

HALINNA DORNELLES WAWRUK

Caracterização de rearranjos cromossômicos e sua relação
com quadros clínicos

*Characterization of chromosomal rearrangements and its
relationship with clinical conditions.*

Brasília, 2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

HALINNA DORNELLES WAWRUK

CARACTERIZAÇÃO DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS E SUA RELAÇÃO
COM QUADROS CLÍNICOS

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Orientador: Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília
2019

HALINNA DORNELLES WAWRUK

**CARACTERIZAÇÃO DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS E SUA RELAÇÃO
COM QUADROS CLÍNICOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 07 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo (Presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Profa. Dra. Angela Maria Vianna-Morgante
Universidade de São Paulo – USP

Dra. Mara Santos Córdoba
Universidade de Brasília – UnB

Dr. Rolando André Rios Villacis
Universidade de Brasília – UnB

Dr. Sidney Alcântara Pereira (Suplente)
Universidade de Brasília - UnB

Dedico este trabalho à minha família, amigos e colegas de profissão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado essa oportunidade e por ter se mantido ao meu lado até agora.

Agradeço à minha orientadora Dra. Juliana Mazzeu por ter confiado em mim desde a época da minha graduação e por ter acreditado sempre no meu potencial.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Genética da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília por terem colaborado comigo, em especial à Érica e Aluísio pela ajuda com experimentos, Dra. Mara Santos, Dra. Beatriz Ribeiro Versiani, Dra. Íris Ferrari pelo aprendizado constante.

Agradeço ao Dr. Niels Tommerup pela oportunidade e permitir minha visita ao seu laboratório na University of Copenhagen, na Dinamarca e, agradeço imensamente a Dra. Mana Mehjoury, Dra. Lusine Nazaryan e Dr. Mads Bak por tudo que, gentil e pacientemente me ensinaram.

Agradeço à Dra. Angela Morgante e à Mara Pinheiro pela oportunidade e auxílio durante minha visita ao laboratório na Universidade de São Paulo (USP-SP).

Agradeço à minha família, meu marido Leonardo e minha filha Aurora por alegrarem todos os meus dias e serem pacientes e compreensíveis durante todo esse período. Aos meus pais, agradeço a minha vida e todo o esforço que fizeram para que eu tivesse sempre a melhor educação.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo apoio financeiro referente à Visita Técnica para Universidade de Copenhagen, Dinamarca.

Agradeço à Universidade de Brasília, a Faculdade de Medicina, o Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por toda assistência e estrutura.

“Educação é uma descoberta progressiva de nossa própria ignorância”

(Voltaire)

RESUMO

Rearranjos cromossômicos estruturais são causados a partir da formação de quebras de dupla fita (*DSB*). As *DSBs* juntamente com o mecanismo de reparo envolvido, são responsáveis pelo surgimento de diferentes rearranjos cromossômicos estruturais, como deleções, duplicações, inserções, translocações e inversões. Esses rearranjos mesmo quando equilibrados, como no caso de translocações e inversões, podem causar quadros clínicos nos indivíduos portadores. É possível caracterizar e diagnosticar a causa de seu fenótipo por meio da análise da região do ponto de quebra associado à formação do rearranjo. O uso de técnicas de citogenética e moleculares, principalmente o cariótipo (Bandamento G e C), a análise por microarranjo (CMA), a hibridação *in situ* fluorescente (*FISH*) e o sequenciamento de nova geração *mate-pair* (NGS-*mate-pair*) são algumas das técnicas utilizadas para a identificação de rearranjos estruturais, sendo o NGS-*mate-pair* o mais adequado à pesquisa pela região do ponto de quebra de rearranjos equilibrados. O objetivo deste projeto foi caracterizar rearranjos cromossômicos estruturais aparentemente equilibrados identificados ao cariótipo, e sua relação com o fenótipo dos portadores, utilizando para isso diversas técnicas de citogenética clássica e molecular. Foram selecionados 10 pacientes atendidos no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB) que apresentavam rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados.. Foram realizadas técnicas como bandamento G e C, CMA, *FISH* e NGS-*mate-pair*. Cada caso foi caracterizado individualmente, correlacionando-se o rearranjo com o quadro clínico do paciente. O paciente 1, selecionado como portador de inversão, apresentava uma duplicação invertida em mosaico que incluía 90 genes. O paciente 2 era portador do rearranjo 46,XY,inv(7)(p13;q36), herdado do pai afetado, e apresentava uma deleção na região 7p14.1-p12.3 (4,8 Mb) onde está mapeado o gene *GLI3* que causa a síndrome de Greig. A paciente 3, apresentava o rearranjo equilibrado 46,XX,t(2;9)(p25;q13) e tinha deficiência intelectual moderada. O ponto de quebra presente no cromossomo 2 interrompia o gene *LINC00299*, gene candidato ao quadro clínico. O paciente 4, apresentava o rearranjo equilibrado 46,XY,t(2;11)(q14.2;q12.1), cujo ponto de quebra no cromossomo 2, interrompia o gene *PTPN4*, relacionando-se este gene com o quadro clínico de deficiência intelectual e atraso psicomotor e cognitivo. As paciente 5 e 6 eram gêmeas monozigóticas e apresentavam o rearranjo equilibrado 46,XX,t(3;12)(q26.31;q14.3),

no ponto de quebra do cromossomo 12, havia a interrupção de *HMGA2*, e o quadro clínico de baixa estatura e macrocrania, similar à síndrome Silver-Russell, pôde ser relacionado a esse rearranjo. As gêmeas monozigóticas 7 e 8 apresentavam o rearranjo equilibrado 46,XX,t(9;20)(q21.12;q11.23) e o quadro clínico de transtorno do espectro autista. Na região do ponto de quebra do cromossomo 20, havia a interrupção do gene *DLGAP4*, proposto como causa do quadro clínico de transtorno do espectro autista. A paciente 9 era portadora da translocação equilibrada 46,XX,t(2;19)(q31;q13.1) e apresentava baixa estatura e deficiência intelectual. Não foi possível realizar o NGS mate-pair para caracterização do ponto de quebra. O paciente 10, apresentava o rearranjo complexo 46,XY,del(18)(p11.32-p11.31)/del(18p11.2)mos e seu quadro clínico de deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento, além de dismorfias craniofaciais e nas mãos, relacionava-se com a síndrome de 18p. Em todos os casos em que o estudo foi concluído foi possível identificar genes candidatos ao quadro clínico. Assim, demonstramos que o emprego de métodos de citogenética clássica e molecular associados ao sequenciamento de nova geração constituem uma importante estratégia para investigação da etiologia dos quadros clínicos em portadores de rearranjos cromossômicos.

Palavras-chave: rearranjos cromossômicos estruturais, translocações equilibradas, CMA, microarranjo, NGS, *mate-pair*, *FISH*, gene candidato, ponto de quebra.

ABSTRACT

Structural chromosome rearrangements are caused by the formation of double-strand breaks (DSB) in DNA. The DSBs, together with the repair mechanism involved, are responsible for the emergence of different structural chromosome rearrangements, such as deletions, duplications, insertions, translocations and inversions. These rearrangements even when balanced, like translocations and inversions, can cause important and diverse clinical phenotype in the affected individuals. It is possible to characterize and diagnose the cause of its phenotype by analyzing the region of the breakpoints formed in each rearrangement. The use of cytogenetic and molecular techniques, especially karyotype (G and C banding), microarray analysis (CMA), fluorescent in situ hybridization (FISH) and new generation sequencing mate-pair (NGS-mate-pair) are some of the techniques used for the identification of structural rearrangements, the NGS-mate-pair being the most suitable for the analysis of the breakpoint region of balanced rearrangements. The aim of this project was to characterize apparently balanced structural chromosome rearrangements, based of karyotype analysis, and its relation with the phenotype of the carriers, using several classical and molecular cytogenetic techniques. We have selected 10 patients from the Genetic Outpatient Clinic of the University Hospital of Brasília (HUB-UnB) who showed apparently balanced chromosome rearrangements, such as translocations or inversions in several genes. Each DNA sample was examined using techniques such as G/C-banding, CMA, FISH and NGS-mate-pair. Each case was individually characterized, correlating the rearrangement with the patient's clinical phenotype. Patient 1, selected as carrier of an inversion, had an inverted duplication in mosaic that included 90 genes. Patient 2 carried the rearrangement 46,XY,inv(7)(p13;q36), inherited from the affected parent, and has a deletion in the 7p14.1-p12.3 (4.8 Mb) region, where the gene *GLI3* is mapped; this gene is responsible for the manifestation of the Greig syndrome. Patient 3 presented the balanced rearrangement 46,XX,t(2;9)(p25; q13) and had moderate intellectual disability. The breakpoint present on chromosome 2 revealed the disruption of *LINC00299*, gene candidate for the clinical phenotype. Patient 4 presented the balanced rearrangement 46,XY,t(2;11)(q14.2; q12.1), whose breaking point on chromosome 2 interrupts the *PTPN4* gene, relating this gene to the clinical phenotype of intellectual disability, psychomotor and cognitive retardation. Patients 5 and 6 were monozygotic twins and presented the balanced

rearrangement 46,XX,t(3;12)(q26.31;q14.3), at the breaking point of chromosome 12, there is the interruption of HMGA2, and the frame clinical findings of short stature and macrocrania, similar to the Silver-Russell syndrome, may be related to this rearrangement. The monozygotic twins 7 and 8 presented the balanced rearrangement 46,XX,t(9;20)(q21.12;q11.23) and the clinical phenotype of autism spectrum disorder. In the breakpoint region of chromosome 20, there was a disruption of the DLGAP4 gene, the first time related to the clinical phenotype of autism spectrum disorder. Patient 9 carried the balanced translocation 46,XX,t(2;19)(q31;q13.1) and presented with short stature and intellectual disability. Patient 10 presented the complex rearrangement 46,XY,del(18)(p11.32-p11.31)/del(18p11.2)mos and its clinical phenotype of intellectual disability and developmental delay, as well as craniofacial and limbs dysmorphism is related to the syndrome of 18p. In all cases where the study was concluded it was possible to identify candidate genes for the clinical phenotype. In this study, we have demonstrated that the use of classical and molecular cytogenetic methods associated with the new generation sequencing constitute an important strategy for investigating the etiology of clinical conditions in patients with chromosomal rearrangements.

Keywords: structural chromosomal rearrangements, balanced translocations, CMA, microarray, NGS, mate-pair, FISH, candidate gene, breakpoint.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação de algumas anormalidades cromossômicas estruturais mais comuns. Os raios vermelhos indicam a região da quebra de dupla fita do DNA..... 29
- Figura 2.** Esquema simplificado da formação de *DSBs* durante a meiose em leveduras. Primeiramente, a proteína SPO11, que tem atividade relacionada à topoisomerase II, catalisa a formação de *DSBs* durante a prófase I e fica ligada covalentemente às extremidades separadas. Logo em seguida, SPO11 é liberada através da ação de endonuclease de um complexo protéico (MRX/N), seguida pela remoção 5'-3' em direção às *DSBs* pela ação de Exo1. As fitas simples de DNA resultantes identificam e invadem um DNA duplex homólogo por meio da ação das proteínas Dmc1 e Rad51. O reparo das *DSBs* ocorre via recombinação homóloga (HR), gerando tanto o DNA recombinado como o não-recombinado..... 30
- Figura 3.** Esquema que representa a via e reparo por *NHEJ*. 1) uma *DSB* é reconhecida pelo heterodímero Ku70/80, que provavelmente tem a função de evitar a degradação do DNA, além de sinalizar o DNA para as DNA-PKcs. Em seguida. 2) as duas extremidades de DNA ficam próximas. 3) as DNA-PKcs e a proteína Artemis são fosforiladas e as extremidades do DNA são processadas por um complexo protéico de XLF, XRCC4 e DNA ligase IV. 4) As extremidades soltas de DNA são religadas pela DNA ligase IV e pelos fatores de reparo de DNA..... 32
- Figura 4.** Processamento das extremidades de *DSBs* durante o mecanismo *NHEJ*. Em (A), as extremidades 3' da *DSB* está com a hidroxila defeituosa (sinal *), e dessa forma, impedindo a ligação das extremidades. Essas extremidades 3' são corrigidas via proteína quinase e associados. Em (B), as extremidades não podem ser ligadas porque há uma região de DNA impedindo. Por meio da proteína Artemis, esses nucleotídeos são eliminados (setas com ponta preta e branca) e as extremidades agora podem ser reunidas. Em (C), ocorre o contrário de (B), pois aqui há a correto reconhecimento das extremidades 3', mas há um espaço vazio que precisa ser completado (linha

tracejada) para que a *DSB* esteja completamente restaurada..... 33

Figura 5. Esquema que representa a formação de rearranjos cromossômicos por meio da via *NAHR*. A) Recombinação ectópica entre *LCRs* na mesma orientação trans, pode originar deleção e duplicação recíproca, enquanto que recombinação ectópica entre *LCRs* inversamente orientadas em cis podem resultar em uma inversão. (B) *NAHR* pode produzir deleções e duplicações de três diferentes formas: recombinação intercromossômica, intracromossômica ou intracromátides (nesse caso, somente deleções). *NAHR* entre *LCRs* invertidas em cromátides irmãs podem também resultar na formação de um isocromossomo..... 34

Figura 6. Esquema representando o mecanismo de enrolamento de forquilha de replicação com mudança de fita molde (*FoSTeS*). Em (i) A fita simples de replicação *lagging* pode ter sua forquilha de replicação parada. (ii) Quando isso acontece, a extremidade 3' se torna livre da sua sequência original e (iii) pode então se alinhar com outra sequência de fita simples em outra forquilha de replicação com a qual compartilhe microhomologia, (d) podendo causar deleções, inversões ou translocações dependendo da posição relativa da outra forquilha de replicação..... 35

Figura 7. Esquema representando o mecanismo de *MMBIR*. Esse mecanismo começa quando (i) uma forquilha de replicação para quando encontra uma falha da fita ou pode ser causado ainda por uma endonuclease. (ii) a extremidade 5' da molécula com a quebra (vermelha) sofre ressecção expondo a extremidade 3'. (iii) essa extremidade então se anela a qualquer DNA fita simples exposto com o qual compartilhe microhomologia, em qualquer forquilha de replicação repetidas vezes (iv, v, vi, vii, viii) até que, como resultado, seja construída uma sequência com diversos segmentos genômicos diferentes (ix)..... 36

Figura 8. Esquema que apresenta efeitos da presença de uma inversão ao nível do DNA. Na figura os genes estão representados pelas letras A-D. A letra P representa a região promotora do gene, as setas representam os pontos de quebra no DNA. Como é possível ver, uma inversão pode ter seu ponto de quebra em região não-codificante, ter um ponto de quebra dentro de um gene,

fazendo com que ele seja interrompido posteriormente e, ainda, ter ponto de quebra entre dois genes, podendo ocasionar a criação de uma fusão gênica..... 38

Figura 9. Esquema que mostra as consequências funcionais de uma translocação equilibrada. Na parte superior: formação de um gene híbrido que leva à formação de uma proteína quimérica. Na parte inferior: formação de um gene híbrido que leva à desregulação da expressão de um gene adjacente ao ponto de quebra. Setas vermelhas: pontos de quebra..... 39

Figura 10. Esquema que representa o mecanismo da técnica *FISH*. O primeiro passo (1) é desenhar sondas específicas para a região que se quer analisar. Feito isso, o DNA passa por várias etapas para que sejam despareadas as duplas fitas a fim de permitir que a sonda se ligue na região designada (2). Após um processo de lavagem, observa-se ao microscópio de fluorescência a presença ou não da região avaliada (3)..... 43

Figura 11. Esquema que descreve a técnica de Microarranjo *one channel*. Primeiro, o DNA-teste é tratado e recebe uma marcação com fluorocromo (verde, no caso). Depois ele é hibridizado ao chip que contém milhares de sondas complementares a pedaços de todo o genoma humano. A intensidade do sinal é medida em cada ponto e o resultado é mostrado em um programa específico..... 44

Figura 12. Esquema que representa o princípio do método de sequenciamento do tipo *mate-pair (MP)*. Primeiramente, o genoma teste é fragmentado e somente os insertos de 5 kb são selecionados. Esses insertos são então marcados por biotina em ambas suas extremidades. Os insertos são circularizados, de forma a conectar ambas as extremidades. Os fragmentos passam novamente por uma digestão e fragmentam em sequências de 300-500 pb, purificados (com uso de *beads* magnéticos ou outros) e depois são ligados a adaptadores específicos (A1 e A2). Sequências de 100 pb são sequenciadas dos dois lados e depois, realinhados em comparação de um genoma de referência para determinar a localização de cada fragmento *paired-end*..... 46

Figura 13. Desenho que mostra as possíveis imagens referentes ao resultado de um sequenciamento do tipo *mate-pair (MP)* quando alinhado a um genoma

de referencia. A) quando o mapeamento é normal, a distância entre os adaptadores dos *reads* é igual ao inserto, e na orientação correta, indicando que não há variação estrutural na região. B) deleção, quando a distância entre os adaptadores dos *reads* é maior no genoma referencia. C) inversão, quando a distância entre os adaptadores dos *reads* é igual ao genoma referencia, mas o sentido dos *reads* é contrária e no mesmo cromossomo. D) duplicação ou inserção, quando a distância entre os adaptadores dos *reads* é menor no genoma referencia. E) translocação, quando um dos *reads* do par é localizado em um cromossomo e o outro *read* em outro cromossomo não-homólogo..... 47

Figura 14. Esquema representando o *workflow* do método de sequenciamento *mate-pair*, feito em colaboração com a Universidade de Copenhagen (Dinamarca)..... 55

Figura 15. Esquema ilustrativo de análise de *reads* discordantes a partir do sequenciamento *mate-pair* acima. Abaixo, a representação de dois cromossomos derivativos resultantes de uma translocação entre os cromossomos 9 e 20, com os pontos de quebra identificados pelos *reads* discordantes nas regiões 9q21.12 e 20q11.23. Observe que os *reads* azuis em der 9 (fita negativa), são pareados com os *reads* rosas encontrados em der 20 (fita positiva). Da mesma forma, os *reads* em azul encontrados em der 20 (fita negativa), são pareados com os *reads* em rosa encontrados no der 9 (fita positiva). O ponto de quebra é identificado quando mais de três *reads* discordantes são encontrados em determinada região – 9q12.21 e 20q11.23 – e são visualizados exatamente entre os *reads* que estão mais próximos no resultado e que estão em fitas diferentes no DNA..... 58

Figura 16. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 1. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de duplicação no cromossomo 17, como segue: 17q24.2-17q25.3 (64,312,801-75,884,602 bp, hg19). b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da duplicação as sondas correspondentes aparecem em maior quantidade do que o normal. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na

região da duplicação há três cópias para essa região de sondas. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região de duplicação há uma quarta linha nessa região. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 62

Figura 17. Resultado da análise de FISH em metáfases do paciente 1. Foram analisadas diversas metáfases. Na imagem à esquerda, é possível identificar a presença de ambas as sondas RP11-4F22 (vermelho) e RP11-155C2 (verde) nos cromossomos 17, representadas pelas setas mais grossas. Também é possível identificar a sonda verde inserida em outro cromossomo do grupo C, possivelmente um 6 ou 7 (seta mais fina). A imagem à direita mostra o resultado do FISH com as mesmas sondas em uma amostra controle. As sondas estão localizadas em ambos os cromossomos 17 (setas) e a distância entre elas é similar à distância mostrada no cromossomo 17 do paciente na imagem à esquerda (seta vertical). Já o outro cromossomo 17 do paciente (seta diagonal) mostra as duas sondas muito mais próximas, sugerindo que neste existe uma inversão na região. Esquema abaixo representa a posição e marcação das sondas RP11-4F22 (vermelha) e RP11-155C2 (verde) no cromossomo 17 humano..... 63

Figura 18. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 2. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de deleção na região do braço curto do cromossomo 7p14.1-p12.3 (40,607,731-45,408,798 bp, hg19), que inclui o gene GLI3, responsável pelo quadro clínico apresentado. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da deleção as sondas correspondentes aparecem em menor quantidade do que o normal. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na região da deleção há uma cópia para essa região de sondas. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região da deleção há apenas duas linhas. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 69

Figura 19. Translocação apresentada na paciente 3 (A) e no seu filho (B). A) Cariótipo e representação diagramática da translocação equilibrada entre os cromossomos 2 e 9 identificada no DNA da paciente 3. B) Cariótipo e representação diagramática de um cromossomo derivativo extranumerário – marcador – encontrado no filho..... 74

Figura 20. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 3, a qual apresenta uma translocação equilibrada entre os cromossomos 2 e 9. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 2 e 9 da paciente 3. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 75

Figura 21. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do filho da paciente 3. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de duplicação no cromossomo 2 e 9, como segue: 2p25.3p25.1 (12,770-8,187,008)x3 (hg19) e 9p24.3q13 (208,454-68,358,120)x3 (hg19). b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da duplicação no cromossomo 2, as sondas correspondentes aparecem em maior quantidade do que o normal. Note-se também, que na região da duplicação no cromossomo 9, as sondas também aparecem em maior quantidade que o normal, mas nesse caso, não podemos saber exatamente onde termina essa duplicação pois envolve o braço curto e parte de uma região centromérica e/ou de heterocromatina, que apresenta sequencias de DNA repetitivo. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na região da duplicação há três cópias para essa região de sondas em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presentes. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP

(genotipagem). Note-se que na região de duplicação há uma quarta linha nessa região. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 76

Figura 22. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 3 (em rosa) em comparação com o resultado do filho da paciente 3 (em azul), mostrando o ponto de quebra no cromossomo 2p25.3p25.1 (12,770-8,187,008 bp, hg 19)x3 no microarranjo do filho, que atinge a região entre os dois últimos éxons do gene LINC00299..... 77

Figura 23. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 3 (em rosa) em comparação com o resultado do filho da paciente 3 (em azul), mostrando o ponto de quebra no cromossomo 9p24.3q13 (208,454-68,358,120, hg 19)x3 no microarranjo do seu filho, que atinge o braço curto e parte da região centromérica e/ou heterocromatina, não especificada por se tratar de uma região de sequencias repetitivas de DNA..... 78

Figura 24. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 4. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 2 e 9 do paciente 4. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose (LOH). Nota-se dois blocos de ausência de heterozigose no cromossomo 2 do paciente 4, muito provavelmente devido à consanguinidade dos seus genitores. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos, exceto nas regiões de LOH, em que está ausente o genótipo heterozigoto. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 84

Figura 25. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 2 (chr2:119,874,759-119,874,835 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra do paciente 4. As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo

programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde representa uma translocação entre os cromossomos 2 (detalhe) e 11. No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *PTPN4* na região do ponto de quebra..... 86

Figura 26. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 11 (chr11:57,242,420-57,243,202 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presente na amostra do paciente 4. As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde representa uma translocação entre os cromossomos 2 e 11 (detalhe)..... 87

Figura 27. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 5, irmã gêmea monozigótica da paciente 6. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 3 e 12 da paciente 5. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presentes. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 93

Figura 28. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 3 (chr3:174,961,172-174,963,250 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 5 e 6 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 5, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 6 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os

cromossomos 3 (detalhe) e 12. No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *NAALADL2* na região de quebra..... 95

Figura 29. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 12 (chr12:65,851,728-65,851,528 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 5 e 6 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 5, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 6 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os cromossomos 3 e 12 (detalhe). No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *HMGA2* na região de quebra..... 96

Figura 30. Cariótipo referente a paciente 7, mostrando a translocação entre os cromossomos 9 e 20. Cortesia do Hospital Sarah Kubitschek..... 102

Figura 31. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 7. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 9 e 20 da paciente 7. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose (LOH). Nota-se dois blocos de ausência de heterozigose no cromossomo 9 da paciente 7, muito provavelmente devido à consanguinidade dos seus genitores. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos, exceto nas regiões de LOH, em que está ausente o genótipo heterozigoto para o cromossomo 9. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 103

