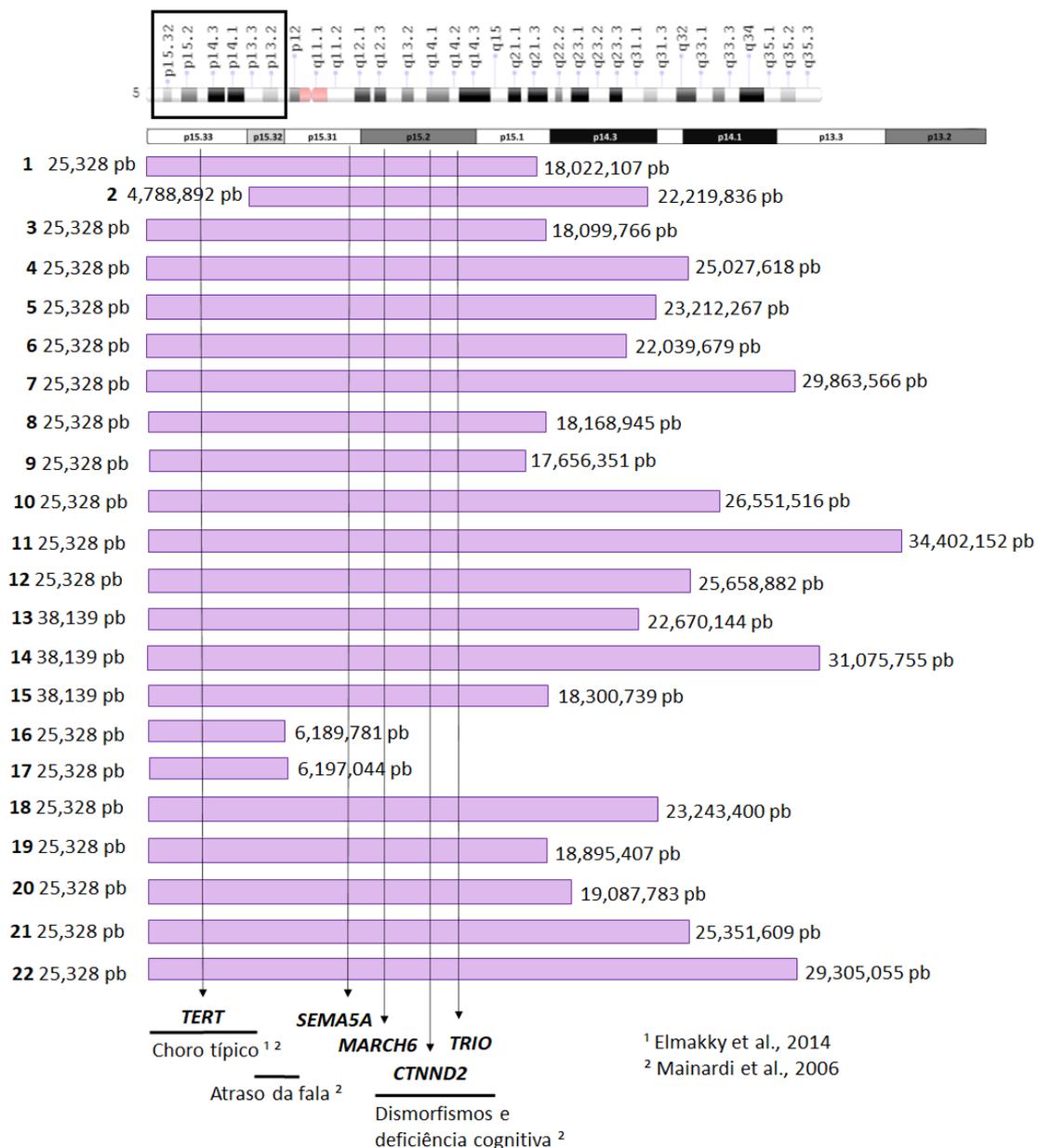


Figura 7 - Representação esquemática da extensão das deleções detectadas (barras lilás, com start e end) e os diferentes pontos de quebra alinhados com a posição genômica de genes selecionados e correlação entre genótipo-fenótipo de dois estudos.

4.2 Resultados obtidos pelo array epigenômico (*HumanMethylationEPIC*)

Utilizamos neste estudo duas plataformas de *array* epigenômico, o *HumanMethylationEPIC - 850K* e *450K*, devido a uma questão de disponibilidade de *beadchips*. A diferença entre essas duas plataformas está principalmente na cobertura genômica, em que uma abrange 850.000 sítios CpG e a outra abrange

450.000 sítios CpG. Dessa forma, realizamos dois tipos de análises abrangendo os dois tipos de coberturas genômicas.

Para uma melhor compreensão dos resultados das análises com diferentes plataformas, estes serão apresentados separadamente nos subtópicos a seguir.

4.2.1 Análise 1: metilação diferencial global entre SCDC versus Controles - *HumanMethylationEPIC 850K*

Ao compararmos os dados obtidos do *array* epigenômico do grupo SCDC (n=15) com o grupo Controle (n=9), considerando o critério de seleção $P < 0,05$, obtivemos uma lista de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) significantes que estão dispostas em ordem de relevância (mais significativas para menos significativas em relação a diferença da metilação), conforme podemos visualizar na Tabela 5.

Tabela 5 – Lista detalhada das *Top 30* regiões diferencialmente metiladas (DMRs)

Cromossomo/região	Start	End	Nº CpGs	Genes
5p15.33	2751041	2757976	47	<i>C5orf38, IRX2</i>
5p15.2	14871469	14873039	14	<i>CTB-40H15.4, ANKH</i>
5p15.1	17216222	17219239	24	<i>BASP1, AC091878.1</i>
5p15.33	611696	612961	13	<i>CEP72, RP11-310P5.1</i>
5p15.31	7849599	7852480	20	<i>MTRR, C5orf49</i>
5p15.2	10352807	10355326	14	<i>MARCH6, CTD-2256P15.2, CTD-2256P15.1, CCT5, FAM173B</i>
5p15.2	10249523	10251252	17	<i>FAM173B</i>
5p15.32	5420363	5423457	18	<i>KIAA0947</i>
8p12	30890108	30892276	31	<i>WRN, PURG</i>
5p15.31	7868703	7870689	21	<i>MTRR, FASTKD3</i>
5p15.1	16935695	16937379	16	<i>MYO10</i>
5q35.3	8	7	17	<i>TRIM41, MIR4638</i>
5p15.31	6632973	6634308	14	<i>SRD5A1, NSUN2</i>
5p15.33	1799486	1801904	21	<i>NDUFS6, MRPL36, RP11-260E18.1, CTC-461F20.1, FAM134B</i>
5p15.1	16616011	16618061	16	<i>RP11-321E2.3</i>
5p15.1	17403754	17404208	6	<i>RP11-321E2.3</i>
5p15.33	1522816	1524940	11	<i>LPCAT1</i>
5p15.33	1509086	1511422	12	<i>LPCAT1</i>
5p15.33	1882188	1884513	17	<i>CTD-2194D22.3, IRX4</i>
5p15.33	271553	271700	7	<i>CTD-2083E4.6</i>

5p15.2	10563358	10565263	12	<i>ANKRD33B</i>
5p15.33	891843	893665	20	<i>TRIP13, BRD9</i>
6q13	74063522	74064865	10	<i>DPPA5</i>
16q22.2	72041805	72042985	13	<i>DHODH</i>
2p13.3	70120550	70122167	14	<i>SNRNP27</i>
7p15.2	27182637	27185512	42	<i>HOXA-AS3, HOXA3, RP1-170019.22, HOXA5, HOXA6</i>
14q32.33	10588553	10588715	12	<i>TEX22, MTA1, RP11-521B24.3</i>
22q12.3	1	8	10	<i>TXN2</i>
	36877551	36878839	10	
	12245950	12246047		
12q24.31	9	3	6	<i>BCL7A</i>
19q13.12	15559494	15561037	14	<i>MIR1470, WIZ</i>

No gráfico 1, podemos visualizar as médias dos valores de *P*. O eixo x representa os pacientes com SCDC (n=15, cor verde) e os controles (n=9, cor lilás). O eixo y representa as médias dos valores de *P* para cada amostra que ficaram abaixo de 0,05, indicando assim, que todas as amostras apresentam um padrão de qualidade dos dados satisfatório.

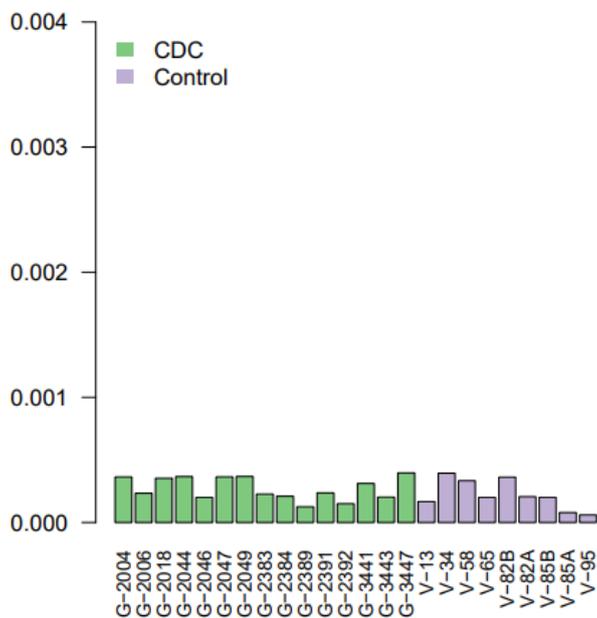


Gráfico 1 – Gráfico de barras apresentando as médias dos valores de *P*.

No gráfico 2, visualizamos a distribuição dos valores β para cada amostra antes e depois da normalização dos dados. SCDC (verde) e controles (laranja). O eixo x representa os valores de β e o eixo y representa a densidade das sondas.

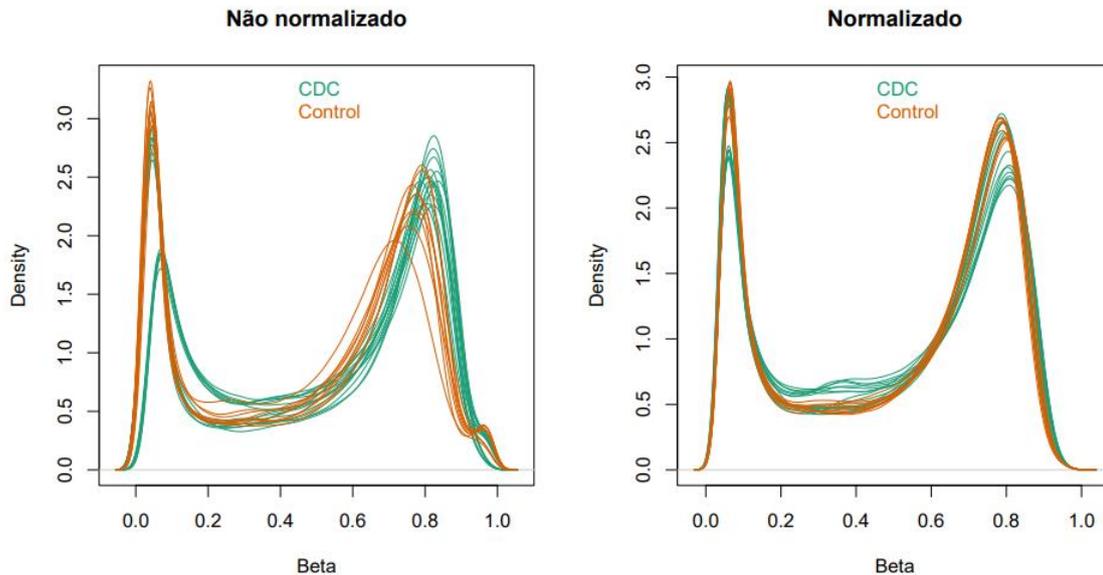


Gráfico 2 – Gráficos de densidade mostrando a distribuição dos valores β

O gráfico 3 corresponde a análise de coordenada principal, que mostra a diferença significativa no estado geral da metilação entre os grupos casos (verde) e controles (azul). Esse gráfico serve para observar as semelhanças e diferenças entre as várias amostras. As amostras que são mais semelhantes entre si devem agrupar-se e as amostras muito diferentes devem estar mais afastadas no gráfico.