Figura 32. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 8. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas

nos cromossomos 9 e 20 da paciente 8. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose (LOH). Nota-se dois blocos de ausência de heterozigose no cromossomo 9 da paciente 8, muito provavelmente devido à consanguinidade dos seus genitores. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos, exceto nas regiões de LOH, em que está ausente o genótipo heterozigoto para o cromossomo 9. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 104

Figura 33. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 9 (chr9:70,379,607-70,379,994 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 7 e 8 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 7, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 8 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os cromossomos 9 (detalhe) e 20. No detalhe é possível ver que não há genes envolvidos nessa região..... 106

Figura 34. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 20 (chr20:36,440,488-36,440,653 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 7 e 8 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 7, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 8 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os cromossomos 9 e 20 (detalhe). No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *DLGAP4* na região da quebra..... 107

Figura 35. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 9. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 2 e 19 da paciente 9. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presentes. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 113

Figura 36. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 10. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de deleção na região do braço curto do cromossomo 18, como segue: 18p11.32p11.31 x1 (5,136,226-5,613,346 bp, hg19) e 18p11.2 x1mos (5,613,346-12,300,136 bp, hg19). b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da deleção, as sondas mais distais em 18p estão marcando quantidade correspondente à deleção total e as sondas seguintes na região de deleção em 18p aparecem em menor quantidade que o normal, mas em maior quantidade que às anteriores, sugerindo uma deleção em mosaico desse segmentos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na região da deleção há uma cópia para essa região de sondas. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região da deleção há apenas duas linhas. f) faixa de genes descritos na região em hg19..... 117

Figura 37. Resultado da análise de FISH nas metáfases do paciente 10. Na imagem à esquerda as setas mostram as sondas presentes nos cromossomos 18 do paciente. Nessa metáfase, a sonda RP11-36J15 (verde) está presente em ambos os cromossomos e a sonda RP11-92G19 (vermelha) está presente somente em um, ou seja, ela está deletada. Na imagem à direita, é possível ver somente o sinal verde em apenas um cromossomo 18, evidenciando nessa

metáfase a condição de mosaico dessa região cromossômica e, novamente somente um sinal vermelho, confirmando a deleção dessa região em um dos cromossomos 18. O esquema abaixo representa a posição e marcação das sondas RP11-92G19 (vermelha) e RP11-36J15 (verde) no cromossomo 18 humano.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sondas utilizadas na técnica de hibridação in situ fluorescente (FISH) realizada neste estudo. As sondas foram clonadas em BAC e pertencem ao <i>Sanger Institute</i> e foram clonadas e cedidas pela Dra. Carla Rosenberg.....	53
Tabela 2. Comparação de características clínicas encontradas entre os dois casos de alteração em PTPN4 já relatados na literatura com os achados no paciente 4.....	90

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1. O DNA E AS ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS EM GERAL.....	28
1.2. QUEBRAS DE DUPLA FITA NO DNA E MECANISMOS DE REPARO FORMADORES DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS ESTRUTURAIS.....	29
1.3. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS EQUILIBRADOS E DOENÇAS GENÉTICAS.....	36
1.4. TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS APARENTEMENTE EQUILIBRADOS.....	41
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	49
2.1. OBJETIVO.....	50
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
CAPÍTULO 3. PACIENTES E MÉTODOS.....	51
3.1. PACIENTES.....	52
3.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	52
3.2. CARIÓTIPO.....	52
3.3. ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO (CMA).....	52
3.4. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (<i>FISH</i>).....	53
3.5. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO <i>MATE-PAIR</i>	54
CAPÍTULO 4. CASO 1.....	59
4.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	60
4.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	60
4.3. RESULTADO DO EXAME DE <i>FISH</i>	63
4.4. DISCUSSÃO.....	64
4.5. CONCLUSÕES.....	65
CAPÍTULO 5. CASO 2.....	66
5.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	67
5.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	68
5.3. DISCUSSÃO.....	70
5.4. CONCLUSÕES.....	71

CAPÍTULO 6. CASO 3.....	72
6.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	73
6.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	74
6.3. DISCUSSÃO.....	79
6.4. CONCLUSÕES.....	80
CAPÍTULO 7. CASO 4.....	81
7.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	82
7.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	82
7.3. RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO <i>MATE-PAIR</i>	85
7.4. DISCUSSÃO.....	88
7.5. CONCLUSÕES.....	90
CAPÍTULO 8. CASOS 5 E 6.....	91
8.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	92
8.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	92
8.3. RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO <i>MATE-PAIR</i>	94
8.4. DISCUSSÃO.....	97
8.5. CONCLUSÕES.....	99
CAPÍTULO 9. CASOS 7 E 8.....	100
9.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	101
9.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	101
9.3. RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO <i>MATE-PAIR</i>	105
9.4. DISCUSSÃO.....	108
9.5. CONCLUSÕES.....	109
CAPÍTULO 10. CASO 9.....	111
10.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	112
10.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	112
CAPÍTULO 11. CASO 10.....	114
11.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	115

11.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.....	116
11.3. RESULTADO DO EXAME DE <i>FISH</i>	118
11.4. DISCUSSÃO.....	119
11.5. CONCLUSÕES.....	120
CAPÍTULO 12. CONCLUSÃO.....	121
12.1. CONCLUSÃO.....	122
CAPÍTULO 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
13.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
CAPÍTULO 14. ANEXOS.....	142
14.1. ANEXO I.....	143

Capítulo 1.
INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. O DNA E AS ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS EM GERAL

As anormalidades cromossômicas são resultado de alterações na estrutura ou no número usual de cromossomos de um indivíduo, o que resulta em partes rearranjadas do cromossomo, número anormal de cromossomos individuais ou números anormais de conjuntos cromossômicos inteiros (1-2).

Muitas mutações cromossômicas acarretam problemas no funcionamento normal da célula e do organismo. Isso acontece porque as mutações cromossômicas podem resultar em número ou posição anormal de genes e ainda a quebra do cromossomo envolvido pode surgir no meio de uma sequência gênica, perturbando assim a sua transcrição e tradução em proteína, afetando sua função esperada (1-2).

Existem teoricamente infinitas maneiras em que cromossomos podem se reconfigurar e os principais tipos de alterações na estrutura dos cromossomos já descritos podem ser divididos em duas categorias: a) alterações em que a quantidade total de informação genética é alterada; e b) alterações em que a quantidade total de material genético continua a mesma, porém é rearranjada (3).

Dentro da primeira categoria estão a deleção ou perda de um segmento cromossômico (Figura 1); a duplicação, presença de duas cópias de uma região cromossômica específica (Fig. 1), os isocromossomos, cromossomos que possuem uma duplicação de um braço completo com ligação por um único centrômero e de forma espelhada e, necessariamente a deleção completa do outro braço, surgindo quando as duas cromátides filhas se separam na meiose através de uma divisão transversal e não longitudinal (Fig. 1); os cromossomos em anel, formados quando acontece a quebra de segmentos nas duas extremidades do cromossomo e, pela sua instabilidade, eles se reconectam formando uma estrutura circular apresentando centrômero (Fig. 1) e os cromossomos marcadores, definidos como cromossomos estruturalmente anormais formados por reordenamentos complexos e que não podem ser caracterizados pela citogenética convencional (Fig. 1).

Já na segunda categoria estão, por exemplo, a inversão, que acontece quando um segmento de um cromossomo sofre duas quebras no DNA, gira 180 graus e depois se reúne novamente ao cromossomo (Fig. 1); a translocação, que ocorre quando um segmento de um cromossomo, sofre uma quebra no DNA e troca de posição com um segmento de um outro cromossomo não-homólogo (Fig. 1) (2-4).

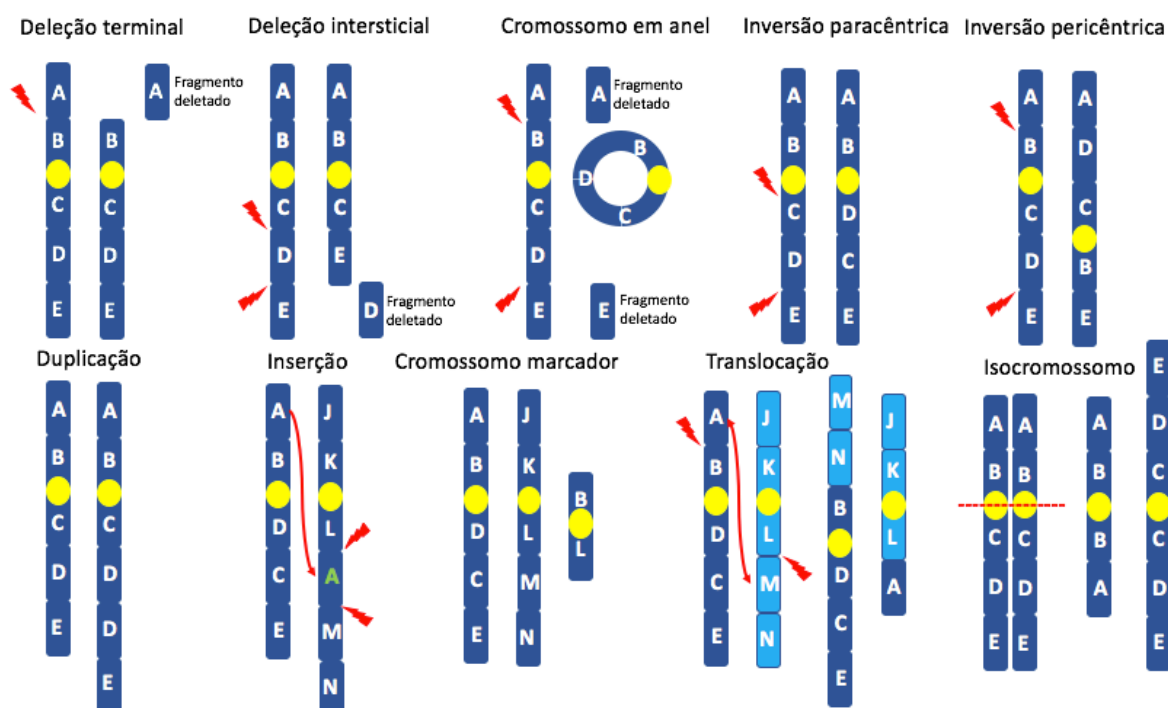


Figura 1. Representação de algumas anormalidades cromossômicas estruturais mais comuns. Os raios vermelhos indicam a região da quebra de dupla fita do DNA.

1.2. QUEBRAS DE DUPLA FITA NO DNA E MECANISMOS DE REPARO FORMADORES DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS ESTRUTURAIS.

A presença de quebras de dupla fita no DNA (*Double Strand Break - DSB*) e o seu consequente mecanismo de reparo são geradores de rearranjos estruturais e existem várias causas extrínsecas e intrínsecas que podem resultar na formação de uma *DSB*. As causas externas incluem substâncias mutagênicas e radiações ionizantes, principalmente raios-X e radiação Gama e luz ultravioleta (5).

Já intrinsecamente, a formação de *DSB* pode acontecer como resultado de alterações na estrutura do DNA ocasionadas pela presença de nucleases e produtos metabólicos, como as espécies reativas de oxigênio dentro das células. Além disso, as *DSBs* também ocorrem naturalmente durante a meiose das células germinativas e o reparo dessas *DSBs* é um evento necessário durante a recombinação homóloga, conhecido também como *crossing over*, o que contribui para a variabilidade na espécie (6-7).

Para explicar melhor, apresento como funciona a meiose em leveduras, já muito estudada e com similaridade evolutiva com outros organismos, incluindo os mamíferos. As *DSBs* surgem durante a etapa conhecida como prófase I pela ação da

proteína SPO11, que tem atividade relacionada a topoisomerase II. Essa proteína fica covalentemente conectada às extremidades 5' de cada fita de DNA separada e é liberada através da ação de uma endonuclease – Mre11 e/ou Sae2 – seguida de uma remoção no sentido 3'- 5' em direção à *DSB* pela atividade de exonuclease de Mre11 (8) (Figura 2). As extremidades de DNA são então removidas pela ação de exonuclease de Exo1 no sentido 5'- 3' afim de expor extremidades 3' de fita simples, então proteínas de troca de fita como Dmc1 e Rad51 se ligam nessas extremidades, formando filamentos nucleoprotéicos que catalisam a invasão do filamento simples para dentro de um DNA duplex (8) (Fig. 2).

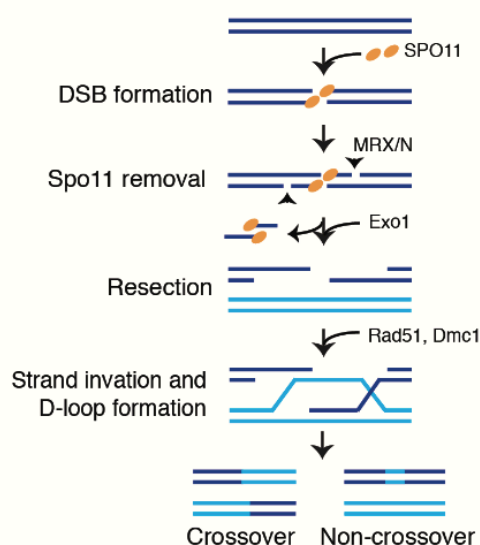


Figura 2. Esquema simplificado da formação de *DSBs* durante a meiose em leveduras. Primeiramente, a proteína SPO11, que tem atividade relacionada à topoisomerase II, catalisa a formação de *DSBs* durante a prófase I e fica ligada covalentemente às extremidades separadas. Logo em seguida, SPO11 é liberada através da ação de endonuclease de um complexo protéico (MRX/N), seguida pela remoção 5'-3' em direção às *DSBs* pela ação de Exo1. As fitas simples de DNA resultantes identificam e invadem um DNA duplex homólogo por meio da ação das proteínas Dmc1 e Rad51. O reparo das *DSBs* ocorre via recombinação homóloga (HR), gerando tanto o DNA recombinado como o não-recombinado. Figura adaptada de (9).

A depender do número de *DSB* ocorrendo simultaneamente e, além disso, do local onde acontecem, diferentes rearranjos cromossômicos podem surgir (Figura 3). Isso porque se *DSBs* surgirem em regiões de DNA repetitivo, como transposons ou DNAr, o risco de rearranjos cromossômicos serem formados é muito maior caso as *DSBs* sejam reparadas via recombinação homóloga não-alélica (*NAHR*), por exemplo (8-9) (Fig. 3) (Vide item I.3 desta Revisão Bibliográfica). Nas *DSBs* próximas a regiões centroméricas, o reparo causa um aumento na frequência de separação precoce das

cromátides irmãs durante a meiose I, o que pode resultar em casos de aneuploidia (8).

Além disso, quando duas *DSBs* coexistem no mesmo braço de um cromossomo, os possíveis rearranjos possíveis de aparecer são: deleção intersticial, se as extremidades do fragmento cromossômico entre os dois pontos de quebra forem reunidas formando um DNA circular que será perdido e as outras duas extremidades se reunirem; ou inversão paracêntrica, se o fragmento entre os dois pontos de quebra for invertido (10).

Se duas *DSBs* ocorrem ao mesmo tempo em diferentes braços de um mesmo cromossomo e são religados de maneira errônea, as consequências serão a possível formação de um cromossomo em anel, caso o fragmento contenha o centrômero, e a formação de um fragmento acêntrico que será perdido posteriormente (10). O resultado desse processo será uma deleção distal no cromossomo, longe dos pontos de quebra. Além dessa, pode ocorrer também a inversão pericêntrica do cromossomo (10).

Caso as duas *DSBs* surjam em dois cromossomos homólogos, deleções, duplicações e até mesmo translocações são possíveis de surgirem. Entretanto, se as *DSBs* estiverem em cromossomos não-homólogos dois possíveis resultados de reuniões errôneas podem acontecer: uma translocação equilibrada, se as extremidades das *DSBs* forem reunidas na orientação correta (centrômero-telômero), ou um fragmento dicêntrico instável quando não em orientação correta (10).

Os mecanismos formadores de rearranjos cromossômicos envolvendo *DSBs* podem ser classificados em não replicativos e replicativos (11) Dentro da primeira categoria estão a junção de extremidades não homólogas (*Non-homologous end joining – NHEJ*) e junção de extremidades mediada por microhomologia (*Microhomology-mediated end joining – MMEJ*).

Na segunda categoria têm-se a recombinação homóloga não alélica (*Non-allelic homologous recombination – NAHR*) (12), o anelamento de fita simples (*Single-strand annealing – SSA*) (9)(13) e reparo por homologia direta (*homology direct repair – HDR*) (14), replicação por deslizamento do DNA (*replication slippage*), bloqueio da forquilha de replicação com mudança de fita molde de DNA (*Fork stalling and template switching – FoSTeS*), replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (*Microhomology-mediated break-induced replication – MMBIR*) e retrotransposição (11)

De todos esses mecanismos supracitados os que mais acontecem são a *NHEJ*, *NAHR*, *FoSTeS* e *MMBIR*.

- **Junção de extremidades não homólogas**

A via *NHEJ* envolve várias proteínas cruciais, como o heterodímero Ku70/80 cujo papel é reconhecer e se ligar às extremidades soltas de DNA na região em que ocorreu a quebra, DNA-PKcs que são responsáveis por ativar a função quinase de Ku70/80, DNA ligase IV mais o cofator XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*), XLF (*XRCC4-like complex*) e a proteína Artemis, que têm o papel de reunir as extremidades soltas do DNA (15;16) (Figura 3). As extremidades soltas emparelham-se baseadas na homologia de poucos pares de bases e sua junção acontece depois que as fitas se tornam compatíveis, seja por meio da adição ou perda de alguns pares de base ou ainda, pela correção de nucleotídeos modificados por radiação ionizante, que não apresentam extremidades 5' e 3' ligáveis (5)(17) (Figura 4).

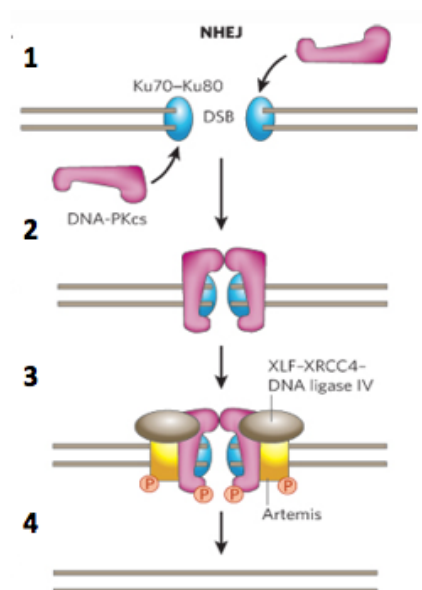


Figura 3. Esquema que representa a via e reparo por *NHEJ*. 1) uma *DSB* é reconhecida pelo heterodímero Ku70/80, que provavelmente tem a função de evitar a degradação do DNA, além de sinalizar o DNA para as DNA-PKcs. 2) as duas extremidades de DNA ficam próximas pela ação das DNA-PKcs. 3) as DNA-PKcs e a proteína Artemis são fosforiladas e as extremidades do DNA são processadas por um complexo protéico de XLF, XRCC4 e DNA ligase IV. 4) As extremidades soltas de DNA são religadas pela DNA ligase IV e pelos fatores de reparo de DNA. Figura adaptada de (15).

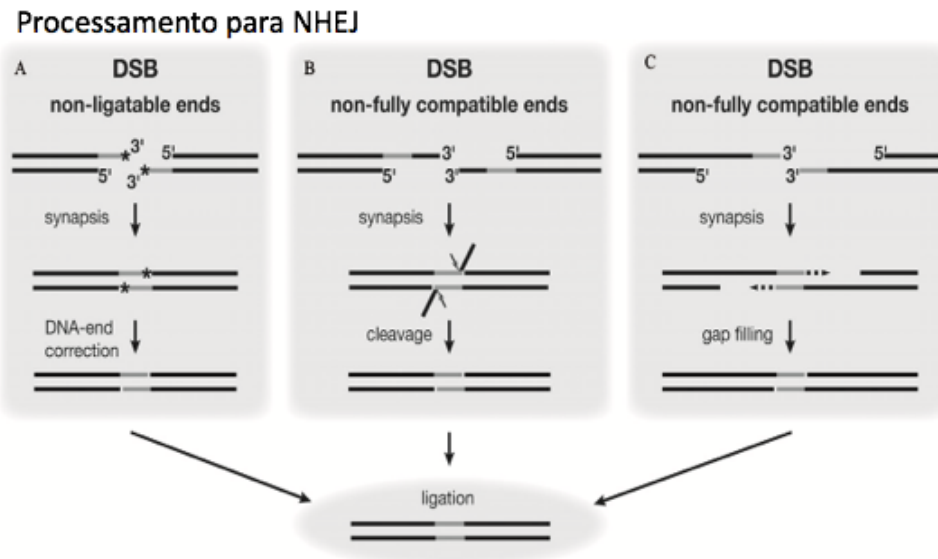


Figura 4. Processamento das extremidades de *DSBs* durante o mecanismo NHEJ. Em (A), as extremidades 3' da *DSB* está com a hidroxila defeituosa (sinal *), e dessa forma, impedindo a ligação das extremidades. Essas extremidades 3' são corrigidas via proteína quinase e associados. Em (B), as extremidades não podem ser ligadas porque há uma região de DNA impedindo. Por meio da proteína Artemis, esses nucleotídeos são eliminados (setas com ponta preta e branca) e as extremidades agora podem ser reunidas. Em (C), ocorre o contrário de (B), pois aqui há a correto reconhecimento das extremidades 3', mas há um espaço vazio que precisa ser completado (linha tracejada) para que a *DSB* esteja completamente restaurada. Figura adaptada de (5).

Esse processo não necessita de uma fita molde da cromátide irmã e é capaz de unir *DSBs* que não pertencem corretamente uma a outra, ou seja, *DSBs* não-contíguas. Sendo assim, é muito provável surgirem translocações e fusões teloméricas por meio dessa via de reparo (10).

- **Recombinação homóloga não alélica**

A *NAHR* é responsável pela formação de grande parte dos rearranjos cromossômicos não-equilibrados recorrentes. Essa via é um tipo de recombinação homóloga que acontece entre dois fragmentos de DNA que apresentam alta similaridade entre si, mas que não são alelos. Normalmente, a recombinação entre homólogos ocorre em um mesmo *locus* gênico entre os cromossomos homólogos e o resultado disso nada mais é do que a variabilidade genética. Entretanto, por causa da homologia de sequências repetitivas, um alinhamento imperfeito pode surgir entre as

cromátides, formando uma sequência recombinada desigual, resultando em rearranjos cromossômicos (18).

O DNA humano apresenta quase 50% do seu total de sequências repetitivas, ou seja, a via *NAHR* é passível de ocorrer com mais frequência no nosso DNA, deixando-nos vulneráveis ao surgimento desses tipos de rearranjos (7). Indivíduos heterozigotos para determinada região repetitiva no DNA ainda têm mais chances de apresentarem *DSBs* reparadas via *NAHR*, uma vez que, como não possuem a sequência homóloga para fazer parte da recombinação, sequências similares serão escolhidas, dando início ao reparo via *NAHR* (9).

Recombinações entre *low copy repeats* (*LCR*) em orientação direta podem resultar em deleções e duplicações, enquanto que em orientação invertida, podem gerar inversões (12). Se a recombinação ocorrer entre dois cromossomos não-homólogos, podem ser formadas translocações. Além desses isocromossomos também surgem se *LCRs* parálogas se localizarem em braços de cromátides-irmãs (Figura 5).