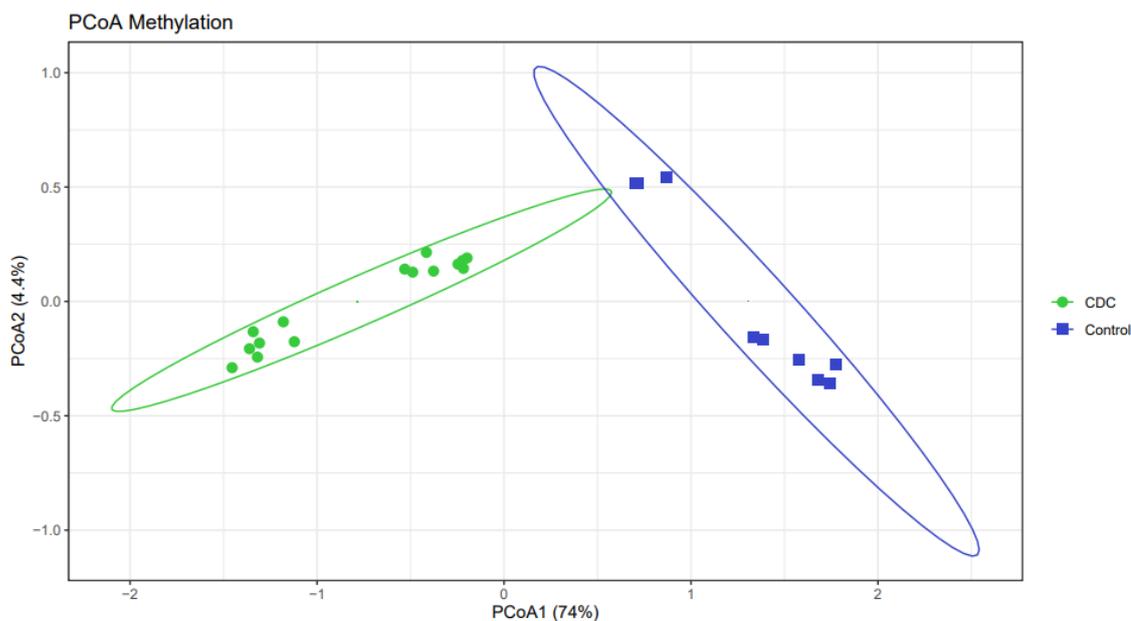


Gráfico 3 – Gráfico global de PCoA (Análise de Coordenada Principal). O PCoA 1, captura a maior fonte de variação nos dados, e o PCoA 2, captura a segunda maior fonte de variação nos dados.

Com base na tabela 5 descrita anteriormente, com as top 30 DMRs, verificamos que a maioria das DMRs está localizada no cromossomo 5p, o que já era esperado devido a síndrome 5p-. Porém, 10 DMRs estão localizadas em outras regiões significativas e estas estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 – Descrição das 10 DMRs significativas fora da região 5p

Cromossomo/região	Gene	Descrição
8p12	<i>WRN</i>	Papel na manutenção da estabilidade do genoma e no reparo do DNA, replicação, transcrição e manutenção dos telômeros.
	<i>PURG</i>	Importante no controle da replicação e transcrição do DNA.
5q35.3	<i>MIR4638</i>	Envolvido na regulação pós-transcricional da expressão gênica.
6q13	<i>DPPA5</i>	Envolvido na manutenção da pluripotência de células-tronco embrionárias.
16q22.2	<i>DHODH</i>	Proteína mitocondrial localizada na superfície externa da membrana mitocondrial interna.

		Desempenha papéis importantes no splicing de RNA pré-mensageiro, facilitando o reconhecimento e a seleção de locais de splicing.
2p13.3	<i>SNRNP27</i>	
7p15.2	<i>HOXA3/5/6</i>	Codifica fatores de transcrição de ligação ao DNA que podem regular a expressão gênica.
14q32.33	<i>MTA1</i>	Envolvido na regulação da transcrição devido a remodelação da cromatina.
22q12.3	<i>TXN2</i>	Importante na regulação do potencial de membrana mitocondrial e na proteção contra a apoptose induzida por oxidantes.
12q24.31	<i>BCL7A</i>	Complexo de Remodelação de Cromatina.
19q13.12	<i>WIZ</i>	Desempenha atividade do fator de transcrição de ligação ao DNA e atividade de ligação ao co-repressor da transcrição.

Fonte da descrição: GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

Também realizamos análises funcionais de enriquecimento das vias biológicas (ontologias) com base na lista completa das sondas diferencialmente metiladas (DMPs) obtidas na comparação entre os grupos, considerando o critério de seleção $P < 0,05$. Utilizamos informações do banco de dados KEGG e do consórcio *Gene Ontology* (GO). Na tabela 7 visualizamos as principais vias biológicas envolvidas nas DMPs.

Tabela 7 – Descrição das principais vias biológicas com base nas DMPs

Via	Banco de dados	Nº DMPs
Spliceossomo	KEEGG	59
Atividade reguladora de tradução	GO - MF	53
Ligação do fator de transcrição	GO - MF	147
Atividade co-repressora e co-reguladora de transcrição	GO - MF	182
Ligação de RNA	GO - MF	590

Ligação do complexo ribonucleoproteico	GO - MF	58
Ligação RNA pré-mensageiro	GO - MF	21
Ligação de ácido nucleico	GO - MF	1281
Ligação de histona desacetilase	GO - MF	51
Ligação de cromatina	GO - MF	213
Complexo spliceossomal	GO - CC	76
Complexo de ribonucleoproteína	GO - CC	253
Complexo de DNA proteico	GO - CC	70
Núcleo	GO - CC	2352
Nucleoplasma	GO - CC	1432
Complexo contendo proteína nuclear	GO - CC	419
Cromossomo nuclear	GO - CC	84
Cromossomo condensado	GO - CC	94
Cromossomo	GO - CC	602
Manutenção de telômeros via corte de telômeros	GO - BP	12
Processo metabólico de RNA ribossômico	GO - BP	91
Splicing de RNA	GO - BP	162
Processamento de RNA	GO - BP	179
Processamento de RNA não codificante	GO - BP	140
Processamento de RNA mensageiro	GO - BP	179
Processo metabólico do RNA mensageiro e não codificante	GO - BP	251
Organização cromossômica	GO - BP	307
Biogênese de componentes celulares	GO - BP	1029

Legenda: MF (Função Molecular); CC (Componente Celular); BP (Processo Biológico).

Verificamos que as DMRs fora da região 5p estão principalmente associadas à atividade da regulação da transcrição gênica, *splicing* e remodelação da cromatina (Tabela 6). Além disso, grande parte das vias biológicas encontradas, estão relacionadas a transcrição, ligação de histonas e cromatina, complexo de spliceossomo e ribossomal e processamento de RNAs (Tabela 7). Isso sugere que a deleção em 5p pode causar um desequilíbrio em outras regiões, além do cromossomo 5p, e que essa diferença de metilação em pacientes 5p x controles seria capaz de modular o fenótipo e, assim, explicar as diferenças fenotípicas em pacientes com essa síndrome. Dessa forma, prosseguimos analisando as associações fenótipo-genótipo com base nas características fenotípicas de cada paciente no subtópico a seguir.

4.2.1.2 Análise da metilação diferencial fenotípica entre pacientes com SCDC

Os pacientes com a SCDC apresentam diversas características fenotípicas. Na Tabela 8 estão listadas todas as características encontradas nos 22 pacientes aqui descritos.

Tabela 8 – Características fenotípicas dos pacientes com 5p-

Características	Pacientes																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Choro miado/fraco	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Choro miado/forte		+														+						
Assimetria facial	+			+			+			+			+				+	+		+	+	
Rosto arredondado			+								+		+				+			+	+	+
Rosto afinado	+						+	+	+	+		+	+	+	+							+
Hipertelorismo ocular	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+			+		+	+	+
Dobras epicânticas	+	+	+	+				+	+	+			+		+	+		+		+	+	+
Ponte nasal proeminente	+					+	+		+	+	+	+	+			+	+					
Microcefalia			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+
Filtro Curto	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+			+	+	+
Palato alto	+	+		+		+	+	+	+				+			+	+	+				+
Fissuras palpebrais	+	+				+			+			+									+	
Fissura labial	+	+	+	+	+	+							+									
Boca curva para baixo										+	+	+									+	
Microretrognatia	+		+		+	+	+		+	+	+							+		+		+
Orelhas antivertidas			+				+							+	+	+					+	+
Orelhas displásicas	+									+	+		+			+						
Estreitamento bitemporal	+			+							+	+					+			+	+	+
Hipotonia				+				+				+	+									+
Estrabismo	+			+		+	+	+			+		+			+		+			+	
Cranioestenose		+																				
Pescoço curto			+								+											
Pé torto		+									+										+	
Columela proeminente										+	+										+	
Escoliose		+				+				+	+		+			+				+	+	
Malformação cerebral			+		+				+	+												+
Polidactilia			+																			
Clinodactilia			+	+	+	+	+		+				+		+	+	+			+	+	
Sindactilia							+										+					
Braquidactilia										+												
Sandal gap							+	+				+					+					
Autoagressão	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+						+		+	+	
Heteroagressão	+	+		+		+		+	+	+						+		+	+	+	+	

Traços autísticos	+	+				+	+	+				+	+				+			+	+	+			
Irritabilidade		+			+		+		+	+		+	+	+	+	+					+	+			
TOC (Transtorno Obsessivo-Compulsivo)	+				+		+	+		+	+	+	+		+						+	+	+	+	+
ADNPM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Convulsões															+									+	+
Hiperatividade	+	+			+	+				+		+	+				+					+	+	+	+
Hiperpigmentação										+			+												
Refluxo gastroesofágico	+	+								+	+			+	+								+	+	
Hipertricose				+																					
Voz anasalada	+													+								+			
Miopia									+	+													+		

Legenda: + presença da característica.

Com base na tabela 8, identificamos que alguns pacientes apresentam características únicas quando comparados com outros pacientes. Por exemplo, a paciente 2 é a única com craniostenose, o paciente 12 é o único sem ADNPM. Com base nisso, criamos uma tabela com as principais diferenças fenotípicas encontradas entre os pacientes.

Tabela 9 – Diferenças das características fenotípicas entre os pacientes com 5p-

Paciente	Característica
2	Possui choro de miado "forte" e craniostenose
13	Possui convulsão e suspeita de Prader-Willi
3	Possui hipertricose
12	Não possui ADNPM
8 e 11	Possuem manchas hiperpigmentadas

Além da tabela 9, também criamos uma outra tabela de comparações de características com grupos maiores (acima de 3 pacientes), porém, estes não retornaram DMRs, sendo assim, foram excluídos da comparação. As características que não retornaram DMRs foram: hipertelorismo ocular, hipotonia, microcefalia, malformação cerebral, escoliose, heteroagressão, traços autísticos, microretrognatia, clinodactilia e hiperatividade.

Para as diferenças fenotípicas citadas na tabela 9, analisamos as DMRs a partir da comparação entre os pacientes com determinado fenótipo x pacientes sem o fenótipo, a fim de identificarmos uma relação epigenótipo-fenótipo. Esses achados estão discutidos na seção 5.

4.2.1.3 Análise do mapeamento da metilação nos pontos de quebra 5p-

A análise individual dos pontos de quebra que foram definidos pelo *array* genômico, com margem de flaqueamento de 1 Mb para cada paciente, retornou DMPs do cromossomo 5p que seguem a sequência das coordenadas genômicas da região crítica deletada (5p-). Dessa forma, para cada paciente é possível verificar a diferença no *status* da metilação pelo *heatmap*.