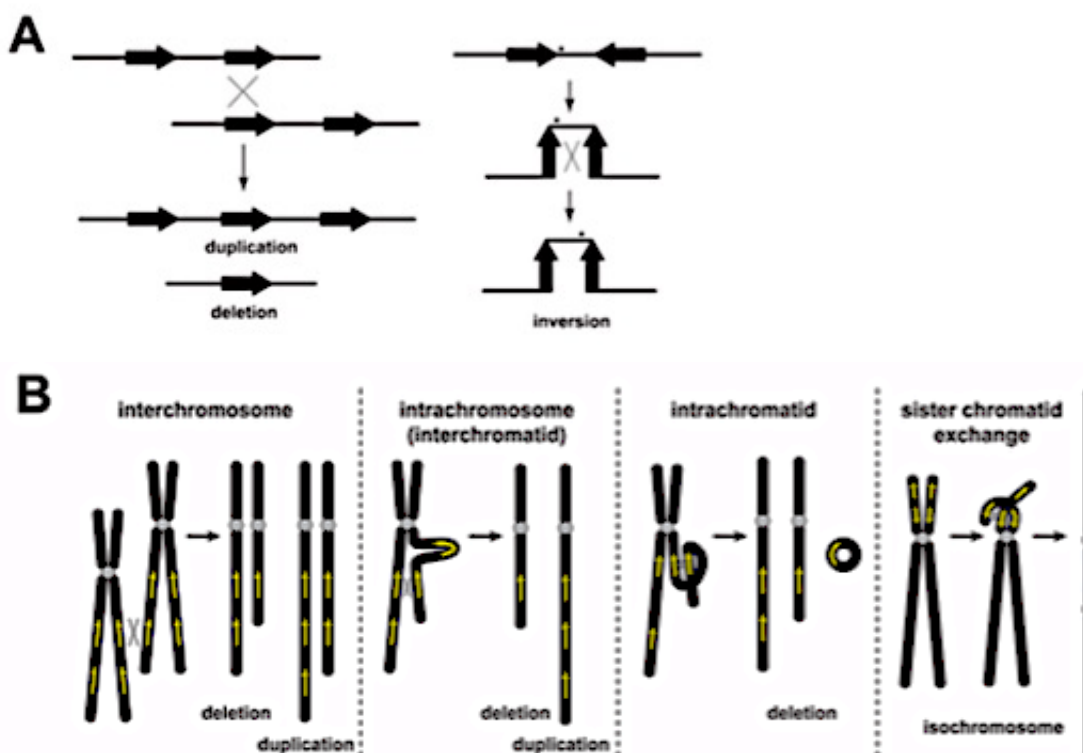


Figura 5. Esquema que representa a formação de rearranjos cromossômicos por meio da via *NAHR*. A) Recombinação ectópica entre *LCRs* na mesma orientação *trans*, pode originar deleção e duplicação recíproca, enquanto que recombinação ectópica entre *LCRs* inversamente orientadas em *cis* podem resultar em uma inversão. (B) *NAHR* pode produzir deleções e duplicações de três diferentes formas: recombinação intercromossômica, intracromossômica ou intracromátides (nesse caso, somente

deleções). *NAHR* entre *LCRs* invertidas em cromátides irmãs podem também resultar na formação de um isocromossomo. Figura adaptada de (12).

- **Bloqueio de forquilha de replicação e mudança de fita molde de DNA.**

O mecanismo de *FoSTeS* propõe que a mudança de fita molde não está restrita a uma única forquilha de replicação, mas poderia acontecer entre diferentes forquilhas. Isso aconteceria quando uma forquilha de replicação para em uma célula sob estresse – devido a presença de estruturas secundárias ou de lesões de fita única no DNA (19) – a extremidade 3' da fita descontínua de DNA pode se desprender da original e mudar de molde e se alinhar com outra extremidade exposta de fita simples de DNA presente em outra forquilha ativa com a qual apresente microhomologia e que esteja próxima fisicamente dela (11; 19) (Figura 6). Essa mudança de fita molde pode gerar rearranjos como deleções, duplicações, inversões e translocações, dependendo da posição relativa das forquilhas envolvidas no mecanismo (11).

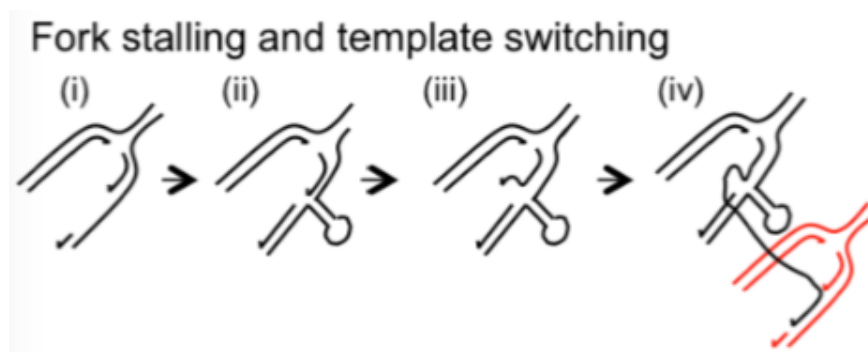


Figura 6. Esquema representando o mecanismo de enrolamento de forquilha de replicação com mudança de fita molde (*FoSTeS*). Em (i) A fita simples de replicação *lagging* pode ter sua forquilha de replicação parada. (ii) Quando isso acontece, a extremidade 3' se torna livre da sua sequência original e (iii) pode então se alinhar com outra sequência de fita simples em outra forquilha de replicação com a qual compartilhe microhomologia, (d) podendo causar deleções, inversões ou translocações dependendo da posição relativa da outra forquilha de replicação. Figura adaptada de (11).

- **Replicação induzida por quebra mediada por microhomologia**

O mecanismo *MMBIR* está associado a formação de CNVs e também de *LCRs* e é semelhante em alguns pontos com *FoSTeS* e deriva do mecanismo de replicação induzida por quebra (*Break-Induced Replication – BIR*) (20). Nesse mecanismo, primeiro há a formação de uma *DSB* ocorrida pelo encontro entre uma quebra de DNA fita simples com uma forquilha de replicação, dentro de uma célula com estresse (19). Dessa forma são geradas extremidades 3' de fita simples expostas, que vão se anelar

por microhomologia em qualquer DNA de fita simples que esteja nas redondezas daquela forquilha, acarretando a polimerização de baixa processividade com sucessivas trocas de fita molde (Figura 7), o que tem potencial de gerar rearranjos estruturais complexos e um, eventual reestabelecimento do processo replicativo normal (11; 20).

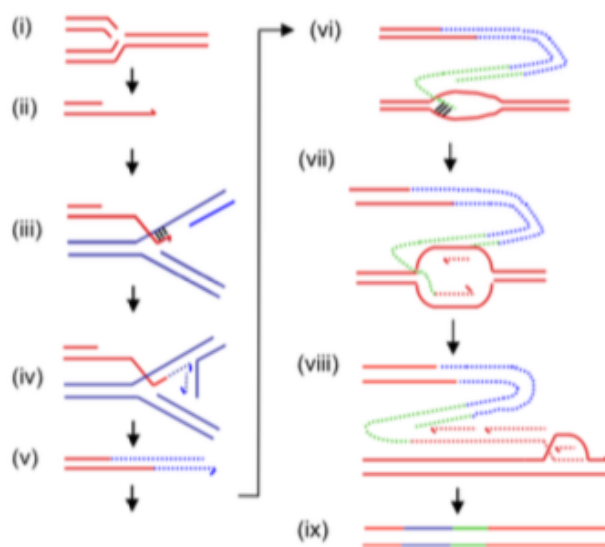


Figura 7. Esquema representando o mecanismo de *MMBIR*. Esse mecanismo começa quando (i) uma forquilha de replicação para quando encontra uma falha da fita ou pode ser causado ainda por uma endonuclease. (ii) a extremidade 5' da molécula com a quebra (vermelha) sofre ressecção expondo a extremidade 3'. (iii) essa extremidade então se anela a qualquer DNA fita simples exposto com o qual compartilhe microhomologia, em qualquer forquilha de replicação repetidas vezes (iv, v, vi, vii, viii) até que, como resultado, seja construída uma sequencia com diversos segmentos genômicos diferentes (ix). Figura adaptada de (11).

1.3. REARRANJOS CROMOSSÔMICOS EQUILIBRADOS E DOENÇAS GENÉTICAS

Apesar de não haver perda de material genético associado, cerca de 7 % dos rearranjos cromossômicos equilibrados estão associados a fenótipos anormais que incluem malformações congênitas múltiplas e/ou deficiência intelectual (21). Sabe-se que, aproximadamente 50 % dos casos de deficiência intelectual tem origem genética, e mutações em mais de mil genes foram associados à característica (22). Sabe-se ainda, que as translocações equilibradas são mais frequentes em indivíduos com deficiência intelectual do que na população em geral (23).

Rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados, como aqueles que acontecem em parte das inversões, inserções e translocações, ocorrem em aproximadamente 0,52-1,54 % dos nascidos vivos (24; 25). Esses rearranjos são responsáveis por aproximadamente 1,5 % dos casos de deficiência intelectual de causa genética (22) e 1,3 % dos casos de transtornos do espectro autista (26).

A maioria desses rearranjos são transmitidos por um dos genitores, sendo um em cada cinco considerados eventos *de novo* (27) e podem estar ou não associados a fenótipo anormal (25)(27).

Quando esses rearranjos equilibrados estão associados a um fenótipo anormal, sabe-se que o fenótipo pode surgir pela presença de desequilíbrios genômicos formados a partir dos pontos de quebra dos cromossomos envolvidos nesse rearranjo (Figura 8). O ponto de quebra desse tipo de rearranjo refere-se a região exata em que o cromossomo se quebrou e se ligou em outro cromossomo (translocação, inserção) ou no próprio cromossomo (inversão) e, o desequilíbrio genético pode acontecer na região próxima, afastada ou mesmo dentro do próprio ponto de quebra afetando genes ou regiões reguladoras (21).

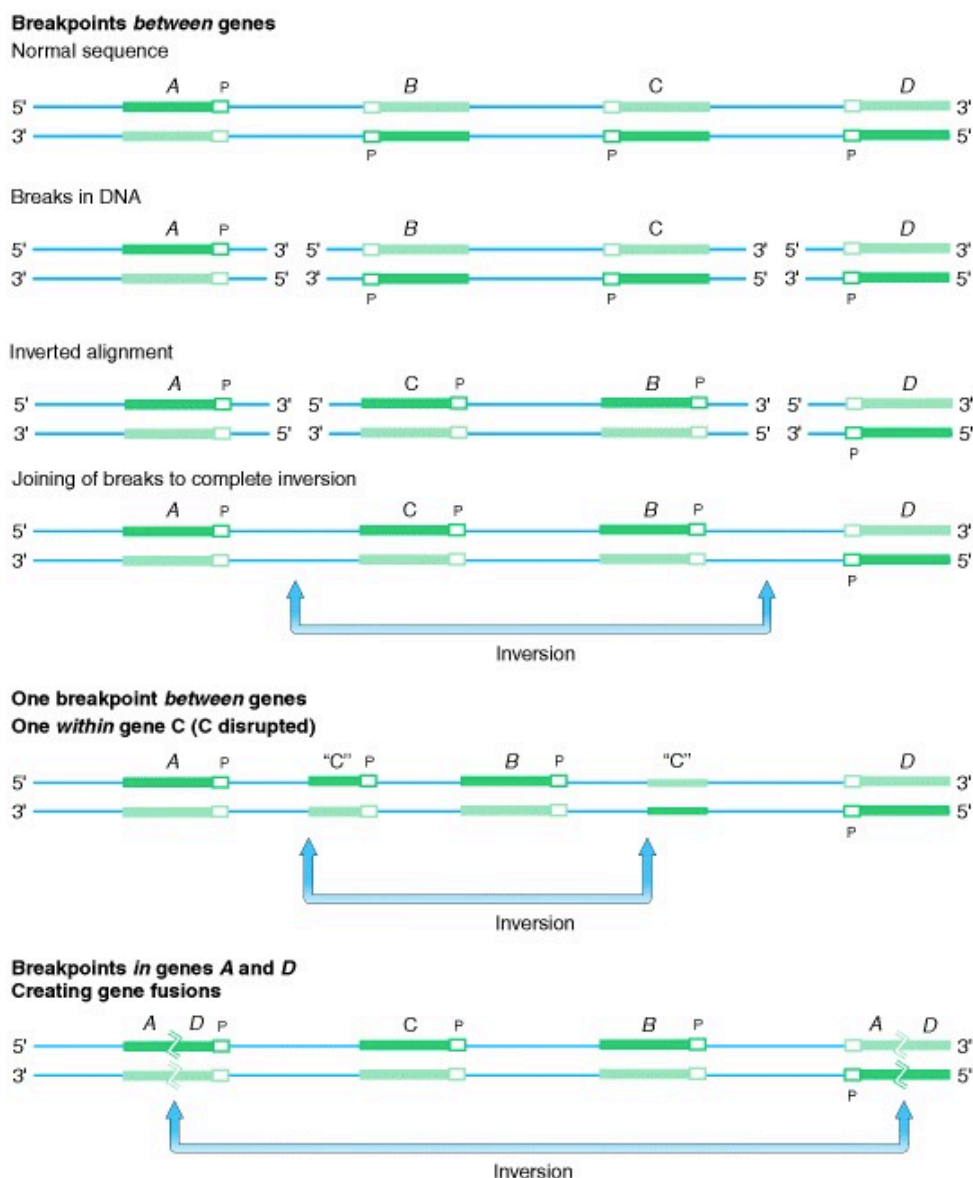


Figura 8. Esquema que apresenta efeitos da presença de uma inversão ao nível do DNA. Na figura os genes estão representados pelas letras A-D. A letra P representa a região promotora do gene, as setas representam os pontos de quebra no DNA. Como é possível ver, uma inversão pode ter seu ponto de quebra em região não-codificante, ter um ponto de quebra dentro de um gene, fazendo com que ele seja interrompido posteriormente e, ainda, ter ponto de quebra entre dois genes, podendo ocasionar a criação de uma fusão gênica.

Muitos dos casos aparentemente equilibrados, quando analisados por métodos moleculares como o CMA mostram pequenas deleções e ou duplicações associadas à região cromossômica alvo, que podem explicar o quadro clínico apresentado pelos pacientes.

Em aproximadamente 34 % dos casos de alterações cromossômicas equilibradas os pontos de quebra intersectam quadros de leitura de genes, gerando

uma interrupção na leitura de um gene e com isso, podendo causar fenótipo alterado devido a haploinsuficiência de um gene (26). Essa consequência foi vista pela primeira vez quando na identificação do gene da distrofina humana na década de 1980. Diversos trabalhos relataram mulheres afetadas por Distrofia muscular de Duchenne (DD) que eram portadoras de uma translocação equilibrada entre o cromossomo X e um cromossomo autossômico (28; 29). Essas mulheres tinham o ponto de quebra comum na região Xp21, o que sugeria que nessa região poderia haver um gene interrompido pela quebra cromossômica que fosse responsável pela doença. Mais tarde, foi isolado na região o gene da distrofina humana.

Uma outra consequência que um rearranjo cromossômico equilibrado pode acarretar em um indivíduo afetado é a formação de um gene híbrido, que dá origem a uma proteína quimérica, contendo na região N-terminal aminoácidos correspondentes a parte dos éxons do gene do primeiro cromossomo e na região C-terminal aminoácidos correspondentes a parte dos éxons do gene do segundo cromossomo (10) (Figura 9a). O melhor exemplo desse tipo de rearranjo é a translocação $t(9;22)(q34;q11)$ encontrada em mais de 90% dos casos de leucemia mieloide crônica, que origina a fusão parcial dos genes *BCR* e *ABL* que codificam uma nova proteína de fusão (30).

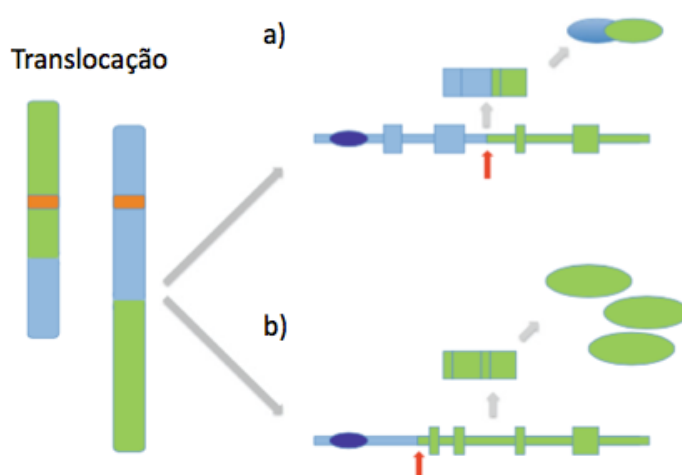


Figura 9. Esquema que mostra as consequências funcionais de uma translocação equilibrada. a) formação de um gene híbrido que leva à formação de uma proteína quimérica. b) formação de um gene híbrido que leva à desregulação da expressão de um gene adjacente ao ponto de quebra. Setas vermelhas: pontos de quebra. Figura adaptada de (10).

Outra consequência de uma translocação equilibrada é a justaposição de um elemento *enhancer* próximo a um gene, em geral, um oncogene. Isso leva a uma

desregulação transcricional, na maioria das vezes, uma expressão acentuada do gene afetado (Fig. 9b). O primeiro exemplo disso foi a translocação t(8;14)(q24;q32) associada com o linfoma de Burkitt que leva a um aumento na expressão de *MYC*, um proto-oncogene, através da proximidade com o *enhancer* IgH e/ou regiões reguladoras (10)(31).

Uma alteração equilibrada pode levar a manifestações clínicas também por meio da dissomia uniparental (*UPD*), em que um dos genitores transmite aos seus descendentes uma translocação equilibrada. A alteração fenotípica está presente em 8 % dos casos de *UPD* por rearranjos equilibrados e ocorre se os cromossomos envolvidos estiverem sujeitos ao *imprinting*, uma vez que a dissomia uniparental pode ocorrer por não-disjunção meiótica no portador de translocação equilibrada e levar à formação de gameta dissômico, com os cromossomos translocados e um dos normais (32). Esse gameta dissômico pode então ser unido a um gameta normal ou nulissômico do outro genitor. Se ocorrer a fertilização a partir da primeira possibilidade, haverá a formação de um zigoto portador de uma trissomia, que, corrigida pela perda do homólogo normal do outro genitor, gera um feto com dissomia uniparental, portando a translocação equilibrada. Entretanto, se ocorrer a fertilização a partir da segunda possibilidade, o zigoto formado terá totalmente o material genético da região afetada vindo do genitor com a translocação equilibrada (33).

A relação entre *UPD* e quadro clínico decorre da possibilidade de que a *UPD* possa interromper o *imprinting* genômico, o que resultaria em desordens de imprinting (32) Além disso, a *UPD* pode ainda levar a formação de grandes blocos de ausência de heterozigose, o que pode expor genes recessivos, antes encobertos. (32)(17).

Além disso, algumas doenças genéticas relacionadas com translocações e inversões equilibradas apresentam um fenótipo devido ao evento de efeito de posição, no qual o segmento de DNA é transferido de um *locus* gênico para outro. Por exemplo, um fragmento que é transferido de uma região de eucromatina – ativa para transcrição – para próximo de uma região de heterocromatina, o que acaba por silenciar a expressão do gene envolvido (34).

Rendi e colaboradores (2016) (26) mostraram que, em um grupo de indivíduos que apresentavam alterações cromossômicas equilibradas na região 5q14.3, muitos deles apresentavam uma interrupção direta no gene *MEF2C* enquanto outros apresentavam uma interrupção de um domínio associado a topologia do DNA

(*Topologically Associated Domain* – *TAD*) que distava ~800 kb desse gene, que gerava uma expressão reduzida de *MEF2C*.

Os *TADs* são longos pedaços de DNA de um mesmo cromossomo que contêm genes e elementos estruturais/regulatórios que podem interagir com os genes presentes no próprio *TAD* e somente dentro dele. Dessa forma, os *TADs* são isolados um dos outros pela presença de uma “barreira”, a presença da proteína CTCF (*CCCTC-Binding factor*) nas fronteiras de dois *TADs* (35). Quando uma alteração cromossômica acontece próxima às fronteiras desses *TADs*, pode haver a modificação ou mesmo a remoção dessas barreiras, sugerindo que o efeito de posição na arquitetura do *TAD* na região de desordem genômica pode alterar a expressão normal de um gene (35), como no caso do gene *MEF2C* supracitado.

O efeito de posição também foi visto já nos genes *FOXL2* (síndrome de Blefarofimose) (36;37); *PLP1* (síndrome de Pelizaeus-Merzbacher) (38); *SHOX* (Discondrosteose de Léri-Weill) (3), entre outros.

As novas tecnologias moleculares que surgiram na fase pós-genômica possibilitaram a aquisição de novos resultados e a confirmação/rejeição destes dentro do contexto da citogenética clínica. Com a resolução das técnicas e equipamentos cada vez melhores, hoje já é possível encontrar erros genéticos, como as translocações equilibradas aqui estudadas, ao nível de 1 kb, auxiliando na procura de “genes quebrados” ou não funcionais próximos ao ponto de quebra do rearranjo.

1.4. TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS APARENTEMENTE EQUILIBRADOS.

Até antes da década de 1950, estudar cromossomos humanos era ainda um desafio a ser conquistado, pois todas as tentativas de visualizá-los eram quase impossíveis já que os cromossomos, ao saírem de dentro do núcleo pelo rompimento celular, não se espalhavam adequadamente em uma superfície laminar, ficando sobrepostos. Somente a partir de 1956, quando os pesquisadores Tjio e Levan (40; 41), conseguiram, por meio de uma adaptação a um dos protocolos já existentes – pré-tratamento com solução hipotônica -, visualizar os cromossomos de células de pulmão humano, é que a citogenética pôde começar a desenvolver-se apropriadamente.

Com o novo protocolo estabelecido por Tjio e Levan, os cromossomos humanos eram visíveis em microscópio, mas somente podiam ser classificados pelo tamanho e pela posição do centrômero, o que causava diversos erros de análise dependendo de como era realizada a técnica. Por isso nos anos 70, novos protocolos de bandamento foram desenvolvidos (42-46). O bandamento G, por exemplo, utiliza o corante *Giemsa* para reproduzir um padrão de bandas escuras (heterocromatina) e claras (eucromatina) ao longo dos cromossomos e identifica cada cromossomo por esse padrão de bandas único e reprodutível para cada homólogo (47). Dessa forma, as alterações estruturais, como translocações, inversões, deleções e duplicações, puderam ser identificadas e novas síndromes genéticas puderam ser caracterizadas.

Contudo, conforme a tecnologia foi avançando na ciência, a procura por melhores resoluções (bandamento: 4-5 Mb) fez surgirem novas técnicas moleculares de análise citogenética que permitem a análise de todo o cromossomo ou de uma região específica deste (47; 48). Uma dessas técnicas é a técnica de Hibridação *In Situ* Fluorescente (*FISH*) (49) com uma resolução de 40 kb – 250 kb por sonda, baseia-se na detecção de sondas de DNA específicas, construídas em vetores (plasmídeos, BACs, YACs) ou oligonucleotídeos (50), hibridadas a sequências complementares nos cromossomos e ligadas a um fluorocromo (Figura 10) (51). Essas sondas de DNA podem ser complementares a qualquer sequência de interesse, podendo ser desde um cromossomo inteiro (formando as bibliotecas cromossômicas) até sequências únicas ou repetitivas (48).

Em se tratando de como a implementação da técnica de *FISH* auxiliou no desenvolvimento da citogenética clínica, rearranjos cromossômicos submicroscópicos e complexos puderam ser finalmente analisados e novas síndromes e causas clínicas diagnosticadas e estudadas. Além disso, com a progressiva diminuição do tamanho das sondas, hoje até moléculas de RNAm já são passíveis de visualização (52; 53).

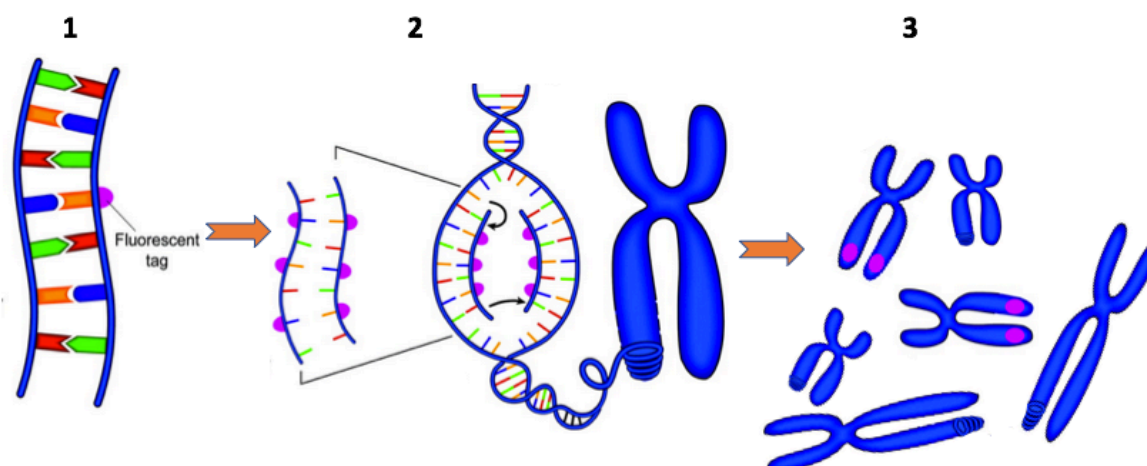


Figura 10. Esquema que representa o mecanismo da técnica FISH. O primeiro passo (1) é desenhar sondas específicas para a região que se quer analisar que serão ligadas a fluorocromos. Feito isso, o DNA passa por várias etapas para que a dupla fita seja desfeita por desnaturação a fim de permitir que a sonda se ligue na região designada (2). Após um processo de lavagem, observa-se ao microscópio de fluorescência a presença ou não da região avaliada (3). Figura adaptada de (54).

Melhor resolução ainda foi conseguida a partir da técnica de análise cromossômica em microarranjos. Ela assemelha-se em partes com o método de *FISH*, no entanto utiliza milhares de sondas complementares ao genoma humano, constituindo uma ferramenta robusta para a detecção de deleções e/o duplicações de segmentos cromossômicos ao nível submicroscópico de até 30 kb (55).

A análise cromossômica por microarranjo (CMA) e pode ser dividida em três tipos principais: 1. Híbridação Gen mica Comparativa ou aCGH, consiste na utiliza o de um DNA-controle de um indivíduo supostamente normal para pelo menos a região de interesse e um DNA-teste, ambos marcados com fluorocromos de diferentes cores. Ambos DNAs, depois de tratados, são adicionados a uma lâmina, ou *chip*, que cont m milhares de sondas complementares a sequências em toda a extensão do genoma humano e, ao entrarem em contato com estas sondas, hibridam a elas quando existe complementariedade, e a intensidade de fluorescência   medida pelo equipamento. As perdas e ganhos de segmentos são indicadas pela diferença na intensidade da fluorescência dos fluorocromos diferentes, sendo que aquele em que houver mais fluorocromo do DNA-controle, significa uma dele o no DNA-teste e, aquele em que houver mais fluorocromo do DNA-teste, significa uma duplica o neste em rela o ao controle; 2. Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA) *one-channel* ou *Oligoarray*, que consiste na utiliza o de um banco de dados ao invés de um DNA-controle, com o qual, o DNA-teste   então comparado (Figura 11); 3. Microarranjo

SNP, que permite também detectar perdas de heterozigose (56), dissomia uniparental (57) e genotipagem (58) de uma amostra de um único paciente, em que, ao utilizar sondas do tipo SNP, as alterações no número de cópias podem ser detectadas pela comparação com hibridações em controles (48)(55).

Há ainda plataformas que se utilizam não só de sondas polimórficas, mas também de sondas não-polimórficas, como aquelas em que utilizam oligonucleotídeos e sondas SNP, para detectar CNVs e genotipagem. Ao utilizar uma plataforma como essa, o resultado obtido por um tipo de sonda valida o outro e torna a análise e apresentação do resultado mais robusto.

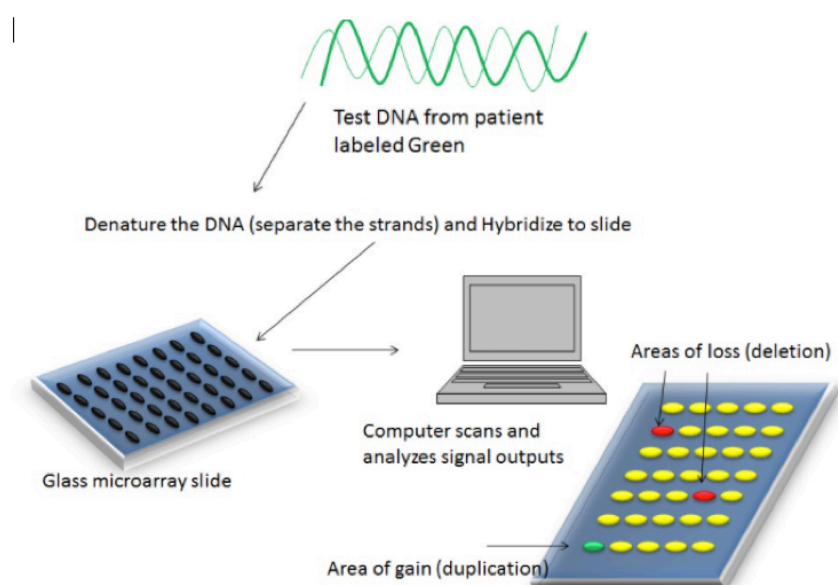


Figura 11. Esquema que descreve a técnica de Microarrayo *one channel*. Primeiro, o DNA-teste é tratado e recebe uma marcação com fluorocromo (verde, no caso). Depois ele é hibridizado ao *chip* que contém milhares de sondas complementares a pedaços de todo o genoma humano. A intensidade do sinal é medida em cada ponto e o resultado é mostrado em um programa específico. Figura adaptada de <http://geneticseducation.ca/educational-resources/gec-ko-on-the-run/chromosomal-microarray/> (Acesso em 03.08.17)

A técnica de CMA tem sido cada vez mais utilizada e isso se deve em parte a melhor cobertura do genoma humano, podendo detectar alterações de até 30 kb dependendo da plataforma utilizada. A CMA permite rastrear todo o genoma em busca de deleções/duplicações sem que haja suspeita clínica ou dos segmentos cromossômicos envolvidos.

Por meio desta técnica, muitos casos analisados como rearranjos equilibrados ao exame de cariótipo, provam um resultado diferente, mostrando microarranjos na região dos pontos de quebra, como microdeleções que incluem gene(s) que explicam o quadro clínico apresentado pelo paciente.

Apesar de todas suas funcionalidades, o método CMA ainda não é o ideal para a análise de rearranjos cromossômicos equilibrados e complexos, visto que somente detecta perdas e ganhos em segmentos e, rearranjos realmente equilibrados não perdem segmentos grandes do DNA e, tampouco ganham. Sendo assim, ao exame de microarranjo, o paciente analisado pode ser erroneamente classificado como normal ao nível do DNA.

Como uma forma de solucionar esse impasse, logo após o estabelecimento e implantação do Projeto Genoma Humano, realizado por meio do sequenciamento de DNA pela técnica desenvolvida por Frederick Sanger em 1977 (59), cientistas do mundo inteiro viram a potencialidade da técnica de sequenciamento de ácidos nucléicos em larga escala e começaram a investir em formas de transformar esse método em algo mais veloz, eficiente e barato (60-62). Dessa maneira surgiram as técnicas denominadas sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* - NGS).

As plataformas de sequenciamento NGS têm a capacidade de processar milhões de fragmentos de DNA, ou *reads*, em paralelo, sendo possível o sequenciamento de um genoma inteiro em menos de um dia (62), com o poder de resolução ao nível de pares de base (63). Atualmente, as plataformas existentes exibem similaridade em seus protocolos, incluindo sempre a preparação das amostras, o sequenciamento, a imagem através de *softwares* específicos, o alinhamento e os métodos de montagem (61). O DNA-amostra precisa primeiro passar por um processo de fragmentação (~21 até ~400 pares de base) e amplificação para criar as denominadas bibliotecas de ácidos nucléicos (60)(62). Os *reads* são construídos em sequência e, para análise, utilizam um genoma de referência, em relação ao qual os *reads* são alinhados. Assim, alterações cromossômicas variadas, incluindo as estruturais e as variações no número de cópias (>50pb) podem ser vistas. Além destas, com esse método finalmente os rearranjos equilibrados são passíveis de identificação (60)(64).

Para a identificação e caracterização de rearranjos cromossômicos equilibrados ou não, uma vertente de NGS tem se mostrado mais eficiente: o

sequenciamento de genoma inteiro por *paired-end* (PE) e, mais ainda o *mate-pair* (MP) (65). Com esse método uma grande quantidade de informações sobre o genoma pode ser encontrada a partir da construção de *mate-pair libraries*, em que insertos relativamente longos de DNA (5 kb) são produzidos, marcados nas extremidades por biotina, depois circularizados para conectar ambas as extremidades e depois fragmentados (~300-500 pb) ao ponto de que somente as extremidades – agora conectadas – são utilizadas para serem sequenciadas (Figura 12).

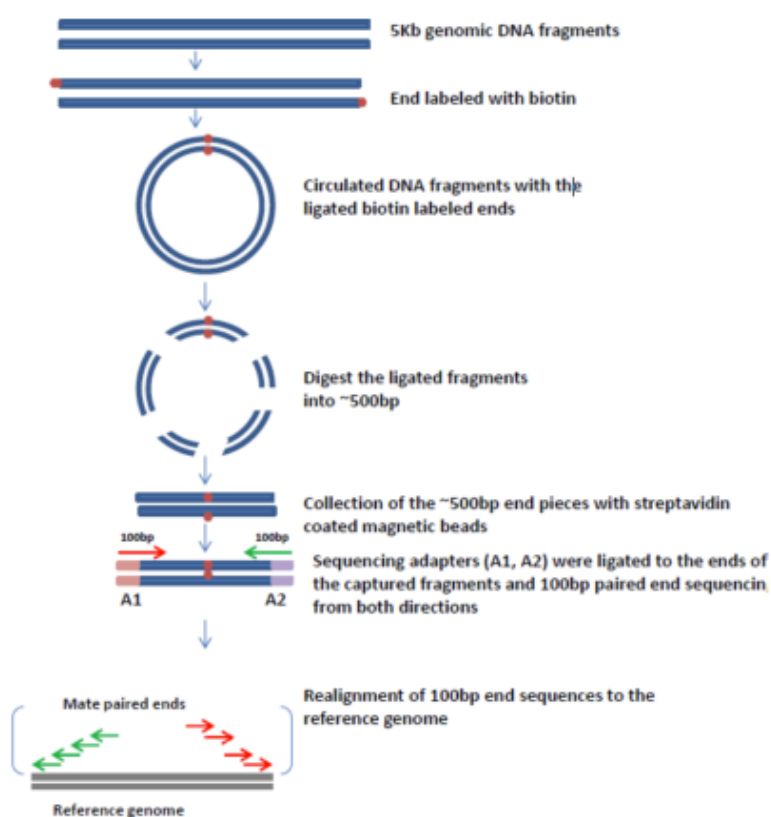


Figura 12. Esquema que representa o princípio do método de sequenciamento do tipo *mate-pair* (MP). Primeiramente, o genoma teste é fragmentado e somente os insertos de 5 kb são selecionados. Esses insertos são então marcados por biotina em ambas suas extremidades. Os insertos são circularizados, de forma a conectar ambas as extremidades. Os fragmentos passam novamente por uma digestão e fragmentam em sequências de 300-500 pb, purificados (com uso de *beads* magnéticos ou outros) e depois são ligados a adaptadores específicos (A1 e A2). Sequências de 100 pb são sequenciadas dos dois lados e depois, realinhados em comparação de um genoma de referencia para determinar a localização de cada fragmento *paired-end*. Figura adaptada de (66).

Assim, as extremidades dos insertos são sequenciadas 100 pb para cada lado (fita negativa e fita positiva) e quando os *reads* são alinhados a um genoma de referência, é possível localizar onde cada par de *reads* está mapeado. Para analisar se o local é normal em relação ao de referência, precisa-se analisar a distância entre os *mate-pair reads*, e se a distância for correspondente ao tamanho do inserto gerado pela biblioteca e de tamanho conhecido (5 kb), então aquele *mate-pair* corresponde a uma sequência normal no paciente (Figura 13).

Por outro lado, se pelo menos três *mate-pair* forem discordantes, a análise indica a presença de um rearranjo cromossômico (67). Deleções e duplicações/inserções são identificadas pela presença de *mate-pairs* que estão mais distantes uma da outra ou mais próximas uma da outra, respectivamente, no genoma de referência (Fig. 13). Já para rearranjos cromossômicos equilibrados, as inversões são encontradas quando *mate-pairs* mapeiam o mesmo cromossomo, porém para sentidos diferentes no genoma referência (Fig. 13). Por sua vez, as translocações são localizadas quando em *mate-pairs*, um dos *reads* está em um cromossomo e o outro *read* é visto em outro cromossomo não-homólogo (Fig. 13).

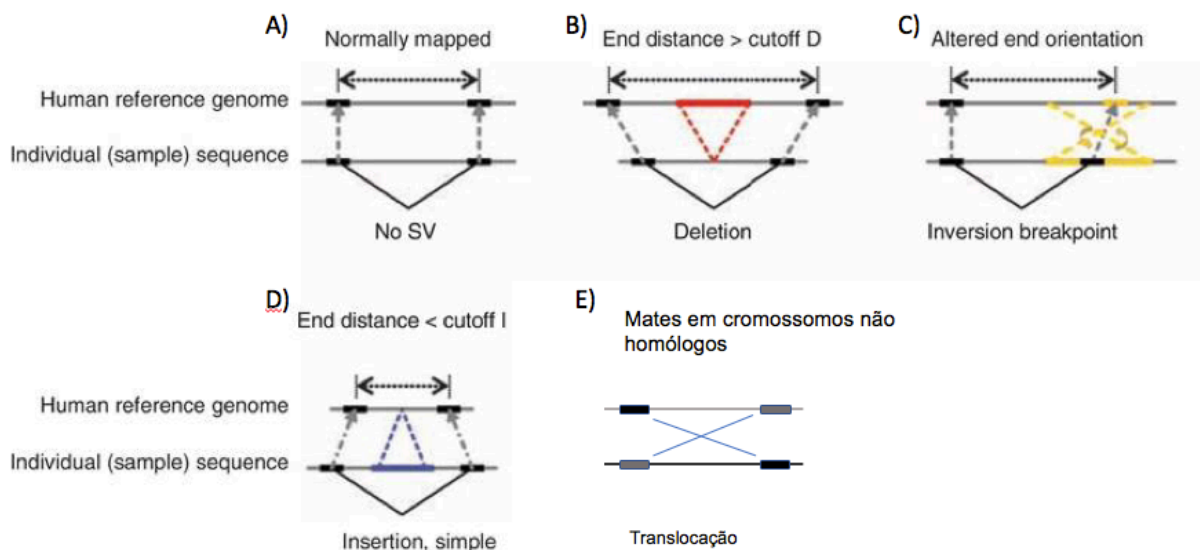


Figura 13. Desenho que mostra as possíveis imagens referentes ao resultado de um sequenciamento do tipo *mate-pair* (MP) quando alinhado a um genoma de referência. A) quando o mapeamento é normal, a distância entre os adaptadores dos *reads* é igual ao inserto, e na orientação correta, indicando que não há variação estrutural na região. B) deleção, quando a distância entre os adaptadores dos *reads* é maior no genoma referência. C) inversão, quando a distância entre os adaptadores dos *reads* é igual ao genoma referência, mas o sentido dos *reads* é contrária e no mesmo cromossomo. D) duplicação ou inserção, quando a distância entre os adaptadores dos *reads* é menor no genoma

referencia. E) translocação, quando um dos *reads* do par é localizado em um cromossomo e o outro *read* em outro cromossomo não-homólogo. Figura adaptada de (67).

Ao se encontrar rearranjos cromossômicos equilibrados, deve-se procurar os pontos de quebra dos cromossomos envolvidos. Quando o alinhamento é feito, pela utilização de um *software* específico, é possível definir a distância do *mate-pair* para encontrar os pontos de quebra e, então, caracterizar os genes presentes no local por sequenciamento *Sanger* e análise *in silico*. Para o mapeamento deste tipo de rearranjo podem ser utilizados insertos de DNA de tamanhos menores que 5 kb, como de 3 kb, mas também de tamanhos mais extensos, como 7 a 11 kb de extensão, para análise de rearranjos mais complexos (68).

A utilização de NGS-MP conseguiu identificar possíveis genes candidatos aos quadros clínicos dos portadores dos rearranjos cromossômicos equilibrados, que antes não poderiam ter um diagnóstico ainda e assim, novas doenças puderam ser caracterizadas, incentivando as pesquisas em todas as áreas da saúde (21)(65)(69-71). Foi criado um consórcio de laboratórios do mundo todo, para, encontrar todos os pontos de quebra identificados em rearranjos de indivíduos normais e com algum quadro clínico, por meio do Consórcio Internacional de Mapeamento de Pontos de Quebra (*International Breakpoint Mapping Consortium – IBMC*) (72).

Capítulo 2.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e sua relação com o fenótipo dos portadores

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar pacientes portadores de alterações cromossômicas equilibradas por análise de cariótipo (Bandamento G e Bandamento C)
2. Buscar possíveis microdeleções/microduplicações na região da quebra cromossômica pela análise cromossômica por microarranjo (CMA).
3. Sequenciar os pontos de quebra de rearranjos cromossômicos equilibrados por meio do sequenciamento de DNA do tipo *Mate-pair*.
4. Relacionar os segmentos envolvidos na quebra cromossômica ao quadro clínico dos pacientes.

Capítulo 3.
PACIENTES E MÉTODOS

3.1. PACIENTES

Foram selecionados 10 pacientes atendidos no Serviço de Genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB).

3.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Somente foram aceitos pacientes com rearranjos cromossômicos microscópicos raros aparentemente equilibrados, identificados ao cariótipo e que concordaram em participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

3.2. CARIÓTIPO

Para identificar alterações cromossômicas em amostras de sangue periférico dos pacientes selecionados foi realizado o estudo do cariótipo. Para tanto, foram coletados quatro mililitros de sangue periférico em tubo contendo heparina. A análise foi realizada ao microscópio óptico após cultivo dos linfócitos, tratamento com tripsina e coloração com *Giemsa* (bandamento G) e em alguns casos foi feito também o bandamento C, com tratamento prévio com hidróxido de bário. A análise foi realizada pela Dra. Iris Ferrari.

3.3. ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO (CMA)

Essa técnica de citogenética molecular permite verificar se há perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos no genoma de um indivíduo, detectando alterações cromossômicas de 10 a 100 vezes menores do que é visível ao microscópio óptico, dependendo da plataforma utilizada.

Neste projeto foi empregada e utilizada a plataforma CytoScan™ 750k (Affymetrix). Essa plataforma apresenta cerca de 750 mil sondas que permitem a visualização de um resultado de alta resolução tanto em relação de variações no número de cópias quanto de perda de heterozigose.

O DNA foi extraído a partir de protocolo adaptado do método Puregene. A hibridação foi realizada segundo instruções do fabricante. As lâminas hibridadas com o DNA teste e marcadas com biotina foram analisadas com o auxílio do scanner GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix,) e do *Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software* versão 3.1 (Affymetrix).

Foram consideradas na análise apenas perdas e/ou ganhos de segmentos cromossômicos que abranjam no mínimo 25 oligonucleotídeos consecutivos e maiores que 200 Kb – resolução aproximadamente 20x maior que a das técnicas tradicionais de bandamento cromossômico. Para regiões de perda de heterozigose são considerados apenas segmentos maiores que 5 Mb. Variações no número de cópias de sequências de DNA encontradas comumente na população em geral não são consideradas, considerando-se o banco de dados *Database of Genomic Variants* (DGV).

A análise por CMA não detecta alterações cromossômicas equilibradas, alterações no DNA mitocondrial ou mutações de ponto. Além disso, alterações cromossômicas em mosaico com frequência inferior a 30 % podem não ser identificadas.

3.4. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Para a melhor caracterização das alterações cromossômicas em alguns casos foi realizada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente. O protocolo utilizado foi adaptado pelo laboratório de genética do departamento de genética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP). As sondas utilizadas foram sondas clonadas em BAC pela Dra. Carla Rosenberg e pertencem ao *Sanger Institute* (Tabela 1).

Tabela 1. Sondas utilizadas na técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) realizada neste estudo. As sondas foram clonadas em BAC e pertencem ao *Sanger Institute* e foram clonadas e cedidas pela Dra. Carla Rosenberg.

Sonda	Localização no Cromossomo	Posição (hg19)
RP11-4F22	17q24.2	64,257,295-64,434,375
RP11-155C2	17q25.1	71,935,345-72,128,170
RP11-92G19	18p11.31	4,936,281-5,093,813
RP11-36J15	18p11.22	9,459,213-9,643,170

As sondas foram extraídas com o kit *Illustra™ plasmidPrep Mini Spin* (GE Healthcare) e seguindo o protocolo do mesmo. As sondas foram quantificadas e qualificadas por Nanodrop e obtiveram concentrações e qualidade satisfatórias.

As sondas foram marcadas por *nick translation* com digoxigenina ou biotina por meio, respectivamente, da incorporação dos nucleotídeos Dig-11-dUTP ou Bio-16-dUTP, utilizando os kits de marcação *Dig-Nick Translation* (Roche Applied Science) ou *Biotin-Nick Translation Mix* (Roche Applied Science), conforme instruções do fabricante. A supressão de sequências repetitivas foi feita com DNA humano Cot-1 (Invitrogen), durante a etapa de precipitação. Foi adicionado 20 µl de meio de hibridação (50 % formamida, e 10 % dextran sulfato, em 2xSSC) em cada sonda e elas foram desnaturadas a 37 °C por 5 min e, logo após a 100 °C por 10 min. Em seguida, as sondas foram deixadas a 37 °C na etapa de *pre-annealing* por 45 min. O DNA das amostras nas lâminas foi desnaturado em solução de desnaturação (70 % formamida/ 2xSSC) a 72 °C por 2 minutos. A hibridação foi realizada em câmara úmida por 48 horas a 37 °C. Para a detecção das sondas marcadas com biotina, utilizou-se avidina conjugada a FITC e para a detecção de sondas marcadas com digoxigenina, utilizou-se anti-digoxigenina conjugada a rodamina, ambas na concentração de 1:200. As sondas foram mantidas com os anticorpos a 37 °C por 50 min em câmara escura. As lâminas foram montadas em *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories) contendo o corante DAPI (0,8 µg/mL) (Sigma). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência *Axiophot 2* (Carl Zeiss). Para a documentação, as imagens foram capturadas por câmara de CCD e processadas, utilizando-se o *software* ISIS (MetaSystem).

3.5. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO *MATE-PAIR*

As alterações cromossômicas identificadas não previamente descritas foram analisadas por meio da metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS), que compreende a construção de bibliotecas de fragmentos de DNA a partir do método *mate-pair*, seguida do sequenciamento *paired-end* destes fragmentos produzidos, conforme descrito em (63). O *workflow* seguido durante o sequenciamento está

esquematizado abaixo (Figura 14). Os segmentos contendo os pontos de quebra foram confirmados por PCR e sequenciamento Sanger.