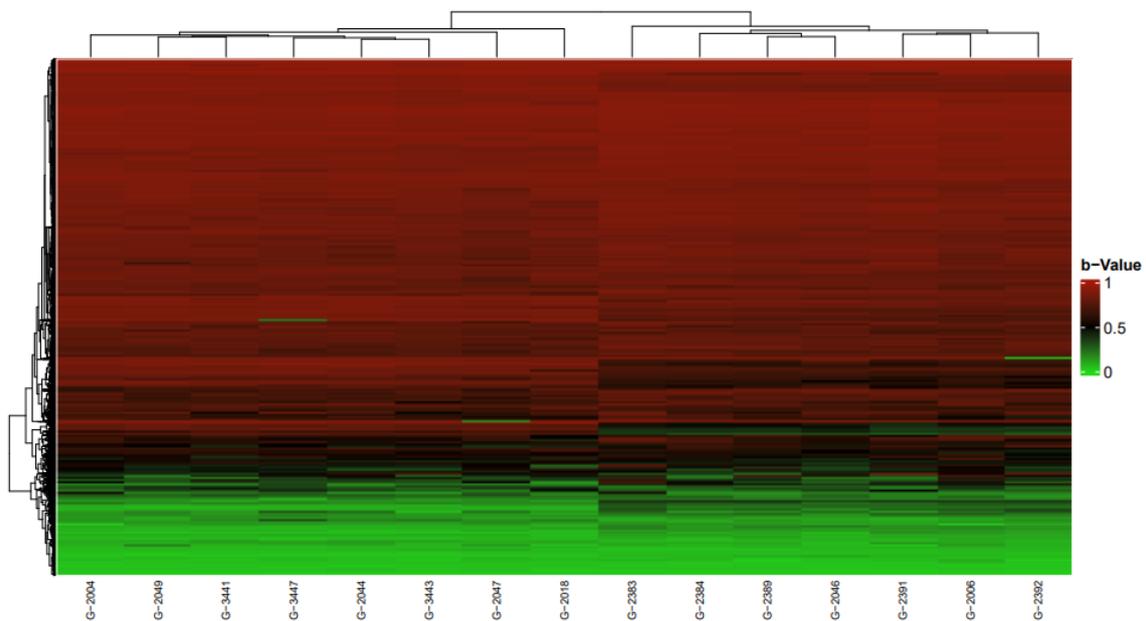


Figura 8 – Heatmap do ponto de quebra dos 15 pacientes (HumanMethylationEPIC850K), mostrando o mapa de coordenadas genômicas da região crítica (5p-). As sondas representadas por cada linha seguem a sequência da coordenada genômica. O valor de (β) foi utilizado para representação gráfica. Sondas com valores de beta $(\beta) \leq 0,3$ são representativos de hipometilação (cor verde), valores entre 0,31 e 0,7 são representativos de hemimetilação (cor preta) e valores $\geq 0,71$ são representativos de hipermetilação (cor vermelha).

A figura 8 mostra o *status* da metilação do alelo remanescente (cópia restante da deleção 5p). Uma vez que, o desenho do experimento de metilação *EPIC* (Pidsley et al., 2016), possui uma sonda para o alelo metilado e uma sonda para o alelo não metilado. Dessa forma, quando se tem apenas um alelo (uma cópia), este alelo é visto como homocigoto nos resultados. Por mais que exista uma deleção na região, será levado em consideração o *status* da metilação da cópia restante. À vista disso, pode existir uma grande heterogeneidade no *status* da metilação dentro da região deletada, com pequenos segmentos

hipometilados, seguidos de outros com hemimetilação e outros com hipermetilação, assim como em regiões com número de cópias dentro da normalidade (duas cópias).

4.2.1.4 Análise da idade biológica (DNAmAge)

Ao realizarmos a análise da idade biológica dos pacientes *versus* controles, observamos uma associação ligeiramente significativa da aceleração da idade biológica nos pacientes com síndrome *Cri Du Chat* em relação aos controles, conforme observado no gráfico 4 e Tabela 10.

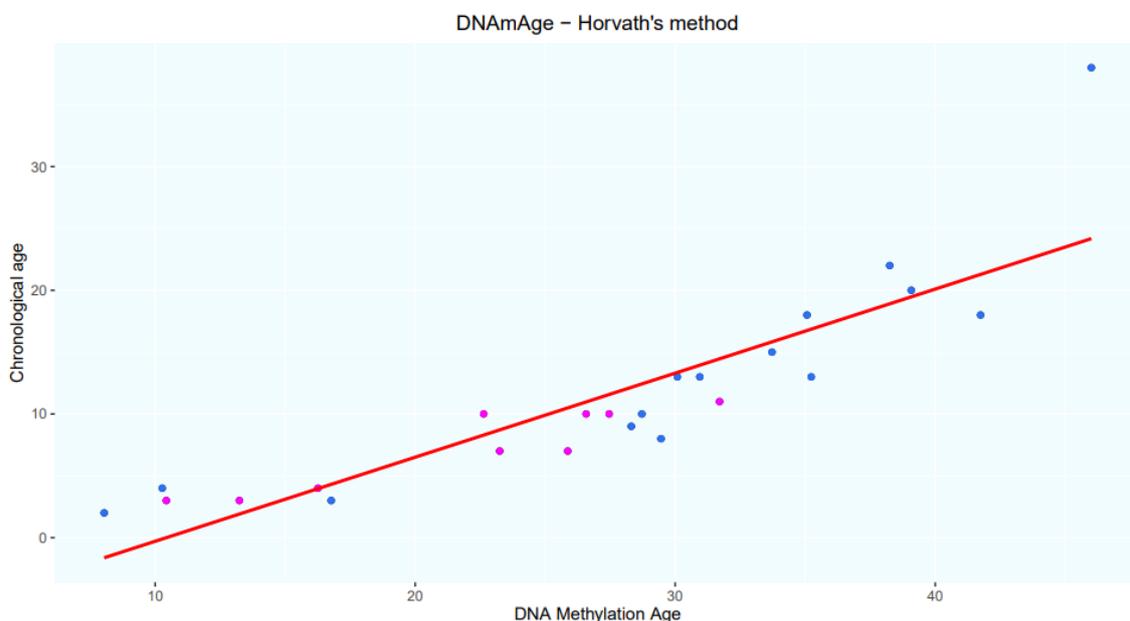


Gráfico 4 - Gráfico de dispersão com distribuição de idades cronológicas (eixo y) e estimativa de idade biológica por meio de marcadores de metilação do DNA (DNAmAge), utilizando o método de Horvath – 2013 (eixo x). Amostras caso (azul) e amostras controle (rosa).

Tabela 10 - Estimativa de DNAmAge com base em marcadores de metilação

Pacientes/controles	Idade Cronológica	Idade Biológica (DNAmAge)	ageAcc	ageAcc2	ageAcc3
1	22	38,250	16,250	-0,862	-2,328
2	13	30,084	17,084	1,112	-1,675
3	2	8,038	6,038	-8,538	-1,701
4	8	29,455	21,455	6,117	4,367
5	18	35,071	17,071	0,465	-0,316
6	13	35,233	22,233	6,261	6,439
7	38	46,004	8,004	-11,136	-6,806

8	4	10,273	6,273	-8,557	-0,873
9	9	28,311	19,311	3,846	-1,026
10	13	30,945	17,945	1,973	0,212
11	15	33,723	18,723	2,497	1,788
12	10	28,719	18,719	3,127	3,611
13	20	39,078	19,078	2,219	1,894
14	3	16,769	13,769	-0,935	-2,048
15	18	41,745	23,745	7,139	9,320
ctrl 1	10	26,575	16,575	0,983	1,606
ctrl 2	3	10,427	7,427	-7,276	-3,623
ctrl 3	3	13,24	10,24	-4,464	-8,357
ctrl 4	4	16,261	12,261	-2,569	0,196
ctrl 5	10	27,461	17,461	1,869	-0,492
ctrl 6	10	22,635	12,635	-2,956	-4,397
ctrl 7	7	25,867	18,867	3,656	2,001
ctrl 8	7	23,249	16,249	1,038	0,175
ctrl 9	11	31,706	20,706	4,987	2,029

Legenda: ageAcc - diferença entre DNAmAge e idade cronológica; ageAcc2 - resíduos obtidos após regressão da idade cronológica e DNAmAge; ageAcc3 - resíduos obtidos após regressão da idade cronológica e DNAmAge ajustado para contagem de células sanguíneas.

4.2.2 Análise 2: metilação diferencial global entre SCDC *versus* Controles - *HumanMethylation 450K*

Para obter uma estimativa precisa das variâncias do grupo estudado, é necessária uma amostragem maior, com pelo menos dez amostras para cada grupo (Phipson & Oshlack, 2014). Dessa forma, a análise comparativa do grupo SCDC (n=7) com o grupo Controle (n=3) utilizando o *array* epigenômico de 450K, não retornou DMPs e DMRs significativas. À vista disso, seguimos apenas com a análise diferencial das características fenotípicas entre os pacientes e controles.

Os pacientes 16 e 17 são irmãos e possuem exatamente o mesmo tamanho de deleção em 5p herdada da mãe. O fenótipo entre os dois é distinto, mas ambos possuem deficiência intelectual leve. As principais características fenotípicas dos irmãos estão listadas na tabela 11.

No estudo de Almeida et al., 2022, há uma discussão sobre o gene *CTNND2*, que está associado ao desenvolvimento/função neuronal, e que não está deletado nesses pacientes. Sendo assim, verificamos o *status* da metilação

na região desse gene, a fim de verificar como está a metilação nos irmãos e nos outros pacientes com deleção desse gene.

Analisando a figura 09, podemos verificar que os irmãos, pacientes 16 e 17 (destacados em vermelho), se agruparam por similaridade com os controles (destacados em azul). O paciente 19 (destacado em laranja) também está agrupado com os irmãos e controles, porém, devemos levar em consideração que ele e os outros 4 pacientes que estão no começo da figura, à esquerda, deletaram a região desse gene e o *status* da metilação fornecido é referente ao alelo remanescente (cópia restante 5p).

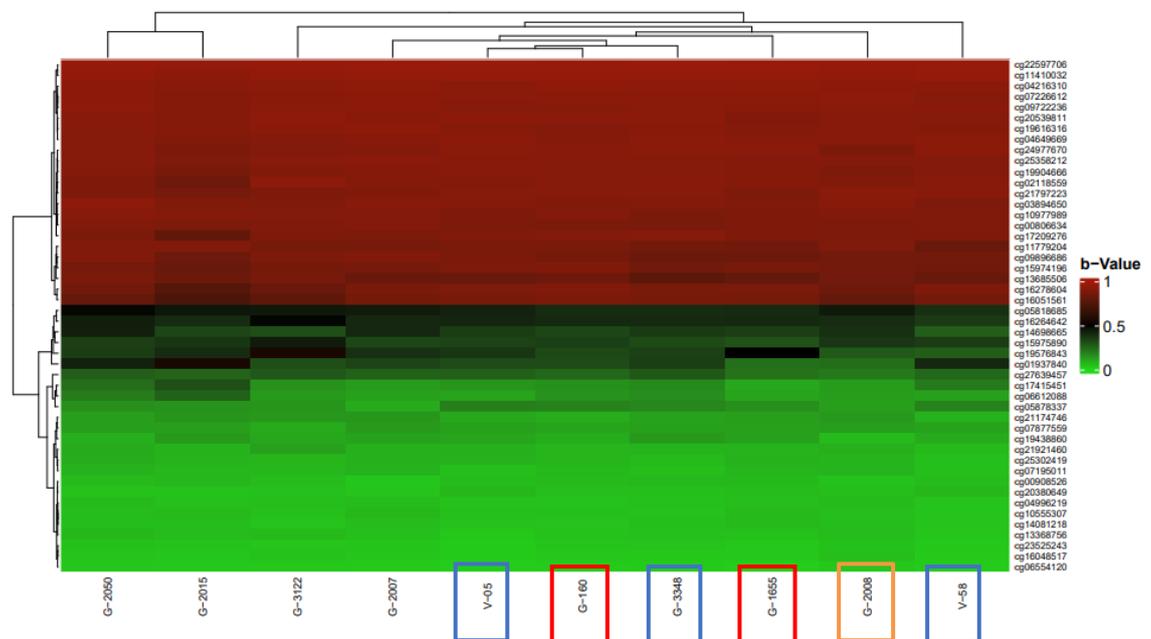


Figura 09 – Heatmap dos 7 pacientes e 3 controles (HumanMethylation450K), os irmãos 16 e 17 estão destacados em vermelho e os controles em azul. As sondas representadas por cada linha seguem a sequência da região do gene CTNND2. O valor de (β) foi utilizado para representação gráfica. Sondas com valores de beta (β) $\leq 0,3$ são representativos de hipometilação (cor verde), valores entre 0,31 e 0,7 são representativos de hemimetilação (cor preta) e valores $\geq 0,71$ são representativos de hipermetilação (cor vermelha).

Tabela 11 - Características fenotípicas dos irmãos com o mesmo tamanho de deleção 5p

Fenótipo	Irmãos	
	16 (menino, 11 anos)	17 (menina, 13 anos)
Choro miado/fraco		+
Choro miado/forte	+	
Assimetria facial		+
Rosto arredondado		+
Dobras epicânticas	+	
Ponte nasal proeminente	+	+
Filtro Curto		+
Palato alto	+	+
Orelhas displásicas	+	
Estreitamento bitemporal		+
Estrabismo	+	
Escoliose	+	
Clinodactilia	+	+
Sindactilia		+
Sandal gap		+
Heteroagressão	+	
Traços autísticos	+	
Irritabilidade	+	
ADNPM	+	+

Legenda: + presença da característica.