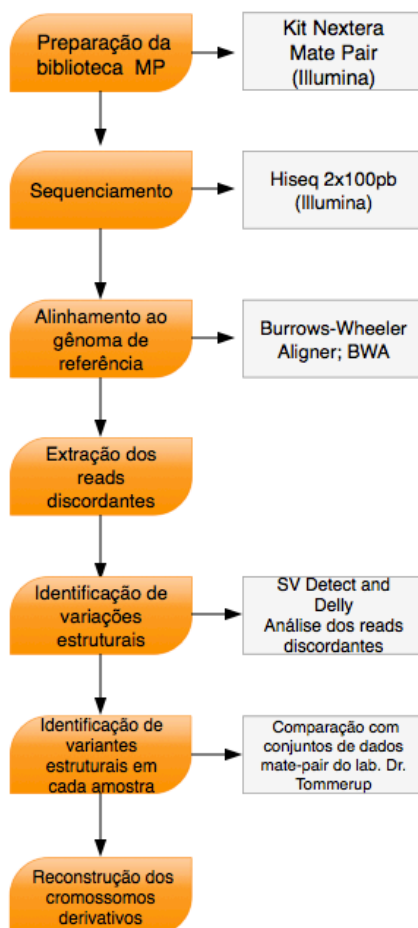


Figura 14. Esquema representando o *workflow* do método de sequenciamento *mate-pair*, feito em colaboração com a Universidade de Copenhague (Dinamarca).

As bibliotecas *mate-pair* foram preparadas usando o kit *Nextera Mate Pair Library Prep kit* (Illumina®), de acordo com o protocolo do fabricante, com modificações, seguindo as etapas: 1- Tagmentação do DNA genômico: etapa em que o DNAg é tagmentado por um transpososomo e com isso, é fragmentado e ligado a adaptadores; 2- Purificação da reação de tagmentação: etapa para purificar o DNA tagmentado, utilizando o *Zymo Genomic DNA Clean & Concentrator*; 3- *Strand Displacement*; essa etapa repara uma pequena lacuna de fita simples que surgiu durante o processo de tagmentação do DNAg. Para tanto, é utilizada uma polimerase (*Strand Displacement Enzyme Mix*); 4- Purificação do DNA: fragmentos menores que <1500 bp são removidos utilizando *AMPure XP beads*; 5- Circularização do DNA: essa etapa utiliza uma ligadura intramolecular de extremidade fechada para circularizar o

DNA; 6- Remoção de DNA linear: utiliza um tratamento com exonuclease de DNA para remover DNA linear. O DNA circularizado permanece intacto; 7- Fragmentação do DNA circularizado: aqui o DNA circularizado é fragmentado para criar fragmentos menores, de aproximadamente 300 a 1000 bp. Essa etapa também gera DNA de dupla fita com extremidades 3' ou 5' suspensas; 8- Purificação do DNA fragmentado: nessa etapa, utilizam-se *Streptavidin Magnetic Beads (Dynabeads M-280)* para purificar os fragmentos de DNA que contenham adaptadores (fragmentos mate-pair). Fragmentos que não apresentam adaptadores são removidos através de uma série de lavagens com *Bead Wash Buffer*; 9- Reparação das extremidades suspensas: essa etapa repara as extremidades 3'e 5'suspensas produzidas pelo processo de fragmentação, utilizando o *End Repair Mix*. O DNA continua ligado às *beads* durante toda essa etapa e nas etapas de lavagens subsequentes, com *Bead Wash Buffer*; 10- Adição de um nucleotídeo adenina à extremidade 3' dos fragmentos reparados: utiliza *A-Tailing Mix*. Isso previne que esses fragmentos se conectem entre si durante a etapa de ligação dos adaptadores; 11- Ligação dos adaptadores: essa etapa liga adaptadores (*TruSeq DNA adapters*) às extremidades dos fragmentos de DNA (utilizando *Ligation Mix* e *DNA Adapter Index*), preparando-os para a amplificação e subsequente hibridização a uma célula de fluxo (*flow cell*). A ligação é feita nas *beads* e o DNA permanece ligado às *beads* durante essa etapa e as lavagens subsequentes (*Bead Wash Buffer*); 12- Amplificação das bibliotecas: aqui os fragmentos de DNA com adaptadores em ambas as extremidades são amplificados pela técnica de PCR, utilizando *PCR Master Mix* e *PCR Primer Cocktail*; 13- Purificação das bibliotecas: utilizando *AMPure XP beads*, as bibliotecas de DNA são purificadas, com a remoção de fragmentos menores que <300 bp; 14- Lavagem: as bibliotecas de DNA restantes passaram por lavagem com etanol 70 % e foram ressuspensas em *Resuspension Buffer*; 15- Quantificação de DNA: o sobrenadante contendo a biblioteca final de cada amostra foi quantificado utilizando o *GeneRead Library Quant Kit* (Qiagen); 16- Sequenciamento Illumina (mate-pair): as bibliotecas de DNA das amostras foram sequenciadas utilizando a técnica *paired-end* (2x100 bp), no sequenciador HiSeq2000 (Illumina).

A análise *in silico* foi realizada de acordo com o protocolo (*pipeline*) já estabelecido no laboratório do Prof. Dr. Niels Tommerup, desenvolvido pelo Dr. Mads Bak, seguindo as etapas relacionadas a seguir: 1- Após o sequenciamento *mate-pair*, foram produzidos arquivos Fastq de cada amostra de DNA; 2- Os adaptadores foram

removidos, criando arquivos fastq_cutadapt; 3- Os *reads* foram alinhadas em relação ao genoma de referência, hg38 (December, 2013), usando *Burrows-Wheeler Alignment* (BWA), criando um arquivo SAM; 4- Utilizando SAMTools, retiraram-se as sequências com mais de dois *mismatches*, duplicatas de PCR e *reads* multialinhadas no genoma, criando um outro arquivo SAM (*Primary alignments*). 5- Utilizando o programa SVDetect, os *reads* discordantes, ou seja, aqueles *mate-paired reads* que se alinharam ao genoma de referência de maneira inesperada foram selecionados como possíveis resultados de rearranjos cromossômicos (Figura 15). 6- O programa SVDetect só considerou os pontos de quebra que foram confirmados por, pelo menos seis *mate-paired reads* em uma região de até 6 kb de extensão. Foram criados dois arquivos a partir da análise do SVDetect, um deles mostra todos os possíveis rearranjos encontrados e o outro, filtra esses rearranjos e retira da análise rearranjos que intersectam rearranjos conhecidos na população, utilizando o banco de dados disponível do laboratório do Prof. Dr. Niels Tommerup para tal comparação, criando um arquivo filtered.bed. 7- O resultado da análise do SVDetect foi exportado para o formato CIRCOS. 8- Para a análise e visualização das *reads*, utilizou-se o programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV 2.4.5). Os sequenciamentos têm uma faixa de cobertura em torno de 20x.

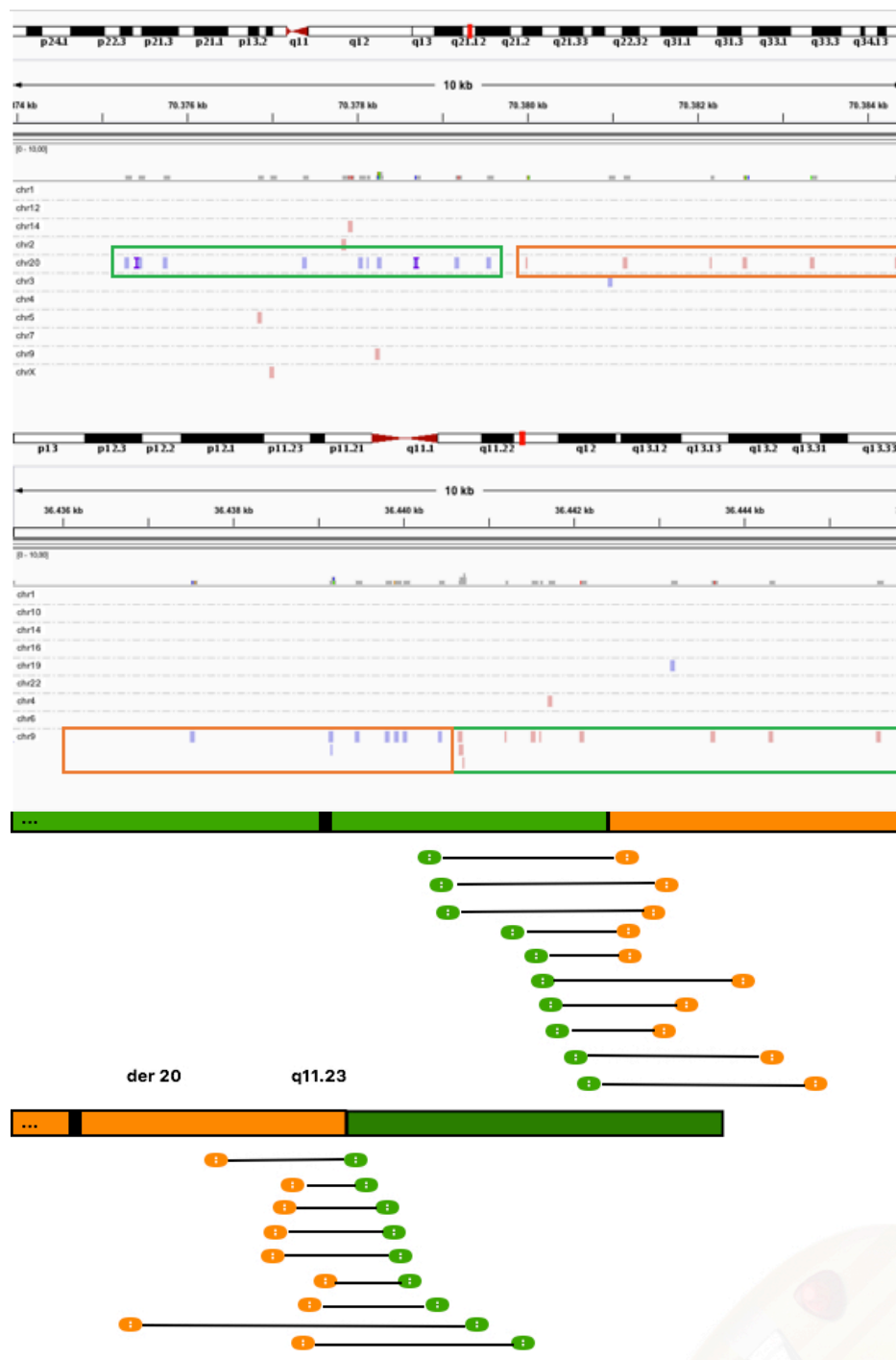


Figura 15. Esquema ilustrativo de análise de reads discordantes a partir do sequenciamento *mate-pair* acima. Abaixo, a representação de dois cromossomos derivativos resultantes de uma translocação entre os cromossomos 9 e 20, com os pontos de quebra identificados pelos reads discordantes nas regiões 9q21.12 e 20q11.23. Observe que os reads azuis em der 9 (fita negativa), são pareados com os reads rosas encontrados em der 20 (fita positiva). Da mesma forma, os reads em azul encontrados em der 20 (fita negativa), são pareados com os reads em rosa encontrados no der 9 (fita positiva). O ponto de quebra é identificado quando mais de três reads discordantes são encontrados em determinada região – 9q12.21 e 20q11.23 – e são visualizados exatamente entre os reads que estão mais próximos no resultado e que estão em fitas diferentes no DNA.

Capítulo 4.
CASO 1

4.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

O paciente 1 é filho de pais não-consanguíneos. Foi encaminhado ao Serviço de Genética do HUB-UnB por suspeita de doença genética. Seu diagnóstico primário sugeria uma cromossomopatia.

O paciente nasceu de parto cesáreo a termo (38 semanas) após uma gestação sem complicações, com exames pré-natais em dia. Seu peso ao nascer foi de 2.845 g, 45 cm de estatura e perímetro cefálico (PC) de 30 cm. O paciente ficou 12 dias internado na UTI sob observação porque a obstetra achou que a criança tinha características da S. de Edwards. Todos os exames feitos de rotina foram considerados normais. Constatou-se ao exame físico, microcefalia (PC =34,2 cm; $p < 2^\circ$), baixa estatura (53 cm; $p < 3^\circ$, assimetria facial com o lado esquerdo menor que o lado direito, achatamento lateral do crânio, microftalmia e ptose à esquerda, olhos amendoados, fendas palpebrais horizontais e sobrancelhas bem povoadas e levemente arqueadas. As orelhas eram normoimplantadas, pontiagudas e com lobos grandes. O nariz era arrebitado com sulco na ponta, columelas visíveis, boca reta, freio lingual curto, palato alto e queixo protuso.

Além disso, mostrava ter pescoço curto, mãos com prega única à esquerda com implantação proximal do primeiro quirodáctilo à direita, terceiro e quarto dedos rodados no eixo. Coluna vertebral com fosseta sacral, nevo no quadril à esquerda, genitália com bolsa escrotal hipoplásica e criptorquidia bilateral (corrigida por cirurgia). Ademais, apresentava pé direito torto com sobreposição do 2º sobre o 3º pododáctilo bilateralmente.

Os marcos no seu desenvolvimento apontavam atraso cognitivo: engatinhou com sete meses, andou com um ano, mas só falou com três anos e com quatro anos falava enrolado, não reconhecia letras ou números e não desenhava. Era sociável, hiperativo e muito disperso.

4.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.

Foram realizados dois exames de cariótipo no material do paciente 1, e cada um deles revelou um resultado diferente. O primeiro, feito em laboratório privado, revelou uma duplicação no braço longo do cromossomo 17 em mosaico, como segue:

46,XY,qh+,dup(17)(q24q25.1)[13]/46,XY,qh+[7]. O segundo, feito no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina da UnB, mostrou uma inversão no cromossomo 17 em mosaico: 46,XY,inv(17)(q21.2;q24)[16]/46,XY[17]. No entanto, a CMA mostrou tratar-se de uma duplicação do segmento 17q24.2-17q25.3 (64,312,801-75,884,602 bp, hg19) de aproximadamente 11,5 Mb (Figura 16).

Cromossomo 17

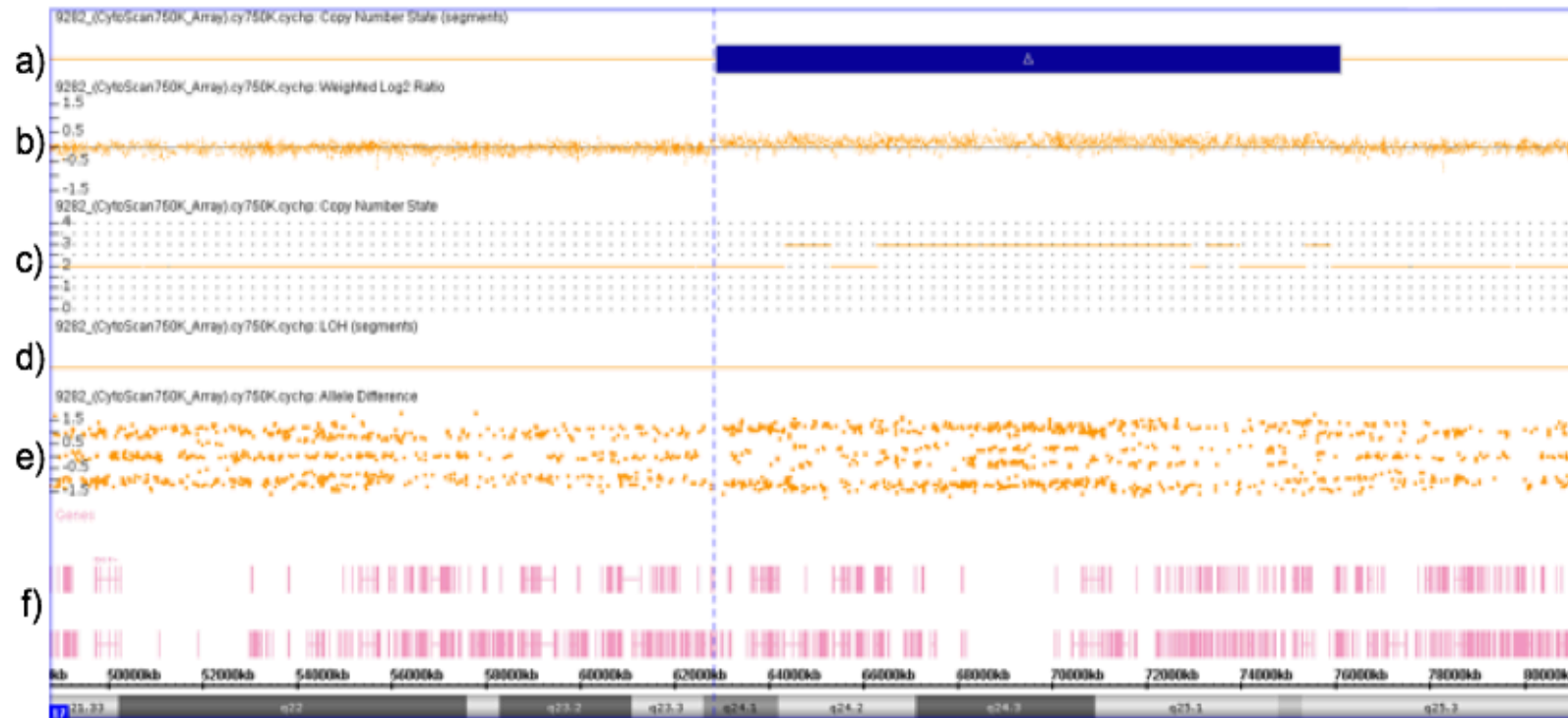


Figura 16. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 1. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de duplicação no cromossomo 17, como segue: 17q24.2-17q25.3 (64,312,801-75,884,602 bp, hg19). b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da duplicação as sondas correspondentes aparecem em maior quantidade do que o normal. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na região da duplicação há três cópias para essa região de sondas. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região de duplicação há uma quarta linha nessa região. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

4.3. RESULTADO DO EXAME DE FISH

Ao confrontar os resultados do exame de cariótipo e da análise de CMA do paciente 1, supôs-se que o fragmento duplicado do paciente também estaria invertido e para investigar essa possibilidade foi feita a técnica de FISH na amostra de DNA deste paciente. O resultado apresentado abaixo (Figura 17) mostrou que, de fato existe uma duplicação na região 17q25.1 (localização da sonda RP11-155C2, vide item 3.4), porém o fragmento duplicado está inserido em outro cromossomo, pertencente ao grupo C, possivelmente o cromossomo 6 ou 7. Além disso, comparando a distância entre as duas sondas utilizadas (RP11-4F22/RP11-155C2, vide item 3.4) com uma amostra controle com as mesmas sondas, pode-se perceber que em um dos cromossomos 17 do paciente, as sondas estão muito mais próximas do que no outro e do que na amostra controle. Isso sugere que há uma inversão na região em que foi identificada a duplicação por CMA.

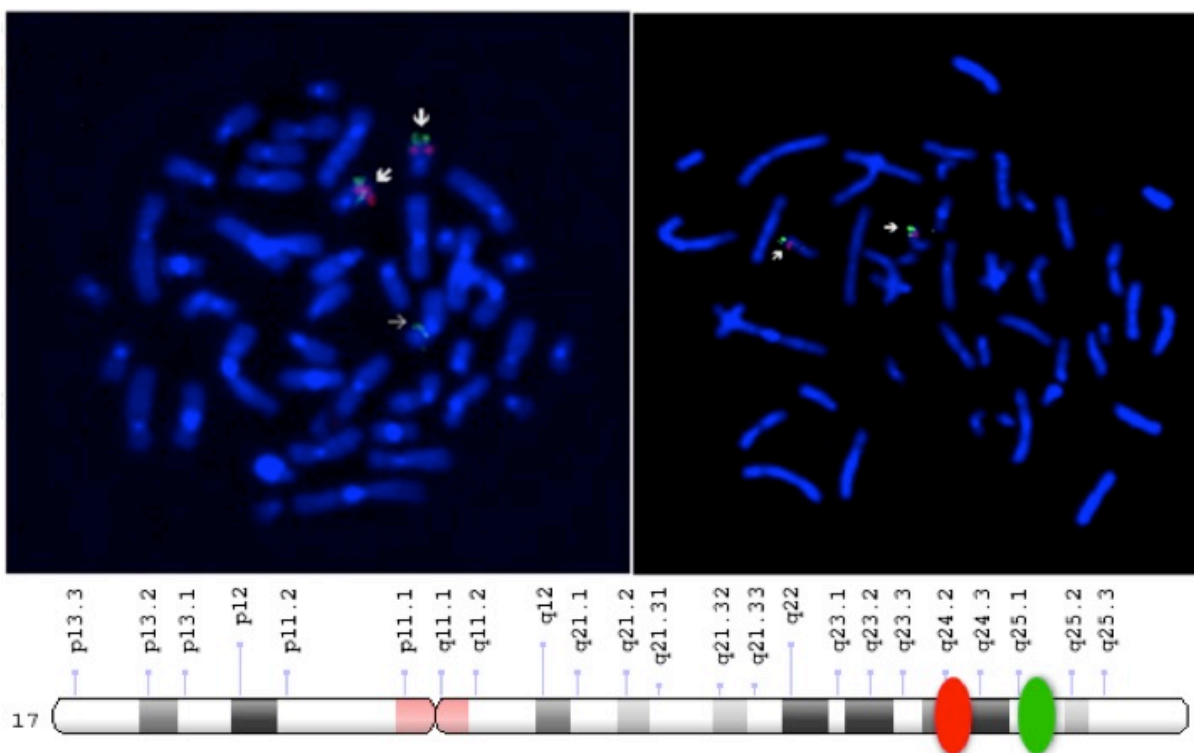


Figura 17. Resultado da análise de FISH em metáfases do paciente 1. Foram analisadas diversas metáfases. Na imagem à esquerda, é possível identificar a presença de ambas as sondas RP11-4F22 (vermelho) e RP11-155C2 (verde) nos cromossomos 17, representadas pelas setas mais grossas. Também é possível identificar a sonda verde inserida em outro cromossomo do grupo C, possivelmente um 6 ou 7 (seta mais fina). A imagem à direita mostra o resultado do FISH com as mesmas sondas em

uma amostra controle. As sondas estão localizadas em ambos os cromossomos 17 (setas) e a distância entre elas é similar à distância mostrada no cromossomo 17 do paciente na imagem à esquerda (seta vertical). Já o outro cromossomo 17 do paciente (seta diagonal) mostra as duas sondas muito mais próximas, sugerindo que neste existe uma inversão na região. Esquema abaixo representa a posição e marcação das sondas RP11-4F22 (vermelha) e RP11-155C2 (verde) no cromossomo 17 humano. Este esquema foi adaptado a partir do ideograma retirado do sítio <https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/17/ideogram.png> (Acesso em 11.04.17).

4.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas amostras de DNA do paciente 1 sugeriram, a princípio rearranjos diferentes, com o cariótipo resultando em inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 17 e outro cariótipo sugerindo uma duplicação em segmentos também do braço longo do mesmo cromossomo.

Somente pela análise de microarranjo foi possível confirmar que ele possuía uma duplicação parcial do braço longo do cromossomo 17. Essa duplicação está inserida em outro cromossomo como sugerido pela análise de FISH. Esse achado não valida o cariótipo realizado pelo laboratório privado pois a região duplicada está em outro cromossomo do grupo C e não no próprio cromossomo 17, como sugere esse cariótipo. Esses dados, juntamente com o cariótipo obtido pelo Laboratório de Genética da UnB corroboram a ideia de que há algum rearranjo na região do braço longo do cromossomo 17, porém, novos estudos com *FISH* a partir de metáfases mais alongadas precisam ser feitos a fim de caracterizar melhor o rearranjo.

A duplicação, ou mesmo os pontos de quebra da inversão ou inserção podem ter interrompido algum gene na região ou alterado a TAD desse locus gênico.

O segmento duplicado contém aproximadamente 90 genes indexados ao OMIM e que potencialmente contribuem para o quadro clínico do paciente. Entre eles, poucos genes parecem ter alguma indicação de atuação no sistema nervoso, como *HELZ* (OMIM 606699) e *METTL23* (OMIM 615262) que tem envolvimento na patogênese de deficiência intelectual (73; 74) e dois genes envolvidos na formação esquelética, *SOX9* (OMIM 608160) (75) e *BPTF* (OMIM 601819) (76). Esses genes, por si só, não podem ser responsáveis diretamente pelo quadro clínico apresentado pelo paciente 1, mas em conjunto explicam as manifestações clínicas do paciente, principalmente a região 17q25.3 que pode ser um loci gênico importante para o desenvolvimento cerebral (77).