De acordo com a figura 10, podemos notar uma diferença no *status* da metilação do alelo remanescente no ponto de quebra da região 5p- nos irmãos. Analisando as regiões diferencialmente metiladas de ambos, no paciente 16 a principal DMR encontrada foi no cromossomo 7, gene *EFCAB10*, importante para a atividade de ligação do íon cálcio. Já na paciente 17 a principal DMR encontrada também foi no cromossomo 7, porém no gene *HOXA3* (importante para a transcrição gênica).

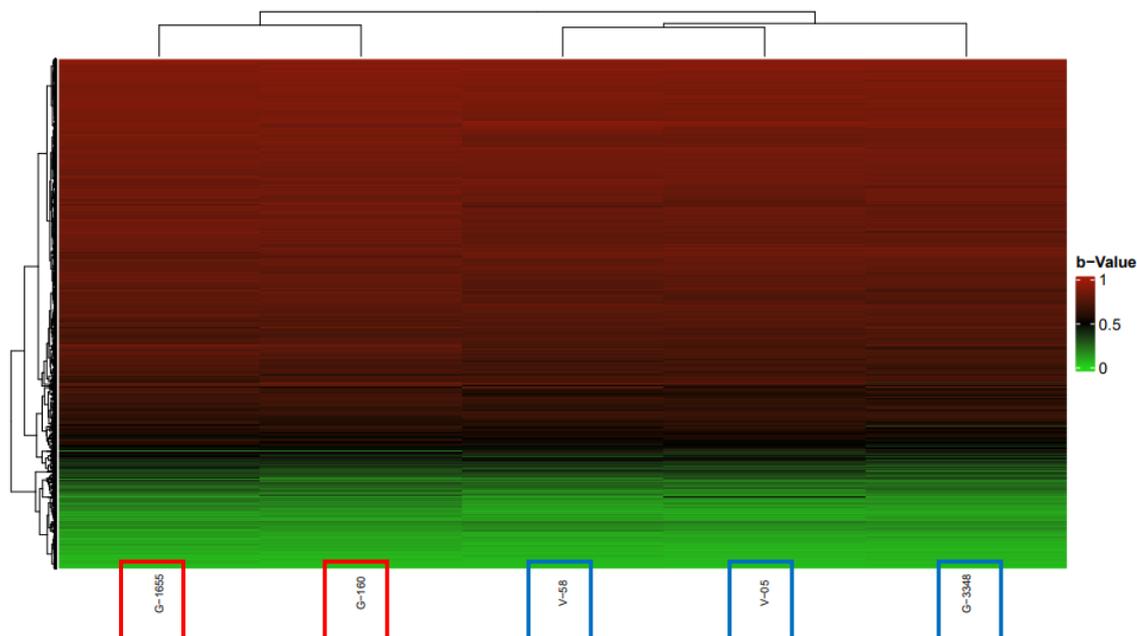


Figura 10 – Heatmap do ponto de quebra dos 2 irmãos (destaque vermelho) e 3 controles (destaque azul) (HumanMethylation450K). As sondas representadas por cada linha seguem a sequência da coordenada genômica da região crítica deletada pelos irmãos (5p-). O valor de (β) foi utilizado para representação gráfica. Sondas com valores de beta (β) $\leq 0,3$ são representativos de hipometilação (cor verde), valores entre 0,31 e 0,7 são representativos de hemimetilação (cor preta) e valores $\geq 0,71$ são representativos de hipermetilação (cor vermelha).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O cromossomo 5 é um dos maiores cromossomos humanos, porém possui uma das menores densidades gênicas, devido a regiões pobres em genes codificantes (Schmutz et al., 2004). Segundo Miele e Dekker, 2008 a expressão gênica é controlada por elementos reguladores que podem estar distantes e distribuídos ao longo do cromossomo ou, em alguns casos, em outros cromossomos. Dessa forma, escolhemos não nos limitar a investigar apenas a região do ponto de quebra em 5p, mas, de forma geral, abrangendo todas as informações significativas independentes da sua localização.

5.1 Deleção 5p *versus* regiões teloméricas

Uma questão importante a relatar é em relação aos telômeros, que são complexos proteína/RNA/DNA especializados em desempenhar papéis críticos na replicação e proteção das extremidades dos cromossomos lineares. A perda de um telômero devido à uma quebra cromossômica próxima à região telomérica, como ocorre nos pacientes com deleção terminal em 5p, por exemplo, se não for devidamente reparada, pode resultar na instabilidade genômica, senescência celular e/ou morte celular por apoptose (Ballif et al., 2004).

À vista disso, há duas formas de estabilização bem descritas, a primeira é uma cicatrização realizada pela enzima telomerase, que adiciona sequências teloméricas repetitivas no final do cromossomo quebrado, a fim de ocorrer a síntese de novos telômeros. A segunda é conhecida como “captura dos telômeros” por meio do qual um cromossomo deletado terminalmente adquire uma nova sequência telomérica de outro local cromossômico, que podem ocorrer entre cromátides irmãs, cromossomos homólogos e não homólogos, e pode resultar em cromossomos derivados (Varley et al., 2000; Ballif et al., 2004).

Os subteloômeros são as regiões de transição entre as repetições teloméricas terminais e as regiões cromossômicas específicas. O tamanho dessas regiões é estimado entre 10-500 kb, sendo que os últimos 2 kb são ricos em CpG e são metilados *de novo* durante o desenvolvimento embrionário inicial pela DNA metiltransferase. A relevância biológica da metilação do DNA

subtelomérico é destacado pela presença de promotores TERRA (RNA contendo repetição telomérica) e a sua transcrição é fortemente afetada pelo *status* da metilação nessas regiões ricas em CpG (Toubiana e Selig, 2020).

Assim, a sequência subtelomérica pode afetar o comprimento dos telômeros devido a metilação do DNA. Como a regulação do comprimento dos telômeros está fortemente ligada ao envelhecimento natural, resolvemos estudar biomarcadores baseados em DNA que mudam com a idade. São os relógios epigenéticos, que usam níveis específicos de metilação de CpG para estimar a idade biológica (DNAmAge). Neste trabalho encontramos uma associação ligeiramente significativa da aceleração da idade biológica nos pacientes com síndrome *Cri Du Chat* em relação aos controles. Porém, a realização de um ensaio para verificar o tamanho dos telômeros ainda seria o melhor cenário para comprovar esta afirmação, mas nosso estudo permite destacar a importância de desvendar possíveis relações entre o envelhecimento baseados em DNA e a variabilidade fenotípica dentro de um quadro sindrômico específico como na síndrome 5p-.

5.2 Correlação genótipo-fenótipo

Paciente 2

A paciente 2 possui o choro “forte” que não é de miado de gato. Segundo Mainardi e Elmakky (2006; 2014) a região 5p15.33 está relacionada ao choro de miado, sendo esta uma região que a paciente não tem deletada. A ausência dessa característica pode ser devido a paciente ter 2 cópias dessa região. Além disso, ela é a única que possui cranioestenose. Comparamos o perfil de metilação dessa paciente *versus* os outros pacientes 5p- (figura 11 e 12).

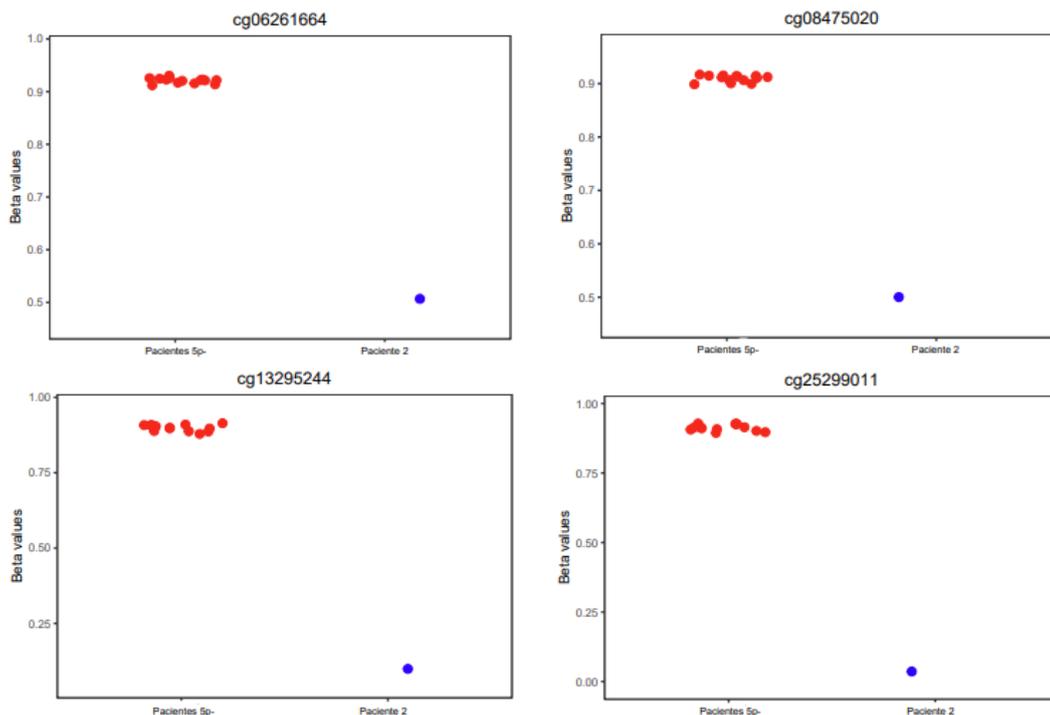


Figura 11 – Top 4 sondas diferencialmente metiladas entre a paciente 2 e os pacientes 5p-. Com base nos valores de beta, os pacientes 5p- possuem hipermetilação (vermelho) e a paciente 2 hipometilação (azul). As sondas correspondem aos cromossomos 2, 16, 17 e 11 respectivamente.

Há dois genes localizados na região das sondas, o gene *MGAT5B* e o gene *PIEZO1*. Segundo Indelicato e Trinchera 2021, foi realizado um estudo essencial no cérebro e a expressão do glicogênio *MGAT5B* está sob controle de modificações de histonas. Já Solis et al., 2019, demonstram que o gene *PIEZO1* tem um papel fisiológico na imunidade.

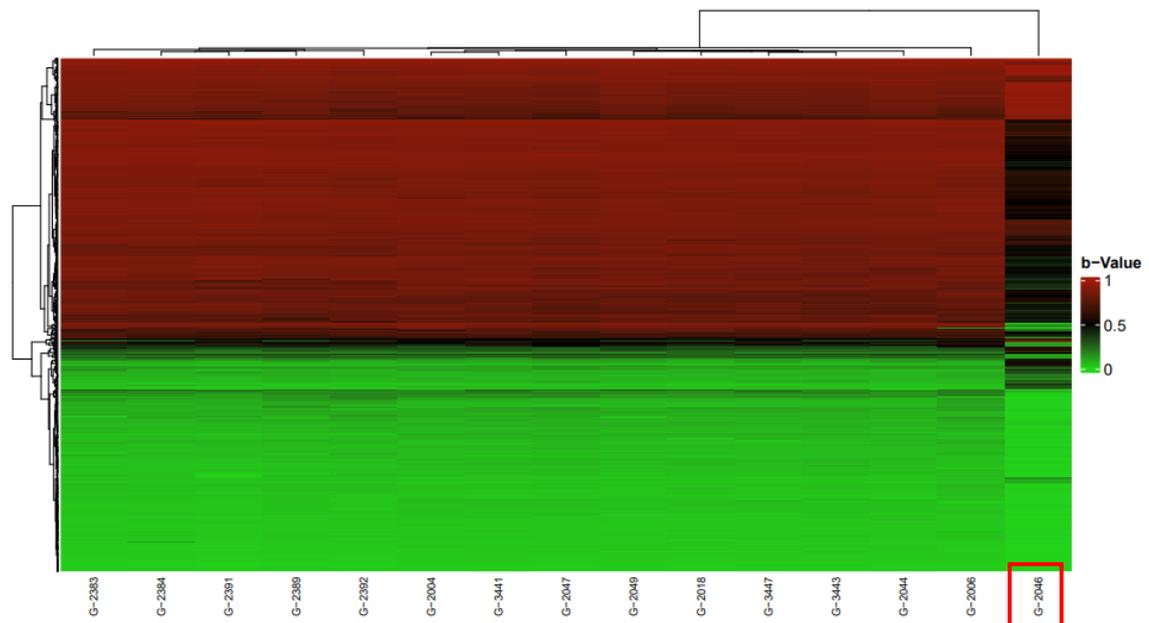


Figura 12 – Heatmap evidenciando o perfil de metilação da paciente 2 x pacientes com 5p-.

Na figura 12 é possível notar uma diferença significativa em regiões com hemimetilação (metilação em apenas um alelo, cor preta), que estão localizadas em diversas regiões do genoma. Para essa comparação encontramos uma sonda diferencialmente metilada na região do choro típico (5p15.33), sonda cg23989709, gene *SLC12A7*, localizada na região *shore* (1 a 2.000 pares de bases distante da ilha CpG). Contudo, olhando o genoma de forma geral, e não apenas focando em um gene ou região específica para um fenótipo, vemos diferença significativa que pode explicar alguns fenótipos que não se limitam a um gene ou região.

Paciente 12

A paciente 12 é a única sem atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM), além disso, é uma das únicas pacientes que entende comandos, forma frases simples, conhece as cores, letras e números, também se alimenta e se higieniza sozinha. Os outros pacientes costumam ter mais dificuldades nessas atividades. Os estudos da SCDC ressaltam que ADNPM é uma característica comum nesta síndrome. Ainda, destacamos que todos os pacientes apresentam deficiência intelectual (DI), mesmo que em alguns casos seja de forma leve a moderada e em outros casos de forma mais grave.

Comparamos o perfil de metilação dessa paciente *versus* os outros pacientes 5p- (figura 13 e 14).

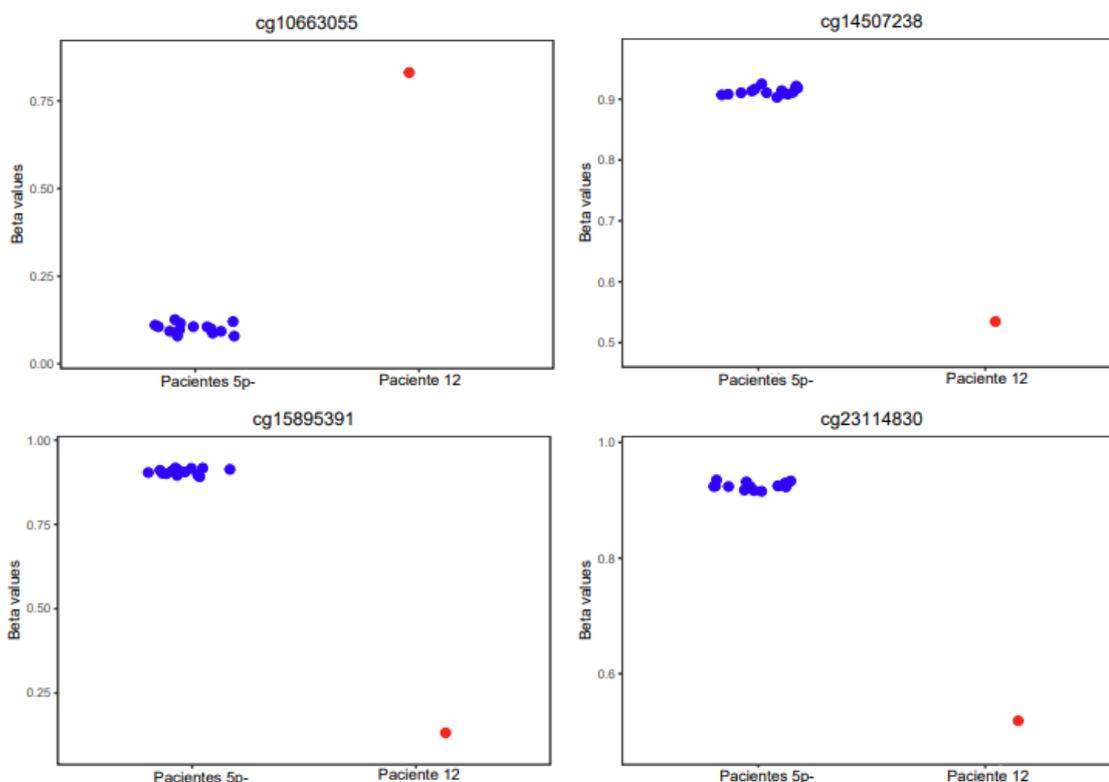


Figura 13 - Top 4 sondas diferencialmente metiladas entre a paciente 12 e os pacientes 5p-. Com base nos valores de beta, os pacientes 5p- possuem hipermetilação (azul) em 3 sondas e hipometilação em 1 sonda e a paciente 12 possui hipometilação (vermelho) em 3 sondas e hipermetilação em 1 sonda. As sondas correspondem aos cromossomos 6, 12, 5 e 14 respectivamente.

A sonda cg15895391 que está hipometilada na paciente e hipermetilada nos outros pacientes 5p-, está localizada em 5p15.2, possui o gene *TRIO* que foi relacionado na literatura com deficiência intelectual e problemas neurocomportamentais, incluindo traços autistas e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Varvagiannis et al., 2017). A paciente não possui traços autistas e nem de hiperatividade. Todos os pacientes perderam uma cópia dessa região, sendo assim, a informação adquirida do *status* da metilação é referente ao alelo remanescente. Como esse gene é sensível à dosagem, a sua transcrição pode ser diferente nos pacientes com base na cópia do alelo remanescente.

A sonda cg14507238, que também está hipometilada na paciente e hipermetilada nos outros pacientes 5p-, está localizada em 12p13.31, possui o gene *ANO2* que é um canal de cloreto ativado por cálcio e foi descrito em várias regiões do cérebro com evidência de um papel da modulação dependente de cloreto no sistema olivo-cerebelar que pode ser importante para a coordenação motora dependente do cerebelo e o aprendizado adequado (Auer et al, 2021).

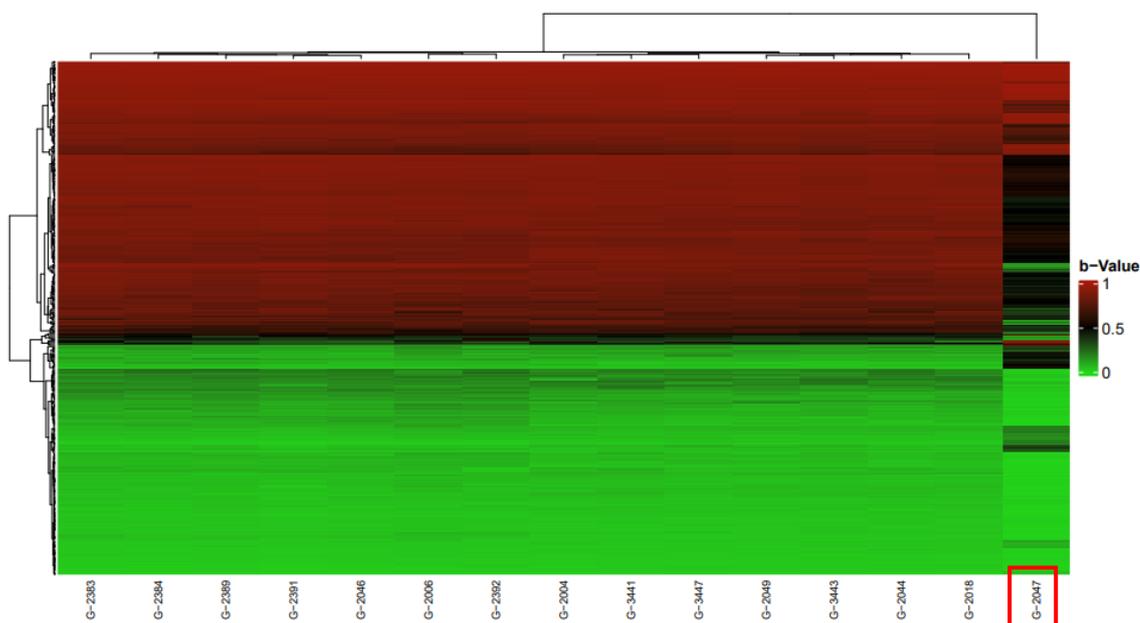


Figura 14 - Heatmap evidenciando o perfil de metilação da paciente 12 x pacientes com 5p-. É possível visualizar diferença no *status* da metilação, principalmente de regiões com hemimetilação (cor preta).

Paciente 13

O paciente 13 tem convulsões e a mãe relatou em um dos encontros anuais da síndrome *Cri Du Chat* que suspeita da síndrome de *Prader-Willi* (PWS) devido ao paciente ter compulsão alimentar e não ter saciedade, além da hipotonia. O paciente não tem obesidade nem hipogonadismo. No *array* genômico, não encontramos nenhuma CNV no cromossomo 15, e nenhuma região de homozigidade (ROH) na região 15q11, região crítica para a PWS. No entanto, encontramos uma região diferencialmente metilada nesse paciente em relação aos outros pacientes 5p- (chr15:25334879-25334988), região 15q11.2, gene *SNHG14*. E uma sonda diferencialmente metilada (cg18909847), região 15q11, gene *SNORD116*, localizada em *OpenSea* (4.000 pares de bases distante da ilha).

A síndrome de Prader-Willi é causada pela perda de função do locus 15q11-q13 herdado paternalmente. Essa região é governada por um mecanismo chamado de *imprinting* genômico, no qual os genes são expressos exclusivamente a partir de um alelo parental. O *imprinting* é estabelecido na linhagem germinativa e é controlado por um centro de *imprinting*. Um centro de *imprinting* da PWS compreende uma ilha CpG que não é metilada no alelo paterno e metilada no alelo materno. Embora a PWS seja considerada uma síndrome de genes contíguos, baseada em grandes deleções e dissomia uniparental, a falta de expressão de apenas um transcrito de RNA não codificante do gene *SNURF-SNRPN/SNHG14* pode ser a principal causa da PWS. Além disso, pequenas deleções atípicas no gene *SNORD116* paterno está relacionada a maioria dos fenótipos clínicos da PWS (Chung et al., 2020).

A vista disso é importante ressaltar que, embora haja informações sobre a regulação e expressão de determinados genes e transcritos derivados do locus 15q11-q13, ainda há muito a ser compreendido sobre sua verdadeira contribuição a nível molecular para as características clínicas da PWS. Acreditamos que essa diferença na metilação pode esclarecer algumas características fenotípicas, contudo, novos estudos utilizando outras tecnologias ômicas (transcriptômica e proteômica) deverão ser realizados.

Ademais, o paciente também tem convulsões, na literatura há raríssimos relatos de convulsões e epilepsia em pacientes com a síndrome *Cri Du Chat*. Segundo Wang et al., 2017, modificações epigenéticas, incluindo modificações de histonas (H3K27), estão associadas ao desenvolvimento de convulsões e epileptogênese, no entanto, seu mecanismo subjacente ainda precisa ser elucidado. Não encontramos genes diretamente associados a convulsões, e as principais ontologias encontradas estão relacionadas a metilação das histonas (H3-K9; H3-K4) (figura 15).

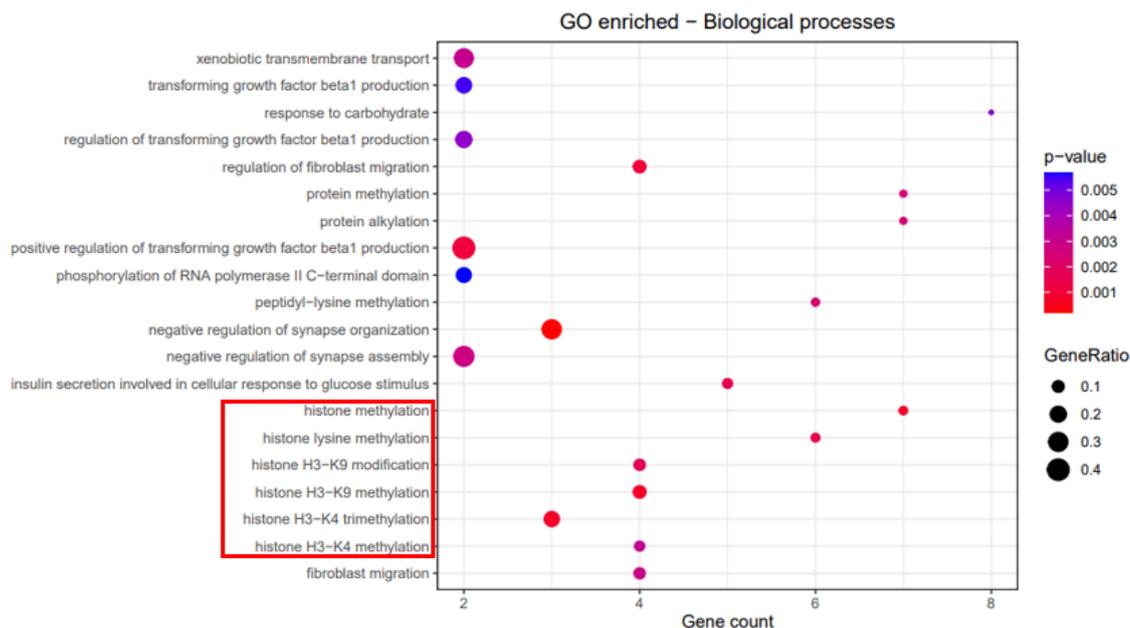


Figura 15 – Ontologia gênica de processo biológico do paciente 13, evidenciando as vias de metilação das histonas. GeneRatio: cálculo proporcional da razão de sondas diferencialmente metiladas em relação a quantidade de sondas existente em determinada via. GeneCount: quantidade de sondas existente na via.