4.5. CONCLUSÕES

O paciente 1 é portador de uma duplicação do braço longo do cromossomo 17 englobando os segmentos 17q24.2-q25.3. Essa duplicação está inserida em outro cromossomo ainda não definido podendo se tratar de rearranjo complexo com uma possível inversão no braço longo do cromossomo 17. O grande número de genes alterados explica o quadro clínico do paciente.

Capítulo 5.
CASO 2

5.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

O paciente 2 é filho de pais não consanguíneos. Foi encaminhado ao Serviço de Genética do HUB-UnB por suspeita de doença genética porque apresentava malformações múltiplas. Seu diagnóstico primário sugeria S. Acrocalosal. O paciente 2 nasceu após gestação de 38 semanas e cinco dias de parto cesáreo pesando 3.070 g e medindo 51 cm com dificuldade respiratória e icterícia. Ficou internado por 20 dias na maternidade porque apresentava preferência pelo lado direito com movimentos lentos no lado esquerdo e rigidez.

Apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (andou com três anos de idade). Ao exame clínico, aos quatro anos, foi observada macrocefalia (PC = 54 cm; $p > 98^\circ$) – também presente em ambos os genitores (Mãe PC = 58 cm; $p > 98^\circ$ / Pai PC = 63 cm; $p > 98^\circ$) –, hipertelorismo (DII = 3,2 mm; DIE = 9,0 mm; $p > 97^\circ$ ambos), fronte ampla com implantação irregular do cabelo, fendas palpebrais oblíquas para baixo e estreitas, sobrancelhas arqueadas e orelhas rodadas para trás com concha lisa. Além disso tinha uma raiz nasal baixa, filtro médio e ponta globosa e boca em forma de arco de cupido, com lábio superior protruso, além de retrognatia e pescoço curto.

Nas mãos apresentava prega palmar única na mão direita sem prega tenar e presença de prega palmar única com esboço de prega tenar na mão esquerda. Constatou-se também sindactilia cutânea parcial entre o segundo e o terceiro dígitos na mão direita e entre o terceiro e quarto dígitos na mão esquerda. Em ambos os pés, o paciente apresentava polidactilia pré-axial.

Exames de tomografia e de ressonância do crânio do paciente 2, mostraram que existe um encurtamento e afilamento da porção do esplênio do corpo caloso com consequente alongamento do átrio e do corno posterior dos ventrículos laterais além de ausência do septo pelúcido e situação baixa do fórnix.

Pelo histórico familiar, há também a informação de que os pais tiveram um feto com múltiplas malformações e polidactilia pós-axial que veio a óbito 18 dias após o parto depois de aproximadamente oito meses de gestação. Há ainda outra criança que apresenta desenvolvimento normal.

5.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO

O exame de cariótipo realizado na amostra do paciente revelou uma inversão pericêntrica de um cromossomo 7, entre o braço curto (p13) e o braço longo (q36), determinando o cariótipo: 46,XY,inv(7)(p13;q36). O pai do paciente também apresentou a mesma alteração ao cariótipo que o filho, mostrando que essa inversão foi herdada.

O resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 2 mostrou uma deleção na região 7p14.1-p12.3 (40,607,731-45,408,798 bp, hg19) de 4,8 Mb de extensão, herdada do pai. Essa região inclui o gene *GLI3* (*Gli Family Zinc Finger 3*) (OMIM 165240), que é o responsável pelo quadro clínico apresentado pelo paciente (Figura 18).

O gene *GLI3*, quando alterado causa uma haploinsuficiência da proteína e está relacionada com o desenvolvimento da síndrome de cefalopolisindactilia de Greig (OMIM 175700), cujos sintomas estão presentes no paciente 2, como: macrocrania, hipertelorismo e polisindactilia (78).

O pai do paciente é portador da inversão e apresenta também manifestações da síndrome como macrocrania e sindactilia.

Cromossomo 7

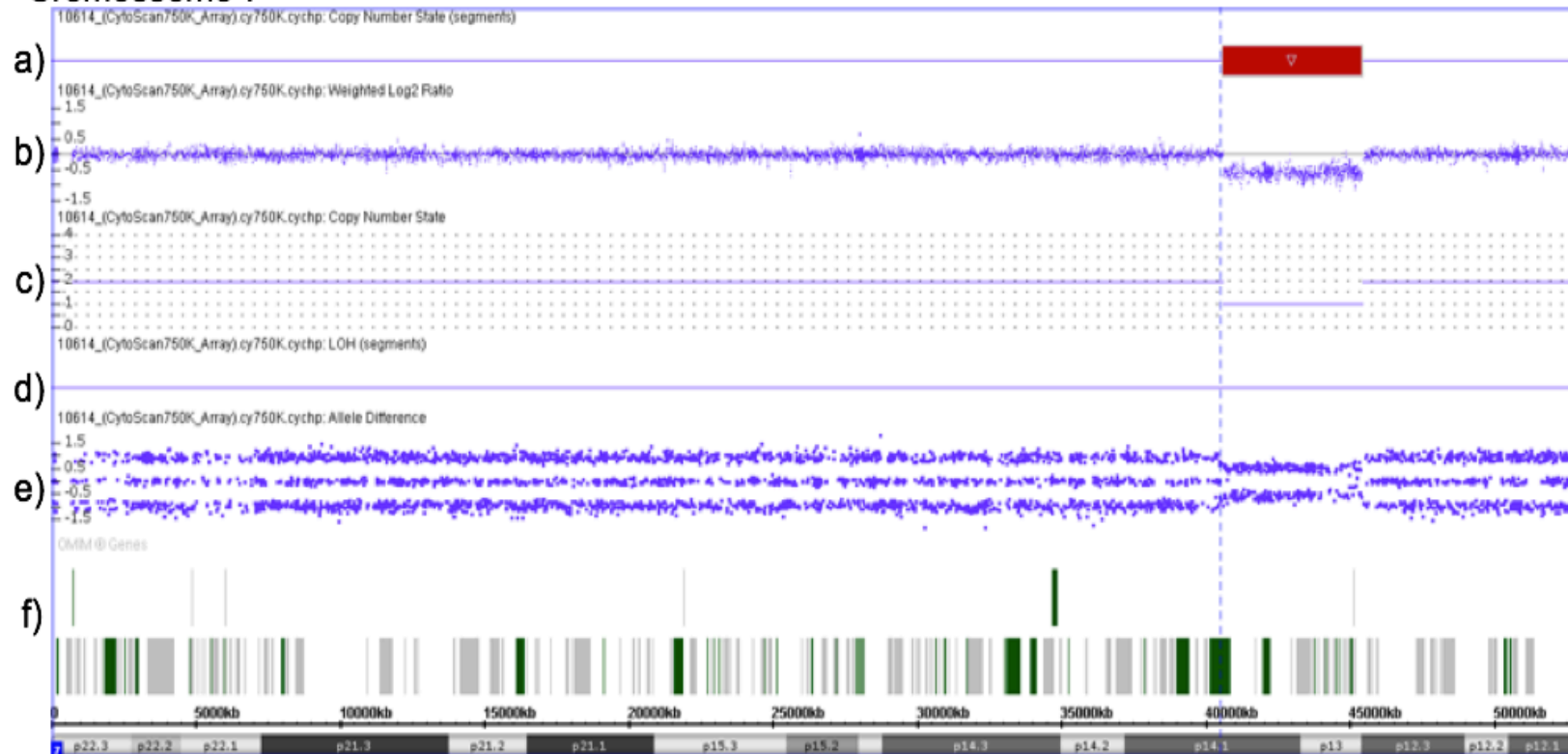


Figura 18. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 2. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de deleção na região do braço curto do cromossomo 7p14.1-p12.3 (40,607,731-45,408,798 bp, hg19), que inclui o gene *GLI3*, responsável pelo quadro clínico apresentado. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da deleção as sondas correspondentes aparecem em menor quantidade do que o normal. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na região da deleção há uma cópia para essa região de sondas. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região da deleção há apenas duas linhas. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

5.3. DISCUSSÃO

O exame de cariótipo feito nas metáfases do paciente 2 evidenciou uma inversão pericêntrica no cromossomo 7. A análise cromossômica por microarranjo do paciente 2 mostrou que ele apresenta uma deleção intersticial no cromossomo 7p, na região que inclui o gene *GLI3* (*gli family zing finger 3*) e, provavelmente, a haploinsuficiência deste gene seja o responsável pelo quadro clínico apresentado por ele. Esse segmento pode ter se perdido na região do ponto de quebra da inversão.

O gene *GLI3*, quando mutado, causa cefalopolisindactilia de Greig (GCPS), primeiramente descoberta por Greig em 1928 (79). Essa síndrome apresenta herança autossômica dominante e afeta a formação dos membros e desenvolvimento craniofacial (80; 81).

Suas principais características incluem macrocefalia, testa proeminente ou larga (82), hipertelorismo, ponte nasal larga, malformações nos membros, principalmente polidactilia das mãos e dos pés pré- ou pós-axial com duplicação ou não dos polegares e dos halluces (82), e sindactilia cutânea dos dedos das mãos e dos pés (81). Essas características podem variar em cada caso, apesar de apresentar alta penetrância (82). Essa síndrome também pode ser associada a deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento (81) e malformações no corpo caloso e ventriculomegalia (82).

O gene *GLI3*, localizado no cromossomo 7p14.1 codifica um fator de transcrição do tipo *zinc-finger* expresso precocemente durante o desenvolvimento (83), tem efeito pleiotrópico e é um regulador *downstream* da via *sonic hedgehog* (82). Essa via apresenta diversos genes que causam fenótipos anormais quando mutados, como *SHH* (*sonic hedgehog*) (83). Quando na presença de SHH, GLI3 funciona como um ativador transcricional (GLI3A) (78), enquanto que na ausência de SHH, ele é clivado para produzir um repressor (GLI3R) (78)(83).

O paciente 2, como já mostrado, apresenta as principais características associadas à síndrome GCPS, sendo a macrocefalia, hipertelorismo e polidactilia pré-axial em ambos os pés, halluces largos e duplicados, sindactilia cutânea parcial entre o segundo e o terceiro dígitos na mão direita e entre o terceiro e quarto dígitos na mão esquerda. Além disso, ele também apresenta características relacionadas com a síndrome, porém pouco relatadas, como o atraso no desenvolvimento psicomotor e malformação no corpo caloso. Seu pai também apresenta quadro clínico semelhante.

A deleção no cromossomo 7p14.1-p12.3 mostrada no paciente, tem uma extensão de aproximadamente 4,2 Mb e inclui todo o gene *GLI3*, assim como outros próximos a ele. Na literatura, há uma convenção em que deleções maiores que 1 Mb na região e que incluem outros genes além de *GLI3*, correspondem a síndrome de cefalopolisindactilia de Greig de genes contíguos (GCPS-CGS) (84). Acredita-se que o tamanho da deleção está correlacionado com a gravidade da doença (84).

5.4. CONCLUSÕES

O paciente 2 é portador de uma inversão pericêntrica do cromossomo 7 46,XY,inv(7)(p13;q36), herdada do pai também afetado. Além da inversão, há a perda de um segmento de DNA na banda 7p14.1-p12.3, que pode ter sido perdida durante a formação da inversão.

No segmento deletado está mapeado o gene *GLI3*, já descrito na literatura como causa da Cefalopolissindactilia de Greig, cujas características principais estão presentes no paciente 2: macrocrania, sindactilia e hipertelorismo. Dessa forma, a identificação de uma deleção incluindo esse gene explica o quadro clínico do paciente e seu pai.

Capítulo 6.
CASO 3

6.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

A paciente 3 compareceu inicialmente ao Serviço de Genética para avaliação de seu filho que apresenta deficiência intelectual grave e múltiplas malformações. O menino apresenta um cromossomo extranumerário formado por segmentos duplicados advindos de uma translocação der(9)t(2;9)(p25;q13) herdada da paciente 3.

A paciente 3, por sua vez, apresenta translocação equilibrada 46,XX,t(2;9)(p25;q13) e as seguintes características fenotípicas: deficiência intelectual moderada, baixa estatura ($p < 3^\circ$), prega palmar única, encurtamento do quinto dedo da mão esquerda e encurtamento dos 4^o e 5^o dedos do pé esquerdo. Ela afirmou que desistiu da escola quando ela tinha oito anos de idade porque apresentava dificuldades de aprendizagem – não consegue ler ou escrever e só conta até 10. A paciente ainda relatou que sua mãe, irmão e avô materno apresentavam deficiência intelectual, mas não estavam disponíveis para avaliação médica.

O filho da paciente 3 nasceu após aproximadamente nove meses de gestação com agravos (mãe com hipertensão gestacional) através de parto cesáreo e permaneceu na maternidade por dois anos. Nasceu com hipotonia, com desconforto respiratório e evoluiu com anemia e pneumonia. Sentou com um ano, andou com três anos, não fala até hoje (11 anos de idade) e ainda utiliza fraldas (11 anos de idade).

Foi avaliado aos 11 anos de idade no Serviço de Genética a primeira vez e ao exame clínico foi visto braquicefalia, fronte ampla, implantação alta dos cabelos na fonte, sobrancelhas ralas, fendas palpebrais retas, raiz nasal alta, dorso nasal reto, columela curta, macrostomia aparente, orelhas proeminentes. Mãos com prega palmar única e hiperextensibilidade articular. Membros inferiores com aumento da distância entre os 1^o e 2^o pododáctilos e encurtamento dos háluces, com implantação profunda de unhas bilateralmente. Tem deficiência intelectual grave, é auto agressivo e inquieto. Apresentou crises convulsivas controlada com Gardenal. Teve cardiopatia congênita.

A paciente 3 tem ainda outros dois filhos que foram considerados normais.

6.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.

Exame de cariótipo foi realizado em amostras de DNA da paciente 3 e de seu filho e o resultado mostrou os seguintes cariótipos, respectivamente: 46,XX,t(2;9)(p25;q13) e 47,XY,+der(9)t(2;9)(p25;q13)mat. O filho apresenta um cromossomo extranumerário formado por regiões de ambos os cromossomos envolvidos no rearranjo descrito (Figura 19).

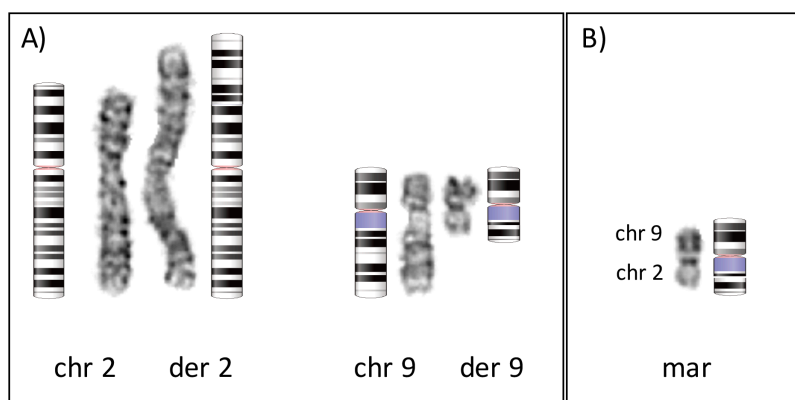


Figura 19. Translocação apresentada na paciente 3 (A) e no seu filho (B). A) Cariótipo e representação diagramática da translocação equilibrada entre os cromossomos 2 e 9 identificada no DNA da paciente 3. B) Cariótipo e representação diagramática de um cromossomo derivativo extranumerário – marcador – encontrado no filho.

A análise cromossômica por microarranjo na paciente não mostrou ganho ou perda de segmentos cromossômicos (Figura 20). No entanto, a análise do filho mostrou uma duplicação parcial do braço curto do cromossomo 2 e uma duplicação de todo o braço curto do cromossomo 9: 2p25.3p25.1 (12,770-8,187,008)x3 (hg19) e 9p24.3q13 (208,454-68,358,120)x3 (hg19) (Figura 21).

A região do ponto de quebra no cromossomo 2 interrompe o gene *LINC00299* (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 299), entre o penúltimo e o último éxon (Figura 22). Já no cromossomo 9, a região da quebra inclui o braço curto e uma parte da região centromérica, não especificada. (Figura 23).



Figura 20. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 3, a qual apresenta uma translocação equilibrada entre os cromossomos 2 e 9. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 2 e 9 da paciente 3. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos. f) faixa de genes descritos na região em hg19.



tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região de duplicação há uma quarta linha nessa região. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

Figura 21. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do filho da paciente 3. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de duplicação no cromossomo 2 e 9, como segue: 2p25.3p25.1 (12,770-8,187,008)x3 (hg19) e 9p24.3q13 (208,454-68,358,120)x3 (hg19). b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da duplicação no cromossomo 2, as sondas correspondentes aparecem em maior quantidade do que o normal. Note-se também, que na região da duplicação no cromossomo 9, as sondas também aparecem em maior quantidade que o normal, mas nesse caso, não podemos saber exatamente onde termina essa duplicação pois envolve o braço curto e parte de uma região centromérica e/ou de heterocromatina, que apresenta sequencias de DNA repetitivo. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na região da duplicação há três cópias para essa região de sondas em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presentes. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região de duplicação há uma quarta linha nessa região. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

Cromossomo 2

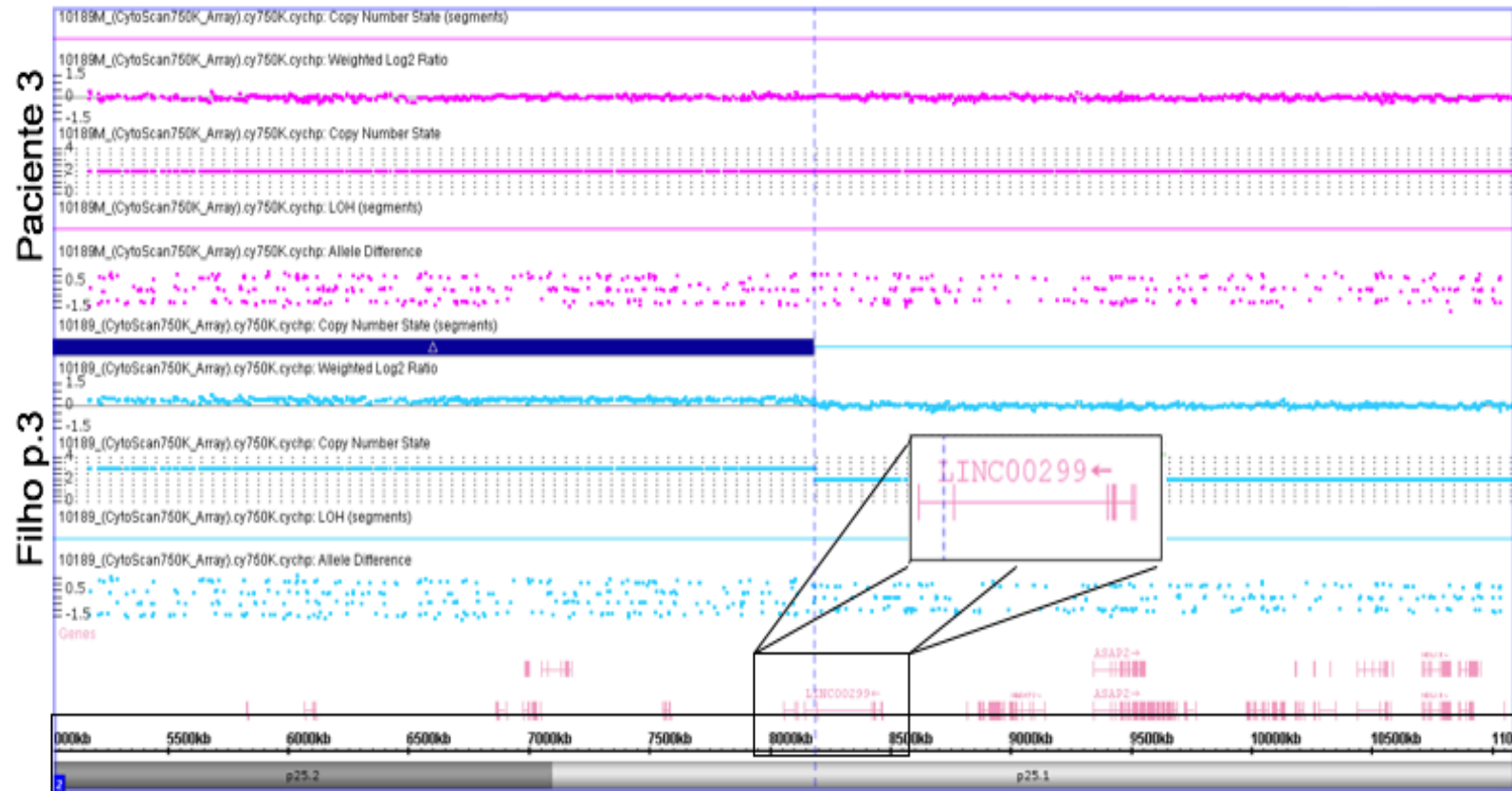


Figura 22. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 3 (em rosa) em comparação com o resultado do filho da paciente 3 (em azul), mostrando o ponto de quebra no cromossomo 2p25.3p25.1 (12,770-8,187,008 bp, hg 19)x3 no microarranjo do filho, que atinge a região entre os dois últimos éxons do gene *LINC00299*.



Figura 23. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 3 (em rosa) em comparação com o resultado do filho da paciente 3 (em azul), mostrando o ponto de quebra no cromossomo 9p24.3q13 (208,454-68,358,120, hg 19)x3 no microarranjo do seu filho, que atinge o braço curto e parte da região centromérica e/ou heterocromatina, não especificada por se tratar de uma região de sequencias repetitivas de DNA.

6.3. DISCUSSÃO

A paciente 3 apresenta uma translocação equilibrada identificada ao cariótipo. Essa translocação envolve os cromossomos 2 e 9. Seu filho herdou a translocação não equilibrada apresentando um cromossomo extranumerário formado por segmentos dos cromossomos 2 e 9.

De acordo com a análise de microarranjo, a região do ponto de quebra no cromossomo 2 interrompe o gene *LINC00299*, localizado na região 2p25.1 (8,147,901-8,468,549, hg19). Os lncRNAs representam uma categoria de RNAs não codificantes regulatórios e tem por características apresentarem mais de 200 nucleotídeos, distanciarem cerca de 10 kb de genes codificantes (85) e não apresentarem um quadro de leitura aberta.

Os lncRNAs atuam em diversos processos biológicos como, por exemplo, diferenciação celular e terapêutica em casos de doenças autoimunes (86), osteogênese, atividade supressora de tumor (87), remodelamento de tecido cardíaco após processos patológicos (88) e, além disso, também são expressos em inúmeros tipos de cânceres, como carcinoma nasofaríngeo (89), câncer de próstata (90), carcinoma hepatocelular (91) e outros.

A respeito do sistema nervoso central (SNC), aproximadamente 800 lncRNAs são expressos em regiões e células específicas presentes no SNC de camundongos (92). Entre as suas funções neste sistema estão: diferenciação neuronal (93), plasticidade neural (94) e desenvolvimento cerebral (95).

Disrupção do gene *LINC00299* foi descrita em um indivíduo com deficiência intelectual que apresentava uma translocação equilibrada entre os cromossomos 2 e 11 e cujo o ponto de quebra no cromossomo 2 incluía a parte final do gene (96). Esses autores descreveram também pacientes com pequenas CNVs que incluíam parte do gene e apresentavam transtornos do neurodesenvolvimento (96).

Além desse, outro indivíduo com desordem neurocognitiva apresentava uma anormalidade cromossômica que, entre pelo menos outros seis genes, também apresentava uma interrupção no gene *LINC00299*, fortalecendo a ideia de que este gene seja um gene responsável pela deficiência intelectual e neurodesenvolvimento anormal (97).

A variabilidade clínica e a gravidade dos fenótipos apresentados pela nossa paciente, seu filho e o outros estudos aqui citados, todos com interrupção no gene

LINC00299, pode estar relacionada à diversidade de isoformas e/ou à expressão temporal e espacial do RNA entre outras causas. Portanto, investigações futuras sobre o papel de *LINC00299* no desenvolvimento neurológico devem ser feitas a fim de compreender melhor seus efeitos patológicos.

6.4. CONCLUSÕES

A paciente 3 apresenta uma translocação equilibrada entre os cromossomos 2 e 9, cujo ponto de quebra pôde ser confirmado por meio da análise do CMA de seu filho, portador da mesma translocação na sua forma não equilibrada.

No ponto de quebra do cromossomo 2, a paciente 3 tem o gene *LINC00299* interrompido. Outros casos de disrupção de *LINC00299* foram relatados em indivíduos com deficiência intelectual.

Esse caso corrobora, portanto, o papel do gene *LINC00299* como causa de deficiência intelectual (Anexo I).

Capítulo 7.
CASO 4

7.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

O paciente 4 é filho de pais consanguíneos, primos em primeiro grau e foi encaminhado para o Serviço de Genética por suspeita de doença genética por apresentar deficiência intelectual moderada, com atraso no desenvolvimento psicomotor e cognitivo. Seu diagnóstico primário era deficiência intelectual moderada por cromossomopatia.

Nasceu após gestação normal a termo com aproximadamente nove meses através de parto normal, pesando 3.200 g e com estatura de 50 cm e perímetro cefálico de 36 cm. O paciente 4 sentou e engatinhou com sete meses, andou após dois anos, falou as primeiras palavras com um ano e formulou frases com dois anos.

No exame físico aos 11 anos apresentava macrossomia (PC = 58,2 cm; p > 98°; E = 162,5 cm; p > 97°; P = 45,4 kg; p = 90° - 97°), hipoplasia de face média, fendas palpebrais oblíquas para baixo, nariz com raiz média, dorso largo e ponta bulbosa, tendência a deixar a boca entreaberta e língua protusa (sem macroglossia), palato alto e orelhas normoimplantadas. Apresentava prega palmar única à esquerda.

Faz acompanhamento com neurologista e utilizada medicamentos para tratar movimentos involuntários (tiques). Fez exames cardiológicos, oftalmológicos e abdominais todos com resultados normais.

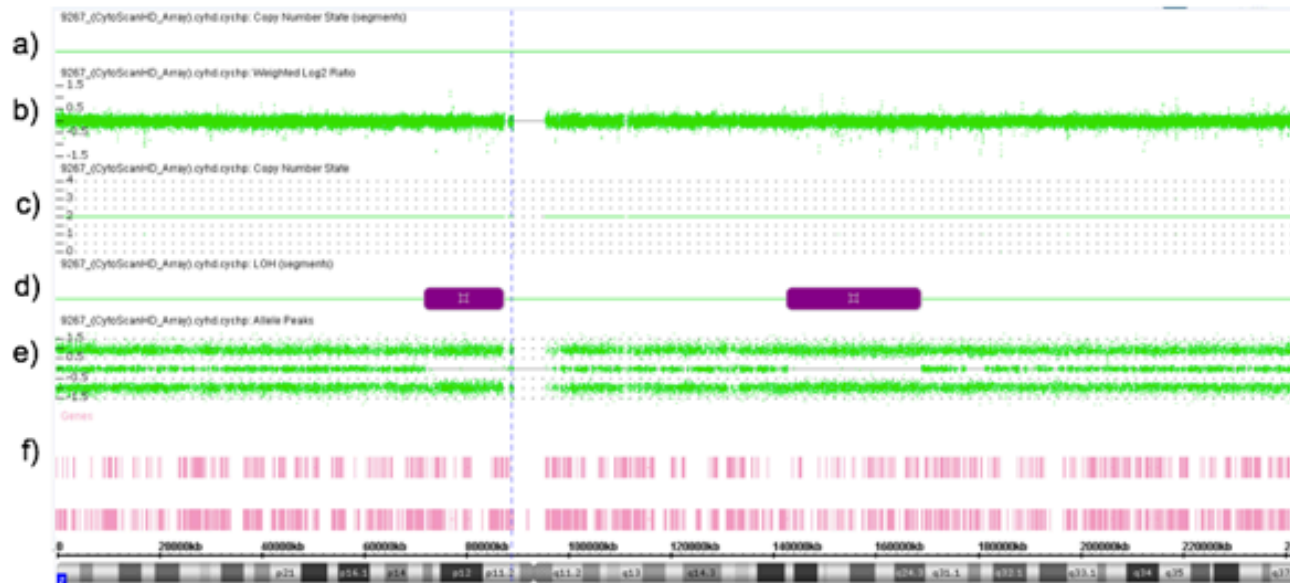
7.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.

Foi solicitado o cariótipo do paciente, de sua irmã e de seus pais. No resultado, constatou-se uma translocação aparentemente equilibrada, envolvendo os cromossomos 2 e 11 como segue: 46,XY,t(2;11)(q13;q12.1). A irmã do paciente também apresentou a mesma translocação, (46,XX,t(2;11)(q13;q12.1), e demonstrou ter dificuldades escolares. Ambos genitores, que são consanguíneos, são portadores da translocação. Dessa forma, pode-se concluir que este rearranjo foi herdado de um dos pais. A mãe apresentava comportamento semelhante ao do paciente: desviava o olhar e se assemelhava fisicamente a ele, além de ter relatado apresentar dificuldade de aprendizado. O pai era considerado normal.

A análise cromossômica por microarranjo não identificou deleções ou duplicações associadas aos cromossomos 2 e 11 confirmando que a translocação do

paciente é de fato equilibrada (Figura 24). Devido à consanguinidade parental foram identificados diversos blocos de ausência de heterozigose.

Cromossomo 2



Cromossomo 11

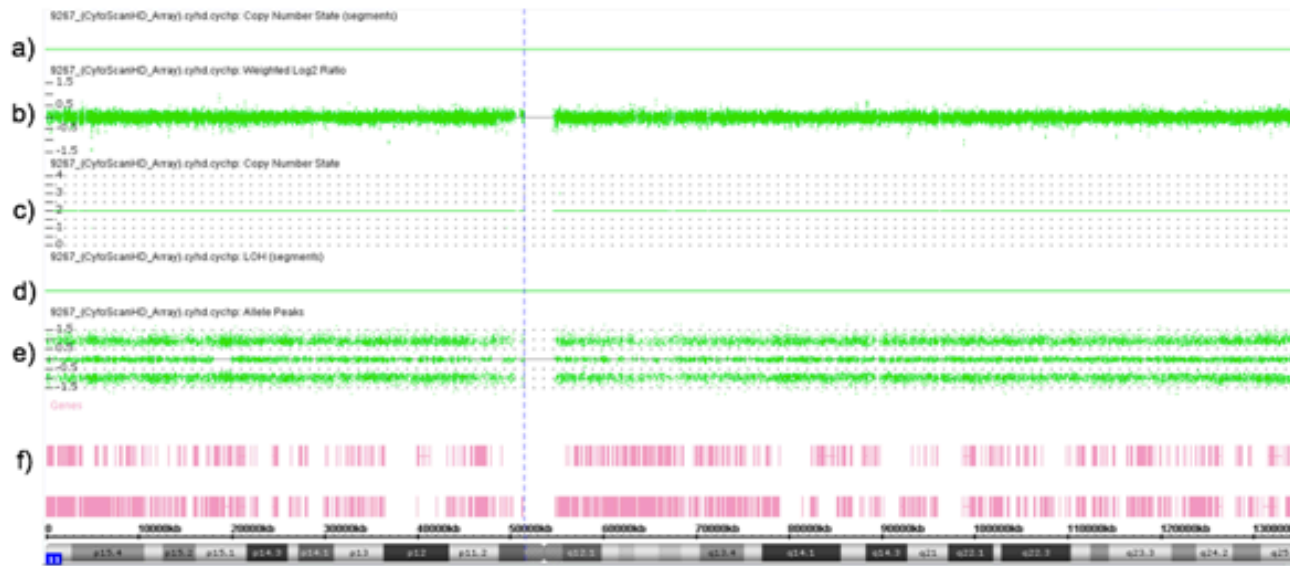


Figura 24. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 4. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 2 e 9 do paciente 4. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose (LOH). Nota-se dois blocos de ausência de heterozigose no cromossomo 2 do paciente 4, muito provavelmente devido à consanguinidade dos seus genitores. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos, exceto nas regiões de LOH, em que está ausente o genótipo heterozigoto. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

7.3. RESULTADO DA ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO *MATE-PAIR*

O sequenciamento *mate-pair* resultou em dois pontos de quebra nos cromossomos 2 e 11, confirmando o achado do cariótipo. No cromossomo 2, o ponto de quebra foi localizado entre as posições chr2: 119,874,759-119,874,835 (hg38) e apresenta em torno de 76 bp de extensão, e está dentro da banda 2q14.2. Esse ponto de quebra interrompe uma região intrônica entre os éxons 3 e 4 do gene *PTPN4* (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4*) (OMIM 176978) (Figura 25).

Já o ponto de quebra localizado no cromossomo 11 contempla uma região maior que a do cromossomo 2 e foi localizado na posição chr11:57,242,420-57,243,202 (hg38), com aproximadamente 0,8 kb de extensão, e está dentro da banda 11q12.1, muito próxima à região centromérica deste cromossomo. Nessa região não há genes referenciados. Há, entretanto, um gene chamado *APLNR* (*Apelin Receptor*) (OMIM 600052) *upstream* à região da quebra e distante desta em torno de 5 kb (Figura 26).

O sequenciamento Sanger para definição precisa dos pontos de quebra ainda está em andamento.

Cromossomo: 2

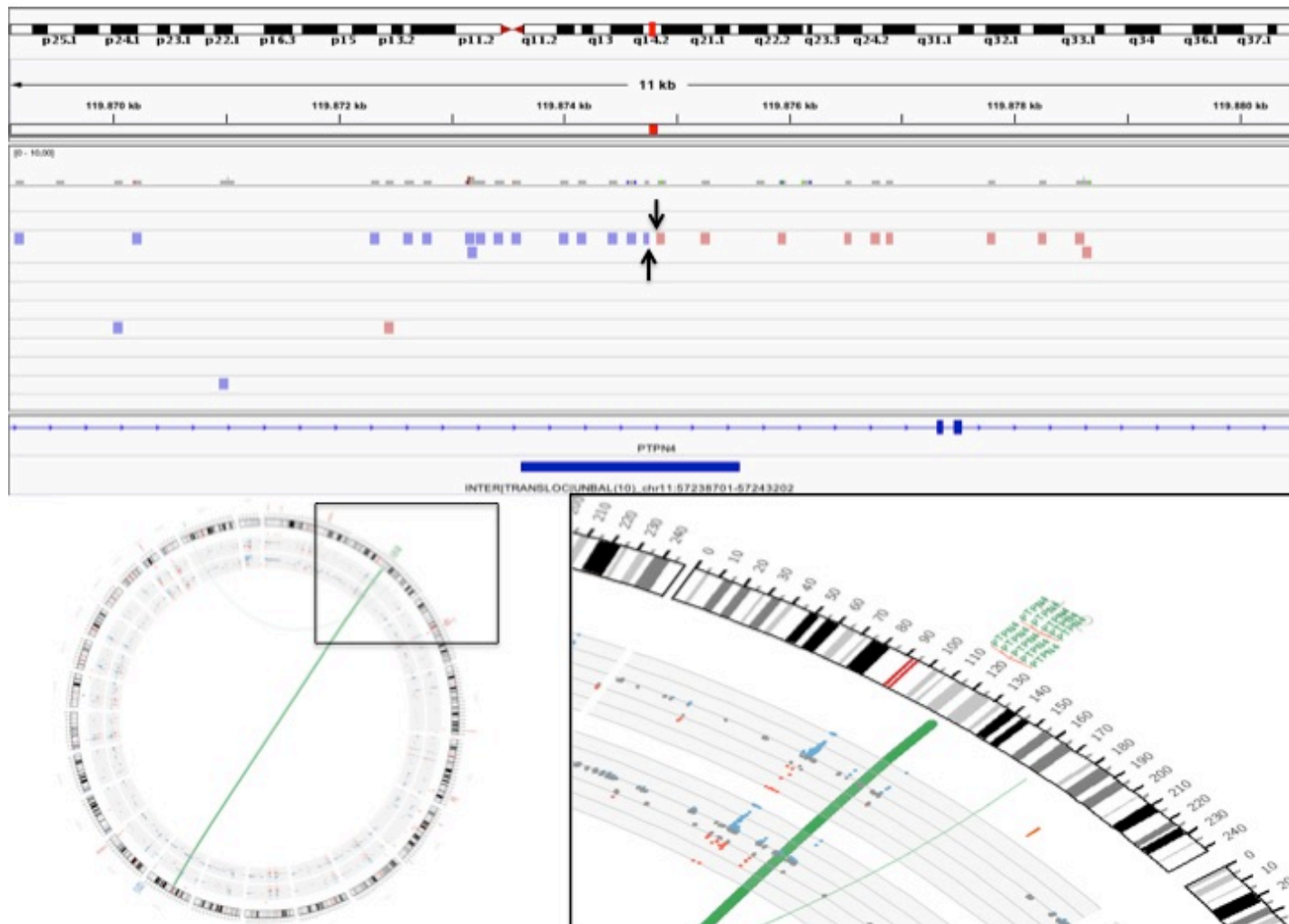


Figura 25. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 2 (chr2:119,874,759-119,874,835 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra do paciente 4. As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde representa uma translocação entre os cromossomos 2 (detalhe) e 11. No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *PTPN4* na região do ponto de quebra.

Cromossomo: 11

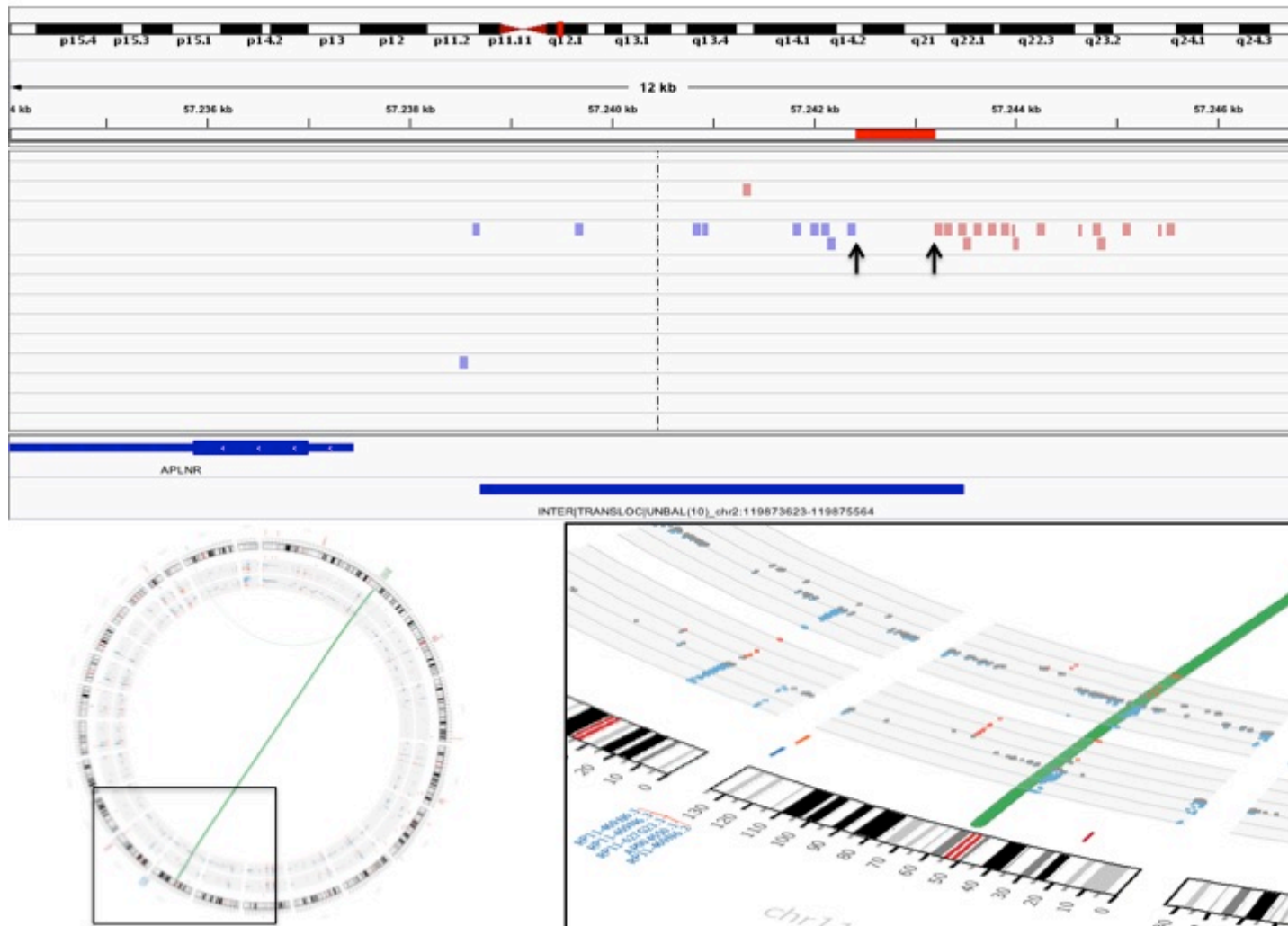


Figura 26. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 11 (chr11:57,242,420-57,243,202 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presente na amostra do paciente 4. As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde representa uma translocação entre os cromossomos 2 e 11 (detalhe).

7.4. DISCUSSÃO

No caso do paciente 4 foram realizados exame de cariótipo, cujo resultado mostrou um cariótipo anormal, com uma translocação aparentemente equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 2 e 11; e, posteriormente foi realizado a análise por microarranjo que não revelou microdeleções ou duplicações no DNA, atribuindo a essa translocação o status de equilibrada.

O sequenciamento de nova geração foi estabelecido na amostra e somente dois pontos de quebra foram encontrados nos cromossomos envolvidos na translocação, sem outros achados.

O ponto de quebra encontrado pela análise de NGS-*mate-pair* no cromossomo 2, o gene *PTPN4* – também conhecido como *PTPMEG*, *MEG*, *PTPMEG1* – codifica uma proteína que faz parte da família de fosfatases de tirosina (*protein tyrosine phosphatase* – *PTP*). As proteínas dessa família são conhecidas por atuarem em diversos processos biológicos como o crescimento e diferenciação celular, além de atuarem no ciclo celular e ter papel na regulação oncogênica (98). *PTPN4* está expresso em diversos tecidos e órgãos, incluindo alta expressão em regiões do cérebro, como o córtex cerebral e áreas do cerebelo (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000088179-PTPN4/tissue>. Acesso em 07.02.19). Sua proteína *PTPN4* tem função na aprendizagem, memória espacial e na plasticidade sináptica cerebelar (98).

Estudos com *Drosophila melanogaster* e camundongos sugerem que *Ptpn4* tem papel fundamental no desenvolvimento neuronal. No caso da *D. melanogaster*, foi descoberto que essa proteína (*Ptpmeg*) contribui para a estabilização e manutenção das projeções axonais no cérebro central da *D. melanogaster*, de forma que a formação do anel axônico no corpo elipsoide não fica completo na ausência de *Ptpmeg* (99). O fenótipo *knockout* para *Ptpmeg* manifestou defeitos no desenvolvimento axonal (99; 100). Já no caso de camundongos, foi demonstrado que camundongos *knockout* para *PTPMEG* mostraram deficiências na capacidade de aprendizado motor e na plasticidade cerebelar (101). Para corroborar com esses achados, foi demonstrado ainda, que a proteína *Ptpmeg* interage com os receptores de glutamato, seletivamente expressos nas células de purkinje no cerebelo (102).

Além disso, há relato de três indivíduos que apresentam defeitos na expressão de *PTPN4*. No primeiro relato, duas irmãs gêmeas monozigóticas apresentavam uma

deleção *de novo* na banda 2q14.2 que incluía somente o gene *PTPN4*, identificada pela análise comparativa por microarranjo e seu quadro clínico sugeria uma desordem de desenvolvimento neurológico (100). O segundo caso descrevia um paciente com atraso no desenvolvimento, características do espectro autista, hipotonia, aumento de imunoglobulina E (IgE) e problemas dentais, que apresentava uma variante do tipo missense de *PTPN4* (Leu72Ser/c.215 T>C) (98). Um experimento funcional mostrou que *PTPN4* não estava presente nas espinhas dendríticas deste paciente, atestando que essa variante teve relação direta com o desenvolvimento neurológico do paciente (98).

A Tabela 2 mostra que o paciente 4 apresenta em torno de 67 % das características mencionadas em pelo menos um dos outros dois casos já relatados e os três casos apresentam as seguintes características em comum: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, movimentos involuntários nas mãos ou tiques e problemas na fala. Essas características indicam que o gene candidato para o caso do paciente 4 apresenta sim importância no funcionamento ordenado do sistema nervoso central.

Tabela 2. Comparação de características clínicas encontradas entre os dois casos de alteração em *PTPN4* já relatados na literatura com os achados no paciente 5.

Características	Williamson et al., 2005	Szczatuba et al., 2018	Paciente 4
Alterações de comportamento	S/R	S/R	Agressivo
Anormalidades na boca	+	-	+
Anormalidades no crânio	+	-	+
Atraso no desenvolvimento psicomotor	+	+	+
Baixa estatura	+	-	-
Boca entreaberta	+	-	+
Deficiência intelectual	-	-	+
Epilepsia	+	-	-
Evita contato visual	-	+	+
Hipoplasia face média	-	-	+
Hipotonia	-	+	-
Macrossomia	-	-	+
Movimentos involuntários mãos/tiques	+	+	+
Palato alto/estreito	+	-	+
Prega palmar única	-	-	+
Problemas na alimentação	+	+	-
Problemas dentários	+	+	-
Problemas na fala	+	+	+
Outras características	4º metatarso curto	Aumento de IgE	Fendas palpebrais oblíquas para baixo

S/R = sem registro; + = presente; - = ausente

7.5. CONCLUSÕES

Apesar dos poucos relatos na literatura relacionando a atuação e função de *PTPN4* em determinada patologia genética humana, todos as informações e dados supracitados corroboram a ideia de que *PTPN4* desempenha papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central, atuando principalmente nas regiões do córtex cerebral e na plasticidade sináptica do cerebelo.

Ao comparar o quadro clínico do paciente 4 com os outros dois casos relatados, todos apresentam atraso no desenvolvimento e alterações do gene *PTPN4*, sugerindo fortemente que a interrupção desse gene pode levar a falha no desenvolvimento do sistema nervoso por haploinsuficiência, indicando o mesmo como potencial gene candidato para o quadro clínico apresentado pelo paciente 4.

Capítulo 8.
CASOS 5 E 6

8.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

As pacientes 5 e 6 são irmãs gêmeas monozigóticas, filhas de pais não-consanguíneos e foram encaminhadas ao Serviço de Genética por suspeita de doença genética por malformação isolada.

As pacientes 5 e 6 nasceram após gestação com agravos (mãe apresentou pressão descontrolada, anemia e plaquetopenia) com duração de 36 semanas e quatro dias por meio de parto cesáreo. A paciente 5 nasceu com 1.700 g de peso, 38 cm de estatura e 31,5 cm de perímetro cefálico. A paciente 6 nasceu com 1.670 g de peso, 39 cm de estatura e 31,5 cm de perímetro cefálico. Ambas ficaram internadas no hospital durante dois meses e, nesse período fizeram fototerapia.