Na figura 16 é possível visualizar a comparação do perfil de metilação desse paciente *versus* os outros pacientes 5p-.

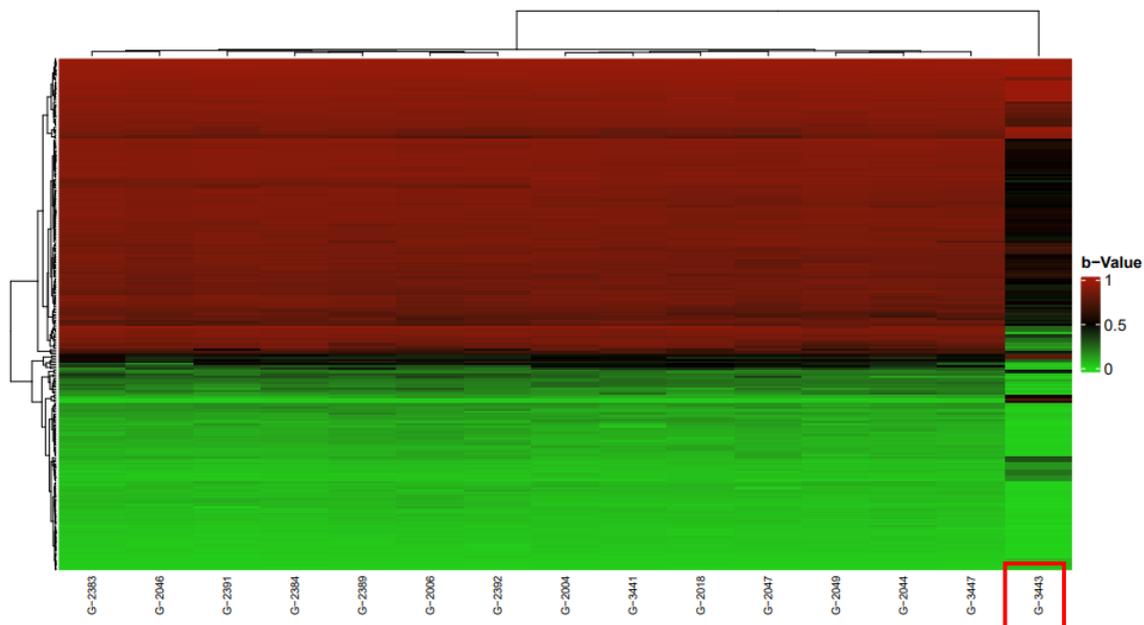


Figura 16 – *Heatmap* evidenciando o perfil de metilação do paciente 13 x pacientes com 5p-. É possível visualizar diferença no *status* da metilação, principalmente de regiões com hemimetilação (cor preta).

Paciente 3

A paciente 3 é a única que possui hipertricose que está localizada no dorso e no braço. No *array* genômico não encontramos nenhuma CNV relacionada a hipertricose, e para as DMRs e DMPs também não foi possível fazer uma correlação direta com os genes relacionados a hipertricose disponíveis na literatura. Comparamos o seu perfil de metilação com os outros pacientes 5p- (figura 17).

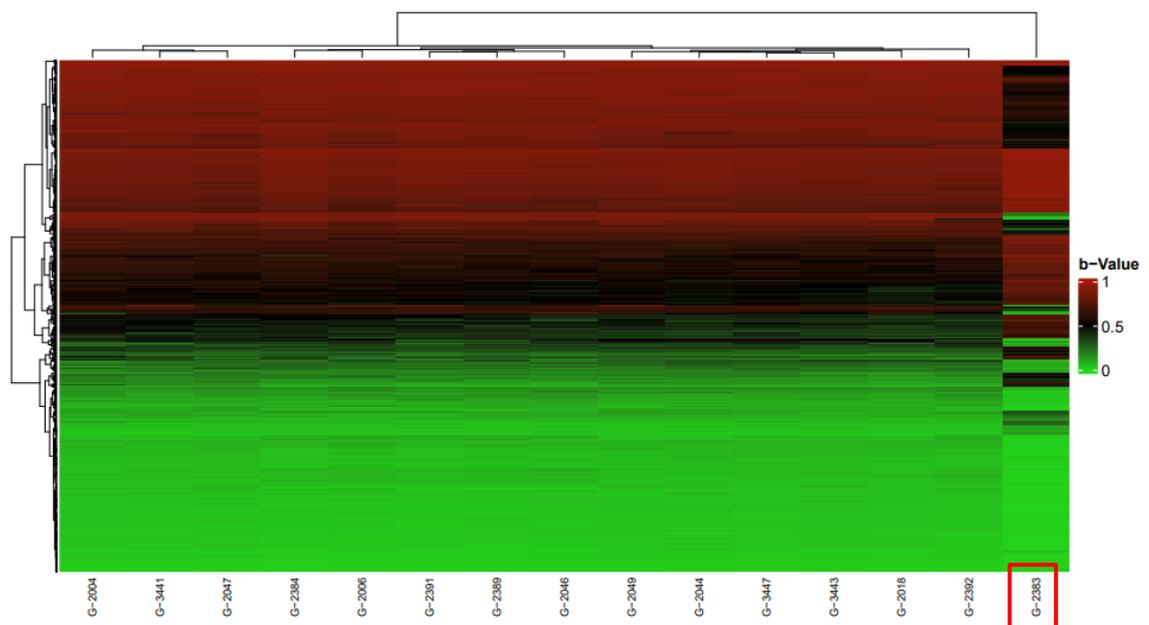


Figura 17 – *Heatmap* evidenciando o perfil de metilação da paciente 3 x pacientes com 5p-. É possível visualizar diferença no *status* da metilação tanto de regiões hipometiladas (verde), quanto de regiões hemimetiladas (cor preta).

Mesmo não encontrando um gene específico relacionado ao fenótipo da hipertricose, é possível que outros genes ainda não descritos na literatura estejam envolvidos. Além disso, como mencionado antes, olhando o genoma de forma geral, e não apenas focando em um gene ou região específica para um fenótipo, vemos diferença significativa que pode explicar alguns fenótipos que não se limitam a um gene ou região.

Pacientes 8 e 11

Os pacientes 8 e 11 possuem hiperpigmentação e tivemos o retorno de 2 DMRs, uma no cromossomo 14q22.2, gene *BMP4*, e uma no cromossomo 6p21.32, gene *AGPAT1*. Em um estudo de Yaar et al., 2006, foi identificado que o gene *BMP4* está associado com a síntese de melanina. Já para o gene *AGPAT1* não foi possível encontrar estudos na literatura com essa associação. Seguimos, então, com a comparação do perfil de metilação dos pacientes 8 e 11 com os outros pacientes 5p- (figura 18).

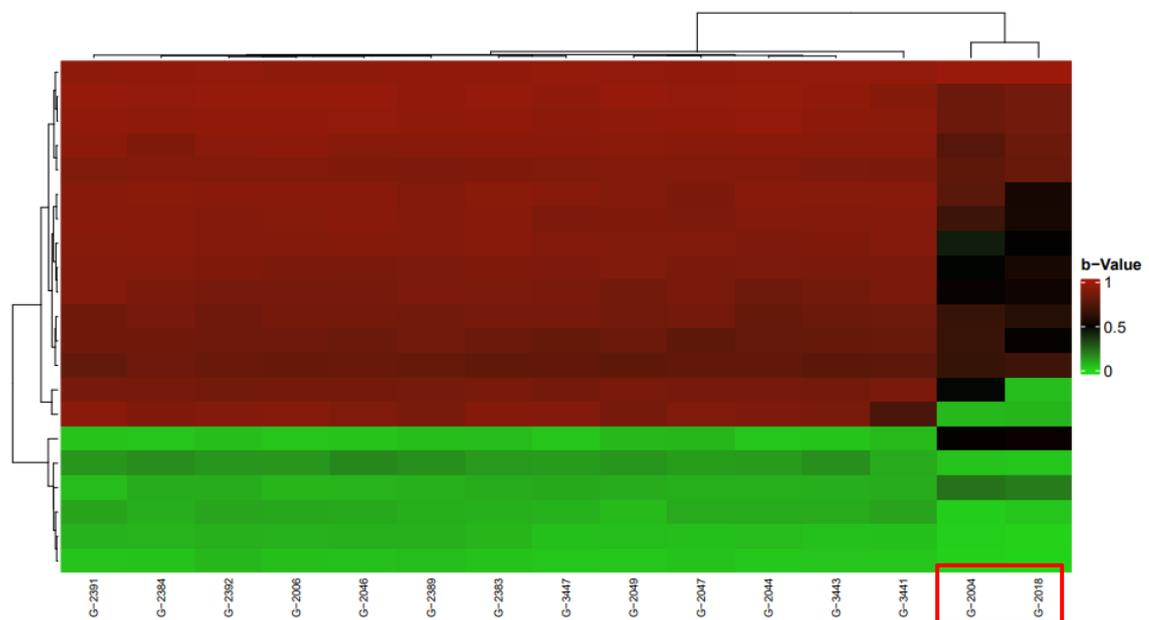


Figura 18 - *Heatmap* evidenciando o perfil de metilação dos pacientes 8 e 11 x pacientes com 5p-. É possível visualizar diferença no *status* da metilação principalmente de regiões hemimetiladas (cor preta).

5.3 Considerações sobre o estudo da metilação do DNA em síndromes genéticas raras

É interessante inferir uma ligação entre as alterações observadas na metilação do DNA com os fenótipos dos pacientes, porém dada a atual incerteza em relação ao significado clínico e à aplicação da grande maioria dos dados epigenéticos, retornar resultados clinicamente válidos e acionáveis de estudos de pesquisa epigenética exige um processo cuidadoso de revisão científica e

clínica, tanto no campo quanto nos resultados de estudos individuais. Algumas marcas epigenéticas são mais dinâmicas do que outras, portanto, várias medições ao longo do tempo podem ser necessárias para determinar sua significância (Dyke et al., 2019). Além disso, as exposições ambientais exercem sua influência sobre as doenças em combinação com fatores de risco genéticos, por meio de interações gene-ambiente. As marcas epigenéticas, são componentes chave das interações gene-ambiente que afetam a expressão gênica (Konigsberg, 2020).

Em um estudo recente de (Holland et al., 2022), há uma hipótese relacionada a perda de um ou vários genes sensíveis à dosagem no cromossomo 5 que podem causar mudanças nos programas de desenvolvimento durante o desenvolvimento do embrião, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento de fenótipos no paciente, ou seja, se um gene sensível a dosagem possui diferenças na metilação relacionadas a funções epigenéticas em geral, os pacientes podem passar a desenvolver um determinado fenótipo. Em nosso estudo, principalmente na comparação de casos *versus* controles, pudemos identificar DMRs e vias biológicas relacionadas a funções epigenéticas, o que nos ajuda a responder essa hipótese.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, pudemos identificar que os resultados do *array* epigenômico condizem com os resultados do *array* genômico. Quando comparamos casos *versus* amostras controles para determinada região a ser pesquisada, temos o retorno das regiões diferencialmente metiladas que podem ser significativas para responder uma hipótese clínica (é necessário haver um conjunto de informações relevantes tanto clínica quanto da região investigada). Esta pode ser uma vantagem para os casos em que há dúvidas sobre uma síndrome de *imprinting* genômico ou uma síndrome causada por deleção/duplicação, visto que, apenas o *array* genômico não é capaz de verificar regiões metiladas/imprintadas.

Foi possível identificar que o perfil de metilação dos pacientes com SCDC são distintos entre si, mesmo alguns pacientes possuindo praticamente o mesmo tamanho de deleção. Verificamos que as DMRs fora da região 5p estão principalmente associadas a atividade da regulação da transcrição gênica, *splicing* e remodelação da cromatina, e a maioria das vias biológicas encontradas estão relacionadas a transcrição, ligação de histonas e cromatina, complexo de spliceossomo e ribossomal e processamento de RNAs, sugerindo que as alterações em 5p podem causar um desequilíbrio em outras regiões cromossômicas capazes de afetar a modulação gênica e, assim, explicar as diferenças fenotípicas em pacientes com 5p-.

Os achados das modificações epigenéticas melhoram a compreensão sobre o genoma humano e esclarecem alguns mecanismos epigenéticos na SCDC, trazendo conhecimento sobre o conteúdo gênico de determinadas regiões. Futuramente, esta análise poderá ser ampliada para outras síndromes com alteração no número de cópias, a fim de compartilhar achados sobre esse modelo de abordagem epigenética.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível construir um perfil de metilação do DNA de pacientes com a deleção 5p.

Mapeamos o *status* da metilação na região do ponto de quebra utilizando o ensaio *Infinium MethylationEPIC BeadChip* da Illumina® e investigamos os elementos genômicos afetados pela metilação.

Relacionamos as regiões mapeadas com o fenótipo clínico, onde os achados dão perspectivas para estudos futuros, sendo este um modelo de abordagem epigenética para o estudo de genes diferencialmente metilados.

ANEXOS

ANEXO AFicha clínica para coleta de dados sobre a Síndrome *Cri Du chat*

Nome do(a) paciente: _____

Registro HC/ICr: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Sexo do(a) paciente: () F () M

Data de atendimento: ____/____/____

Nome da mãe: _____

Nome do pai: _____

Contato: _____

EVOLUÇÃO

Acompanhamentos atuais

Acompanhamentos pregressos

Uso de medicamentos

Exames prévios (físicos e complementares)

Cariótipo do(a) paciente e local: _____

MLPA: _____

FISH: _____

Array: _____

Cariótipo dos pais: Mãe _____

Pai _____

Outros exames e resultados: _____

Você foi informado sobre o risco de ter outro filho com a síndrome de Cri Du Chat? Sim () Não ()

Se sim, qual foi o risco informado? _____

ANTECEDENTES PESSOAIS**Pré-concepção**

Idade da mãe quando engravidou: _____ anos

Foi o(a) primeiro(a) filho(a)? Sim () Não ()

Teve outras gestações após o nascimento do paciente? Sim () Não ()

Número total de gestações: _____ Número de abortos: _____

Todas as gestações foram do mesmo parceiro? Sim () Não ()

Pais consanguíneos? Sim () Não () Algum familiar afetado? Sim () Não ()

Gestação e nascimento

Teve alguma complicação na gestação? Sim () Não ()

(Qual? _____)

O(a) paciente nasceu de quantas semanas? _____

Onde nasceu? _____

Parto: () Normal () Cesárea (Motivo? _____)

Ao nascimento: Peso _____ Altura _____ P.Torácico _____ P.Cefálico _____

Chorou logo ao nascer? Sim () Não () APGAR: _____

Teve complicações no berçário? Sim () Não ()

(Quais? _____)

Recebeu alta da maternidade com quantos dias de vida? _____

Como era o choro do seu bebê? Forte () Fraco ()

Você percebeu algo diferente no seu bebê? Sim () Não ()

(O que? _____)

Tomou leite materno? Sim () Não () (Até quando?

_____)

Infância

Teve dificuldade de alimentação no primeiro ano de vida? Sim () Não ()

Se sim, por que e até quando? (_____)

Baba(va) muito? Sim () Não ()

Engasga(va) muito? Sim () Não ()

Teve dificuldade de ganhar peso e altura quando criança? Sim () Não ()

Cirurgias: _____

Internações: _____

Infecções: _____

Diarréias: _____

Desenvolvimento Motor

Sustento cefálico: _____

Primeiros passos: _____

Sentou sem apoio: _____

Ficar em pé: _____

Desenvolvimento Cognitivo

Falou? Sim () Não () Com que idade? _____

Forma frases? Sim () Não ()

Comunica através de gestos? Sim () Não ()

Entende comando? Sim () Não ()

Conhece cores? Sim () Não ()

Conhece letras? Sim () Não ()

Conhece números? Sim () Não ()

Sabe ler? Sim () Não ()

Sabe escrever? Sim () Não ()

Manipula dinheiro? Sim () Não ()

Come sozinho? Sim () Não ()

Higiene pessoal sozinho? Sim () Não ()

Auto-agressão? Sim () Não ()

Heteroagressão? Sim () Não ()

TOC? Sim () Não ()

Espectro autista? Sim () Não ()

Sente irritabilidade? Sim () Não ()

Fez terapia com fonoaudióloga? Sim () Não ()

Frequenta ou frequentou escola? Sim () Não ()

Se sim, escola normal () ou especial ()? Até que idade? _____

Faz xixi sozinho? Sim () Não () Desde que idade? _____

Faz cocô sozinho? Sim () Não () Desde que idade? _____

Avaliação psicológica:

O que seu filho sabe ou gosta de fazer?

Na sua opinião, quais são as principais dificuldades no cuidado de seu(sua) filho(a)?

EXAME PRESENCIAL
Antropometria

Idade do paciente ao diagnóstico: _____

Peso: _____ p()

Altura: _____ p()

Perímetro Cefálico Atual: _____ p()

Distância Intercantal Interna: _____ p()

Distância Intercantal Externa: _____ p()

Mão: _____ p()

Dedo médio: _____ p()

Dismorfologia

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Rosto arredondado | <input type="checkbox"/> Filtro curto |
| <input type="checkbox"/> Rosto afinado | <input type="checkbox"/> Cranioestenose |
| <input type="checkbox"/> Assimetria facial | <input type="checkbox"/> Coloboma ocular |
| <input type="checkbox"/> Hipertelorismo | <input type="checkbox"/> Voz anasalada |
| <input type="checkbox"/> Estrabismo | <input type="checkbox"/> Fissuras palpebrais laterais inclinadas para baixo |
| <input type="checkbox"/> Dobras epicânticas | <input type="checkbox"/> Boca curva para baixo |
| <input type="checkbox"/> Ponte nasal proeminente | <input type="checkbox"/> Língua protrusa |
| <input type="checkbox"/> Orelhas de baixa implantação | <input type="checkbox"/> Palato alto |
| <input type="checkbox"/> Orelhas displásicas () antivertidas | <input type="checkbox"/> Refluxo gastro-esofágico |
| <input type="checkbox"/> Hiperpigmentação | <input type="checkbox"/> Microretrognatia |
| <input type="checkbox"/> Hipopigmentação | <input type="checkbox"/> Clinodactilia |
| <input type="checkbox"/> Estreitamento bitemporal | <input type="checkbox"/> Outros: _____ |
| <input type="checkbox"/> Fenda labial | _____ |
| <input type="checkbox"/> Fenda palatina | _____ |

Sistema Nervoso

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Hipertonia | <input type="checkbox"/> ADNPM |
| <input type="checkbox"/> Hipotonia | <input type="checkbox"/> Hiperatividade |
| <input type="checkbox"/> Reflexos patelares | <input type="checkbox"/> Malformação cerebral |
| <input type="checkbox"/> Convulsões | <input type="checkbox"/> Outro: _____ |

Sistema Sensorial

- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Baixa visão |
| <input type="checkbox"/> Deficiência auditiva; tipo: _____ |
| <input type="checkbox"/> Malformação ocular, tipo: _____ |

Sistema Cardíaco

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Comunicação interatrial | <input type="checkbox"/> Coarctação da aorta |
| <input type="checkbox"/> Comunicação interventricular | <input type="checkbox"/> Tetralogia de Fallot |
| <input type="checkbox"/> Defeito do septo atroventricular | <input type="checkbox"/> Outro: _____ |

Malformações do trato geniturinário

- Genitália ambígua
- Hidronefrose
- Má formação renal
- Criptorquidia
- Obstrução uretral
- Outro: _____

Malformações musculoesqueléticas

- () Pé torto congênito
- () Hérnia diafragmática
- () Anomalia de membros
- () Polidactilia
- () Luxações_____
- () *Sandal gap*
- () Sindactilia
- () Escoliose
- () Anomalia vertebral
- () Outro:_____

Observações: _____

Assinatura e carimbo do médico

____/____/_____
Data de atendimento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida VT, Chehimi SN, Gasparini Y, Nascimento AM, Carvalho GFS, Montenegro MM, Zanardo ÉA, Dias AT, Assunção NA, Kim CA, Kulikowski LD. Cri-du-Chat Syndrome: Revealing a Familial Atypical Deletion in 5p. *Mol Syndromol*. 2022 May;(6):527-536.

Auer F, Franco Taveras E, Klein U, Kesenheimer C, Fleischhauer D, Möhrten F, Frings S. Anoctamin 2-chloride channels reduce simple spike activity and mediate inhibition at elevated calcium concentration in cerebellar Purkinje cells. *PLoS One*. 2021 Mar 2;16(3):e0247801.

Archer T, Oscar-Berman M, Blum K. Epigenetics in Developmental Disorder: ADHD and Endophenotypes. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2011 Jun 30;2(104):1000104.

Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011 Oct;98(4):288-95.

Burns, G, Bottino P. Genética. *Guanabara Koogan*. Rio de Janeiro. 1991, p – 248-253, 6° edição.

Biterge B, Schneider R. Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res*. 2014 Jun;356(3):457-66.

Ballif BC, Wakui K, Gajecka M, Shaffer LG. Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Hum Genet*. 2004;114(2):198-206.

Chehimi SN, Zanardo ÉA, Ceroni JRM, Nascimento AM, Madia FAR, Dias AT, Filho GMN, Montenegro MM, Damasceno J, Costa TVMM, Gasparini Y, Kim CA, Kulikowski LD. Breakpoint delineation in 5p- patients leads to new insights about microcephaly and the typical high-pitched cry. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Feb;8(2):e957.

Chehimi SN, Almeida VT, Nascimento AM, Zanardo ÉA, de Oliveira YG, Carvalho GFDS, Wolff BM, Montenegro MM, de Assunção NA, Kim CA, Kulikowski LD. Novel rearrangements between different chromosomes with direct impact on the diagnosis of 5p- syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2022 May 28;77:100045.

Cassidy FC, Charalambous M. Genomic imprinting, growth and maternal-fetal interactions. *J Exp Biol.* 2018 Mar 7;221(Pt Suppl 1):jeb164517.

Chung MS, Langouët M, Chamberlain SJ, Carmichael GG. Prader-Willi syndrome: reflections on seminal studies and future therapies. *Open Biol.* 2020 Sep;10(9):200195.

Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron.* 2011 Jun 9;70(5):813-29.

Dyke SOM, Saulnier KM, Dupras C, Webster AP, Maschke K, Rothstein M, Siebert R, Walter J, Beck S, Pastinen T, Joly Y. Points-to-consider on the return of results in epigenetic research. *Genome Med.* 2019 May 23;11(1):31.

Du Q, Luu PL, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics.* 2015;7(6):1051-73.

Elmakky A, Carli D, Lugli L, Torelli P, Guidi B, Falcinelli C, Fini S, Ferrari F, Percesepe A. A three-generation family with terminal microdeletion involving 5p15.33-32 due to a whole-arm 5;15 chromosomal translocation with a steady phenotype of atypical cri du chat syndrome. *Eur J Med Genet.* 2014;57(4):145-50.

Estampador AC, Franks PW. Genetic and epigenetic catalysts in early-life programming of adult cardiometabolic disorders. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014 Dec 1;7:575-86.

Guilherme RS, Hermetz KE, Varela PT, Perez AB, Meloni VA, Rudd MK, Kulikowski LD, Melaragno MI. Terminal 18q deletions are stabilized by neotelomeres. *Mol Cytogenet.* 2015 May;13;8:32.

Gruber, C., and Bogunovic, D. Incomplete Penetrance in Primary Immunodeficiency: a Skeleton in the Closet. *Hum. Genet.* 2020 139, 745–757.

Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T, Gottardo R, Hahne F, Hansen KD, Irizarry RA, Lawrence M, Love MI, MacDonald J, Obenchain V, Oleś AK, Pagès H, Reyes A, Shannon P, Smyth GK, Tenenbaum D, Waldron L, Morgan M. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods.* 2015 Feb;12(2):115-21.

Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 2013;14(10):R1.

Holland P., Wildhagen M., Istre M., Reiakvam OM., Dahl JA. and Søråas A. Cri du chat syndrome patients have DNA methylation changes in genes linked to symptoms of the disease. *Clinical Epigenetics*. 2022 14:128.

Indelicato R, Trinchera M. Epigenetic Regulation of Glycosylation. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1325:173-186.

Konigsberg IR, Yang IV. It's in the (Epi)genetics: Effects of DNA Methylation on Gene Expression in Atopic Asthma? *Chest*. 2020 Nov;158(5):1799-1801.

Kim MK, Kim DJ. Effects of Oral Stimulation Intervention in Newborn Babies with Cri du Chat Syndrome: Single-Subject Research Design. *Occup Ther Int*. 2018 May 8;2018:6573508.

Kimura R, Lardenoije R, Tomiwa K, Funabiki Y, Nakata M, Suzuki S, Awaya T, Kato T, Okazaki S, Murai T, Heike T, Rutten BPF, Hagiwara M. Integrated DNA methylation analysis reveals a potential role for ANKRD30B in Williams syndrome. *Neuropsychopharmacology*. 2020 Sep;45(10):1627-1636.

Kingdom R, Wright CF. Incomplete Penetrance and Variable Expressivity: From Clinical Studies to Population Cohorts. *Front Genet*. 2022 Jul 25;13:920390.

Li S, Dou X, Gao R, Ge X, Qian M, Wan L. A remark on copy number variation detection methods. *PLoS One*. 2018 Apr 27;13(4):e0196226.

Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Sèringe P, Turpin R. 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1963; 257:3098–3102.

Li Y. Modern epigenetics methods in biological research. *Methods*. 2021 Mar;187:104-113.

Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev*. 2012 Jun;22(3):211-20.

Luo Y, Hermetz KE, Jackson JM, Mülle JG, Dodd A, Tsuchiya KD, Ballif BC, Shaffer LG, Cody JD, Ledbetter DH, Martin CL, Rudd MK. Diverse mutational mechanisms cause pathogenic subtelomeric rearrangements. *Hum Mol Genet*. 2011 Oct 1;20(19):3769-78.

Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*. 2005;1(6):e49.

Mainardi PC. Cri du Chat syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Sep 5;1:33.
Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Res*. 2016 Jun 8;5.

Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Bricarelli FD. Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*. 2001 Mar;38(3):151-8.

Mainardi PC, Pastore G, Castronovo C, Godi M, Guala A, Tamiazzo S, Provera S, Pierluigi M, Bricarelli FD. The natural history of Cri du Chat Syndrome. A report from the Italian Register. *Eur J Med Genet*. 2006;49(5):363-83.

Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 2002 Feb;3(2):91-102.

Mroczek M, Sanchez MG. Genetic modifiers and phenotypic variability in neuromuscular disorders. *J Appl Genet*. 2020 Dec;61(4):547-558.

Miele A, Dekker J. Long-range chromosomal interactions and gene regulation. *Mol Biosyst*. 2008;4(11):1046-57.

Niebuhr E. The Cri du Chat syndrome: epidemiology, cytogenetics, and clinical features. *Hum Genet*. 1978 Nov 16;44(3):227-75.

Nguyen JM, Qualmann KJ, Okashah R, Reilly A, Alexeyev MF, Campbell DJ. 5p deletions: Current knowledge and future directions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2015 Sep;169(3):224-38.

Ornellas F, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Combined parental obesity augments single-parent obesity effects on hypothalamus inflammation, leptin signaling (JAK/STAT), hyperphagia, and obesity in the adult mice offspring. *Physiol Behav*. 2017 Jan 1;153:47-55.

Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, Van Dijk S, Muhlhauser B, Stirzaker C, Clark SJ. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol*. 2016 Oct 7;17(1):208

Phipson B, Oshlack A. DiffVar: a new method for detecting differential variability with application to methylation in cancer and aging. *Genome Biol.* 2014 Sep 23;15(9):465.

Rahit KMT, Tarailo-Graovac M. Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes (Basel).* 2020 Feb 25;11(3):239.

Rooney K, Levy MA, Haghshenas S, Kerkhof J, Rogaia D, Tedesco MG, Imperatore V, Mencarelli A, Squeo GM, Di Venere E, Di Cara G, Verrotti A, Merla G, Tedder ML, DuPont BR, Sadikovic B, Prontera P. Identification of a DNA Methylation Episignature in the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 10;22(16):8611.

Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, Raca G, Ritter DI, South ST, Thorland EC, Pineda-Alvarez D, Aradhya S, Martin CL. 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). *Genet Med.* 2020 Feb;22(2):245-257.

Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, Gordon LA, Scott D, Xie G, Huang W, Hellsten U, Tran-Gyamfi M, She X, Prabhakar S, Aerts A, Altherr M, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caoile C, Challacombe JF, Chan YM, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Lopez F, Lou Y, Martinez D, Medina C, Morgan J, Nandkeshwar R, Noonan JP, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Priest J, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wheeler J, Wu K, Yang J, Dickson M, Cheng JF, Eichler EE, Olsen A, Pennacchio LA, Rokhsar DS, Richardson P, Lucas SM, Myers RM, Rubin EM. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):268-74.

Solis AG, Bielecki P, Steach HR, Sharma L, Harman CCD, Yun S, de Zoete MR, Warnock JN, To SDF, York AG, Mack M, Schwartz MA, Dela Cruz CS, Palm NW, Jackson R, Flavell RA. Mechanosensation of cyclical force by PIEZO1 is essential for innate immunity. *Nature.* 2019 Sep;573(7772):69-74.

Sadikovic B, Levy MA, Kerkhof J, Aref-Eshghi E, Schenkel L, Stuart A, McConkey H, Henneman P, Venema A, Schwartz CE, Stevenson RE, Skinner SA, DuPont BR, Fletcher RS, Balci TB, Siu VM, Granadillo JL, Masters J, Kadour M, Friez MJ, van Haelst MM, Mannens MMAM, Louie RJ, Lee JA, Tedder ML, Alders M. Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders. *Genet Med*. 2021 Jun;23(6):1065-1074.

Toubiana S, Selig S. Human subtelomeric DNA methylation: regulation and roles in telomere function. *Curr Opin Genet Dev*. 2020 Feb;60:9-16.

Virbalas JM, Palma G, Tan M. Obstacles to communication in children with cri du chat syndrome. *J Voice*. 2012 Nov;26(6):821.e1-

Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ. Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by de novo telomere addition. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):610-22.

Varvagiannis K, Vissers LELM, Baralle D, de Vries BBA. *TRIO*-Related Intellectual Disability. 2017 Aug 10. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023.

Yaar M, Wu C, Park HY, Panova I, Schutz G, Gilchrest BA. Bone morphogenetic protein-4, a novel modulator of melanogenesis. *J Biol Chem*. 2006 Sep 1;281(35):25307-14.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*. 2007 Apr;39(4):457-66.

Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epigenetics in breast and prostate cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1238:425-66.

Wang Z, Zhang Y, Fang J, Yu F, Heng D, Fan Y, Xu J, Peng B, Liu W, Han S, He X. Decreased Methylation Level of H3K27me3 Increases Seizure Susceptibility. *Mol Neurobiol*. 2017 Nov;54(9):7343-7352.

Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D. Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1283:1-16.

APÊNDICE

Abstract dos artigos publicados sobre a síndrome *Cri Du Chat*Molecular
Syndromology

Novel Insights from Clinical Practice

Mol Syndromol
DOI: 10.1159/000524371Received: March 21, 2021
Accepted: March 26, 2022
Published online: May 18, 2022**Cri-du-Chat Syndrome: Revealing
a Familial Atypical Deletion in 5p**Vanessa T. Almeida^a Samar N. Chehimi^a Yanca Gasparini^a
Amom M. Nascimento^a Gleyson F.S. Carvalho^a Marília M. Montenegro^a
Évelin Aline Zanardo^a Alexandre T. Dias^a Nilson A. Assunção^b
Chong A. Kim^c Leslie D. Kulkowski^a^aLaboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bDepartamento de Química, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; ^cUnidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil**Established Facts**

- The main clinical feature of cri-du-chat syndrome (CdCS) is the high-pitched cat-like cry in newborns.
- Karyotype analysis is the only test available for most Brazilian patients with clinical manifestations of CdCS.

Novel Insights

- We report the investigation of a familial 6.2-Mb atypical deletion in 5p.
- We highlight the importance of performing cytogenomic tests for precise delineation of 5p deletion breakpoints to improve genotype-phenotype correlation.

KeywordsCri-du-chat syndrome · Familial deletion · Multiplex
ligation-dependent probe amplification · Array**Abstract****Introduction:** Cri-du-chat syndrome is generally diagnosed when patients present a high-pitched cry at birth, microcephaly, ocular hypertelorism, and prominent nasal bridge.The karyotype is useful to confirm deletions in the short arm of chromosome 5 (5p-) greater than 10 Mb. In cases of smaller deletions, it is necessary to resort to other molecular techniques such as fluorescence in situ hybridization, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) or genomic array. **Case Presentation:** We report a family with an atypical deletion in 5p (mother and 2 children) and variable phenotypes compared with the literature. We applied a P064 MLPA kit to evaluate 5p- in the mother and the 2 children, and weKarger@karger.com
www.karger.com/doi

© 2022 S. Karger AG, Basel

Correspondence to:
Vanessa T. Almeida, vanesata@usp.br

Karger



Original articles

Novel rearrangements between different chromosomes with direct impact on the diagnosis of 5p- syndrome



Samar Nasser Chehimi^{1,2,3,*}, Vanessa Tavares Almeida^{1,3}, Amom Mendes Nascimento^{1,3,4},
Évelin Aline Zanardo^{1,3}, Yanca Gasparini de Oliveira^{1,3}, Gleyson Francisco da Silva Carvalho^{1,3},
Beatriz Martins Wolff^{1,3}, Marília Moreira Montenegro^{1,3}, Nilson Antônio de Assunção^{1,3,4},
Chong Ae Kim^{1,3}, Leslie Domenici Kulikowski^{1,3}

¹Laboratório de Citogenética, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brazil

²Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto de Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil

³Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁴Departamento de Química, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacológicas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- The authors described three novel rearrangements between chromosomes 5 and 2, 5 and 18, and 5 and Y with chromosomal breakpoints and overlapped phenotypes that were not previously described.
- One of the main atypical features for 5p- syndrome that the authors report was the presence of straws that was found in the three patients with rearrangements between different chromosomes and in a patient with a deletion followed by duplication in 5p.
- The authors suggest physicians conduct further molecular investigation in the presence of atypical clinical features for patients with 5p- syndrome suspicion.

ARTICLE INFO

Keywords:
Genomic rearrangements
Microarray
5p deletion
Copy number variation

ABSTRACT

Objective: Copy Number Variations (CNVs) in the human genome account for common population variations but can also be responsible for genetic syndromes depending on the affected region. Although a deletion in 5p is responsible for a syndrome with highly recognizable phenotypical features, other chromosomal abnormalities might overlap phenotypes, especially considering that most studies in 5p use traditional cytogenetic techniques and not molecular techniques.

Method: The authors have investigated 29 patients with clinical suspicion of 5p- syndrome using Chromosomal Microarray (CMA), and have gathered information on previous tests, clinical signs, symptoms, and development of the patients.

Results: The results showed 23 pure terminal deletions, one interstitial deletion, one deletion followed by a 3 Mb duplication in 5p, three cases of 5p deletion concomitant to duplication larger than 20 Mb in chromosomes 2, 9, and 18, and one 5p deletion with a chromosome Y deletion. CMA showed relevant CNVs not typically associated with 5p- that may have contributed to the final phenotype in these patients.

Conclusion: The authors have identified three novel rearrangements between chromosomes 5 and 2 (Patient 27), 5 and 18 (Patient 11), and 5 and Y (Patient 22), with breakpoints and overlapped phenotypes that were not previously described. The authors also highlight the need for further molecular investigation using CMA, in different chromosomes beyond chromosome 5 (since those cases did not show only the typical deletion expected for the 5p- syndrome) to explain discordant chromosomal features and overlapped phenotypes to unravel the cause of the syndrome in atypical cases.

* Corresponding author.

E-mail address: schehinar@gmail.com (S.N. Chehimi).

<https://doi.org/10.1016/j.clinic.2022.100045>

Received 13 July 2021; Accepted 26 January 2022

1807-5032/© 2022 HCFMUSP. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)