Foram avaliadas primeiramente aos dois anos de idade. A paciente 5 apresentava 6.805 g de peso ($p << 3^\circ$), 72 cm de altura ($p << 3^\circ$) e perímetro cefálico de 46,5 cm (p10-p25). A paciente 6 apresentava 6.755 g de peso ($p << 3^\circ$), estatura de 72 cm ($p << 3^\circ$) e perímetro cefálico de 45,5 cm (p5). Ambas apresentavam testa ampla e abaulada, macrocrania relativa, déficit de crescimento, vagina imperfurada, atopia e convulsões. Com um ano e cinco meses iniciaram crises convulsivas, em uso de fenobarbital.

Ambas as pacientes fizeram exames de eletroencefalograma (EEG) e tomografia do crânio (TC). Na paciente 5, o EEG revelou uma atividade irritativa focal na região occipital esquerda e o TC foi considerado normal, não identificando anormalidades intracranianas grosseiras. Na paciente 6, o EEG revelou uma atividade irritativa generalizada e o TC foi considerado normal.

8.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.

Nos exames de cariótipo das gêmeas, foi constatada uma translocação equilibrada entre os cromossomos 3 e 12 em ambas as pacientes, descritos como se segue: 46,XX,t(3;12)(q29;q14) *de novo*. O resultado do CMA não revelou alterações nos cromossomos envolvidos, conforme a Figura 27 mostra, sendo, portanto, uma translocação equilibrada.



Figura 27. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 5, irmã gêmea monozigótica da paciente 6. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 3 e 12 da paciente 5. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presentes. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

8.3. RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO *MATE-PAIR*

A análise dos dados de sequenciamento *mate-pair* das pacientes 5 e 6 permitiu identificar pontos de quebra nos dois cromossomos envolvidos na translocação encontrada pela análise do cariótipo. O ponto de quebra no cromossomo 3 está localizado em chr3:174,961,172-174,963,250 (hg38) e tem aproximadamente 2 kb de extensão. Essa região está dentro na banda 3q26.31 e interrompe o gene *NAALADL2* (*N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase-Like 2*) (OMIM 608806) em uma região intrônica logo após o primeiro éxon (Figura 28).

O ponto de quebra presente no cromossomo 12 tem sua posição na seguinte região cromossômica: chr12:65,849,728-65,851,528 (hg38), com aproximadamente 1,8 kb de extensão. Esse ponto de quebra faz parte da banda 12q14.3 e interrompe o gene *HMGA2* (*High Mobility Group At-Hook 2*) (OMIM 600698) entre os éxons 3 e 4 (Figura 29).

O sequenciamento Sanger para definição precisa dos pontos de quebra ainda está em andamento.

Cromossomo: 3

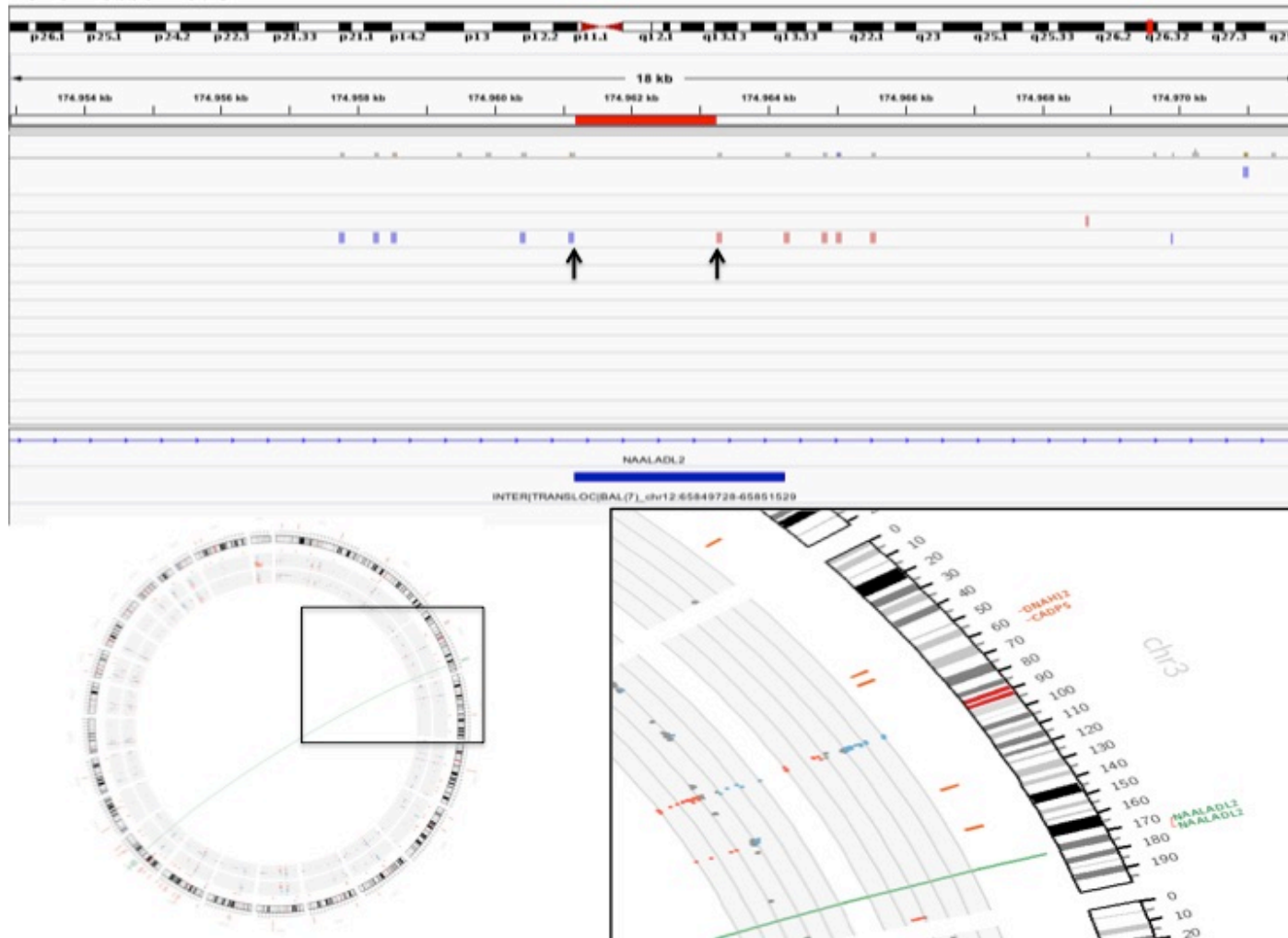


Figura 28. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 3 (chr3:174,961,172-174,963,250 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 5 e 6 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 6, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 5 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os cromossomos 3 (detalhe) e 12. No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *NAALADL2* na região de quebra.

Cromossomo: 12

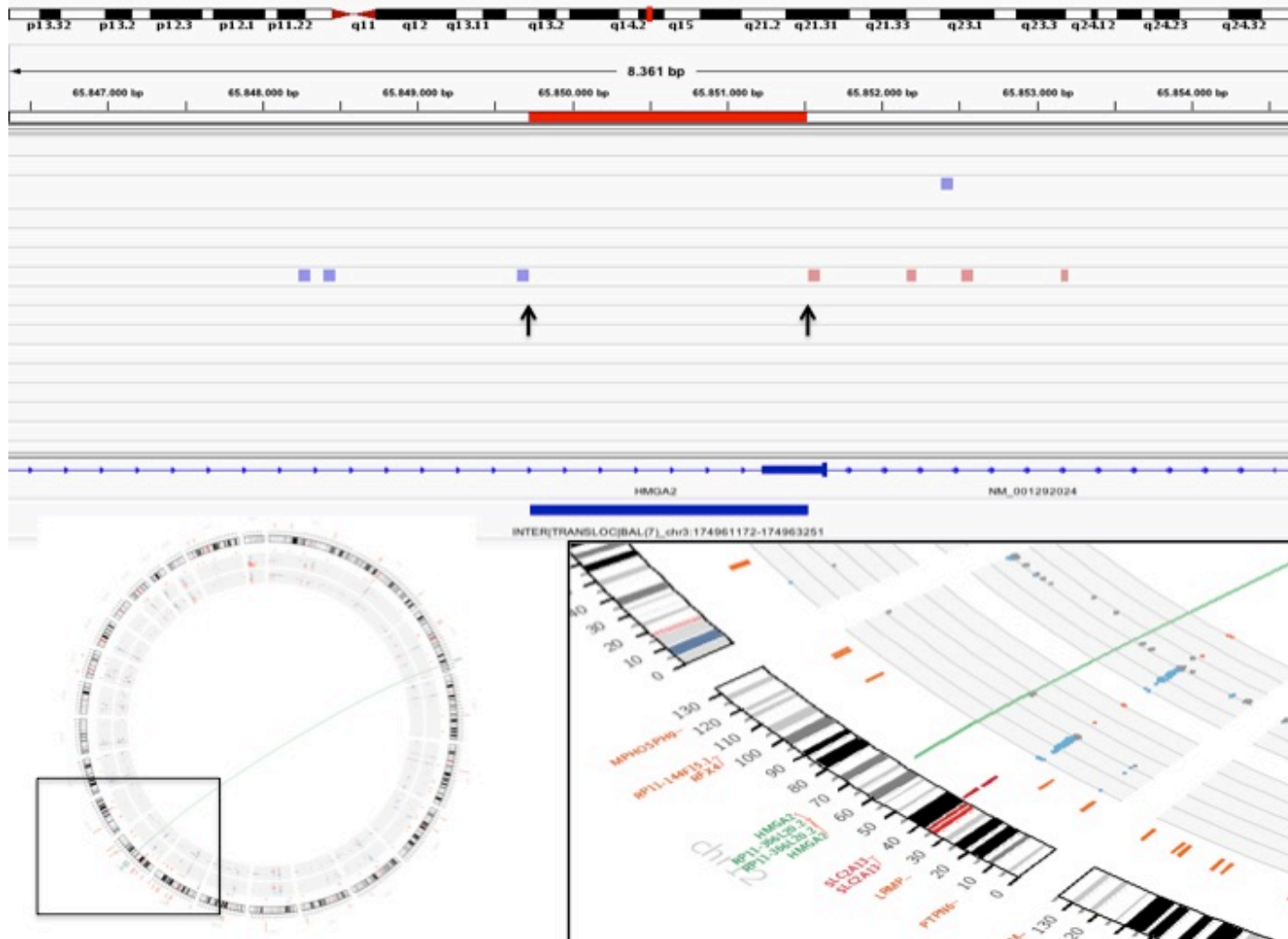


Figura 29. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 12 (chr12:65,851,728-65,851,528 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 5 e 6 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 6, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 5 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os cromossomos 3 e 12 (detalhe). No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *HMGA2* na região de quebra.

8.4. DISCUSSÃO

As pacientes 5 e 6 apresentaram uma translocação aparentemente equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 3 e 12 ao cariótipo, sem ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos identificados pela análise cromossômica por microarranjo.

O sequenciamento NGS-*mate-pair* revelou apenas dois pontos de quebra, sem a participação de outros cromossomos.

Dois genes foram interrompidos pelos pontos de quebra da translocação equilibrada entre os cromossomos 3 e 12. No ponto de quebra presente no cromossomo 3, o gene *NAALADL2* está interrompido. Esse gene pode ter um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central, uma vez que, sugere-se que sua proteína predita – NAALADL2 – seja estruturalmente similar à enzima glutamato carboxipeptidase II (GCPII), que está associada a várias condições patológicas relacionadas à excitotoxicidade por glutamato, por permitir a liberação excessiva de glutamato na fenda sináptica (103; 104). Essa excitotoxicidade glutamatérgica tem participação no desenvolvimento neural e também pode ser relacionado com diversas doenças agudas e crônicas do sistema nervoso central, incluindo convulsões e epilepsia (105), como apresentado pelas pacientes 5 e 6. Esse achado corrobora a ideia de que NAALADL2 pode ter algum papel na excitação de glutamato no cérebro.

Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o funcionamento da própria proteína e mais estudos precisam ser feitos, uma vez que, outros pesquisadores não encontraram correlações positivas para a atuação do gene *NAALADL2* com o funcionamento do sistema nervoso (106). Em uma análise de rearranjos em mais de 15 mil amostras foram encontradas seis deleções envolvendo o gene em questão na população controle e quatro nos pacientes examinados (106). Isso sugere que deleções envolvendo esse gene podem ser encontradas na população em geral e, portanto, pode não ser responsável direto por fenótipos clínicos.

Já no cromossomo 12, o ponto de quebra interrompe o gene *HMGA2*. As proteínas da família HMGA não desempenham um papel no organismo por si só. Elas atuam ligando-se no sulco menor de sequências de DNA ricas em adenina/timina por meio de seus domínios conhecidos como *AT-hook* e, com isso, alteram a estrutura da

cromatina pela interação com os complexos de transcrição, podendo alterar positiva ou negativamente a expressão de diversos genes (107).

O fenótipo pigmeu em camundongos tem relação direta à inativação desse gene – *Hmgi-c*, em camundongos, sugere-se que esse gene está envolvido com a proliferação celular, e, sendo assim, a sua ausência provocaria um decréscimo na proliferação celular e resultaria no tamanho reduzido de diversos tecidos, com exceção do tecido cerebral, já que seus experimentos não visualizaram uma baixa proliferação celular no cérebro, como nos outros tecidos testados (108).

Uma paciente japonesa que apresentava uma microdeleção na região 12q14.3-q15, incluindo o gene *HMGA2* também foi descrita (109). Essa paciente apresentava baixa estatura, mas não macrocefalia nem deficiência intelectual. Mutações do gene *HMGA2* foram também descritas em pacientes com baixa estatura. Os pesquisadores sugeriram então que a haploinsuficiência de *HMGA2* contribui para o fenótipo de baixa estatura e a haploinsuficiência de um gene localizado próximo à *HMGA2* contribui para o fenótipo de macrocefalia. Outros estudos corroboram a hipótese de que *HMGA2* seja um gene principal no desenvolvimento normal do crescimento (107)(110-112). Admite-se, inclusive, que este gene deve ser incluído como gene causativo da Síndrome de Silver-Russell (OMIM 180680), que tem como característica o déficit no crescimento pré e pós-natal, macrocefalia relativa, assimetria corporal e fácies características (113) algumas destas, presentes nas pacientes 5 e 6.

As pacientes 5 e 6 apresentam um quadro sugestivo de síndrome de Silver-Russell. A baixa estatura muito provavelmente se deve à interrupção do gene *HMGA2* no ponto de quebra do cromossomo 12 e a macrocefalia pode ser decorrente de alteração de uma região próxima à *HMGA2*. Essa alteração pode estar relacionada com um possível efeito de posição ou ainda, de uma alteração no TAD desse locus gênico.

Com relação à malformação relacionada a vagina imperfurada em ambas as pacientes, não foi possível relacionar sua clínica com o envolvimento com algum gene ou genes específicos na região da quebra ou próxima a ele.

8.5. CONCLUSÕES

As pacientes 5 e 6 apresentam uma translocação equilibrada entre os cromossomos 3 e 12, cujos pontos de quebra apresentam, cada um, um gene interrompido, sendo eles: *NAALADL2* e *HMGA2*, respectivamente. Conforme analisado, as características encontradas no quadro clínico das pacientes deste caso são compatíveis com outros casos descritos, principalmente a baixa estatura. Portanto, a interrupção desses genes explica o quadro clínico das pacientes e corrobora o papel do gene *HMGA2* como causa de fenótipos similares à síndrome de Silver-Russell.

Capítulo 9.
CASOS 7 E 8

9.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

As pacientes 7 e 8 são gêmeas monozigóticas, filhas de pais consanguíneos, primos em terceiro grau e há histórico extenso de consanguinidade na família. Elas foram encaminhadas ao Serviço de Genética por suspeita de doença genética por atraso neuromotor. O diagnóstico primário foi atraso na fala.

As pacientes 7 e 8 nasceram após 36 semanas de gestação sem intercorrências através de um parto cesáreo. A paciente 7 nasceu com 2.350 g de peso e 43 cm de estatura. Já a paciente 8 nasceu com 2.110 g de peso e 44 cm de estatura. Ambas ficaram na maternidade por uma semana e receberam tratamento para icterícia.

A paciente 7 sentou com nove meses, andou com um ano e nove meses e falou as primeiras palavras com três anos de idade. A paciente 8 sentou com mais de nove meses, andou com dois anos e falou as primeiras palavras com três anos de idade.

Ambas apresentavam atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e outras pequenas características compatíveis com o transtorno do espectro autista. O irmão mais novo delas, hoje com quatro anos de idade, também apresenta ADNPM (sentou com mais de nove meses; andou com um ano e quatro meses e tem atraso na fala).

Ao exame físico ambas as pacientes apresentavam bossa frontal, olhos com fendas oblíquas para cima, filtro médio, pés planos. Além disso, a paciente 9 apresentava estrabismo e miopia.

9.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.

O exame de cariótipo realizado em ambas as paciente mostrou que elas possuem uma translocação entre os cromossomos 9 e 20: 46,XX,t(9;20)(q22;q13.3),9qh+,9qh+ (Figura 30).

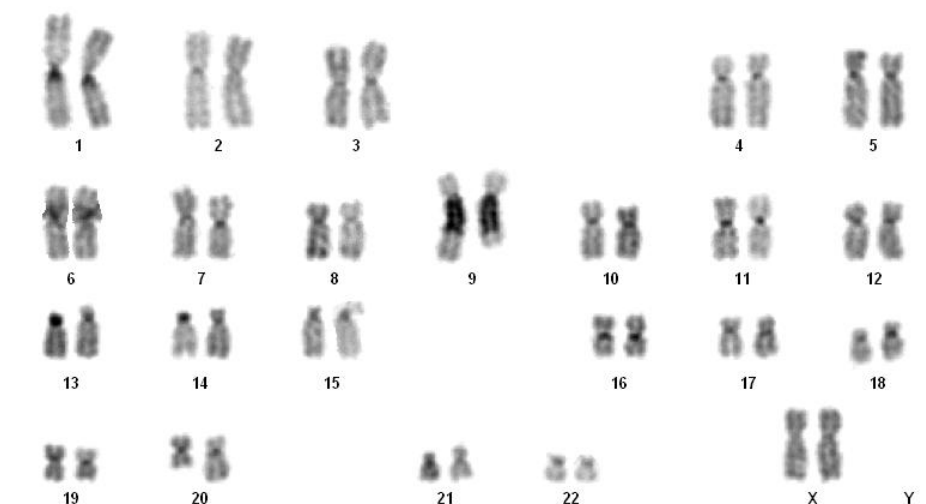


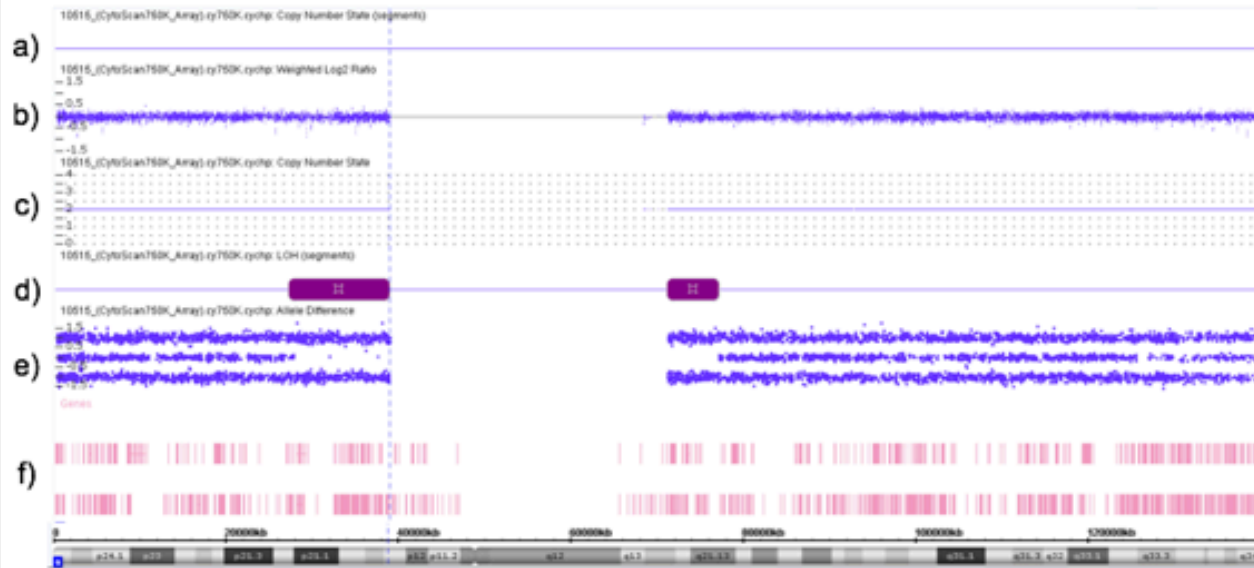
Figura 30. Cariótipo resultado da técnica de bandamento C referente a paciente 7, mostrando a translocação entre os cromossomos 9 e 20. A imagem foi cortesia do Hospital Sarah Kubitschek.

Há também um grande aumento da região de heterocromatina do cromossomo 9 em ambos os cromossomos 9 das pacientes (Fig. 30; Figura 31 e 32), sugestivo de ter sido herdado por ambos os pais, já que são consanguíneos e apresentam também esse aumento da heterocromatina pericentromérica.

Os pais e o irmão não são portadores da translocação, no entanto ambos apresentam um 9qh+. Esse aumento por si só não causa quadro clínico, mas é possível que esteja envolvido na formação do rearranjo.

Conforme mostram as Figura 31 e 32, em ambas as pacientes, os cromossomos envolvidos na translocação não apresentam deleções e duplicações significativas, confirmando que a translocação que carregam é do tipo equilibrada.

Cromossomo 9



Cromossomo 20

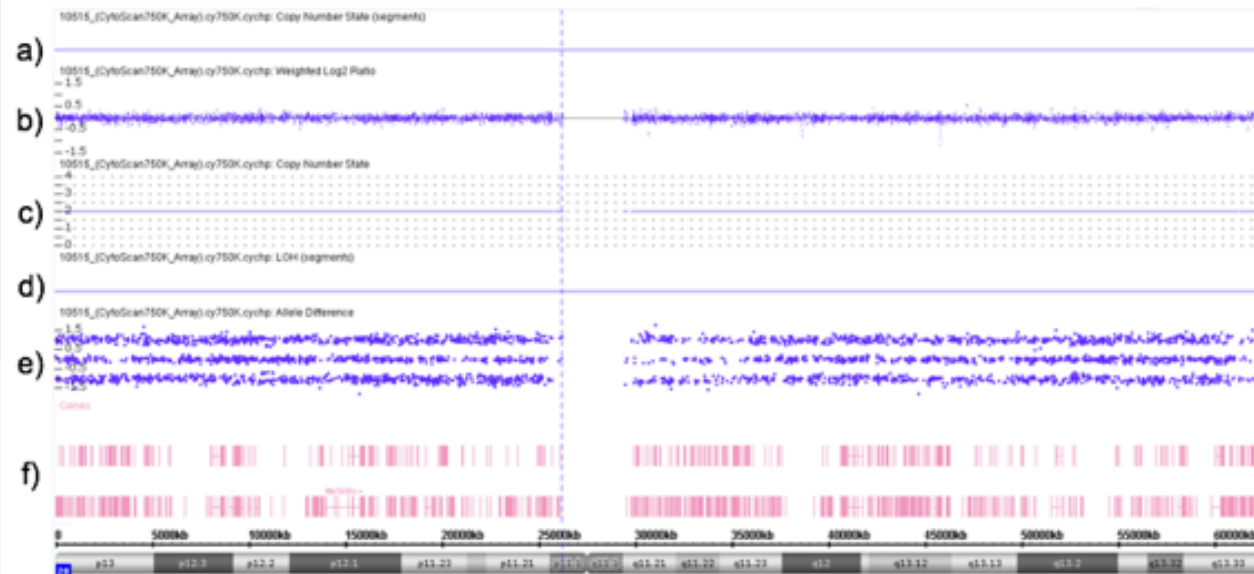
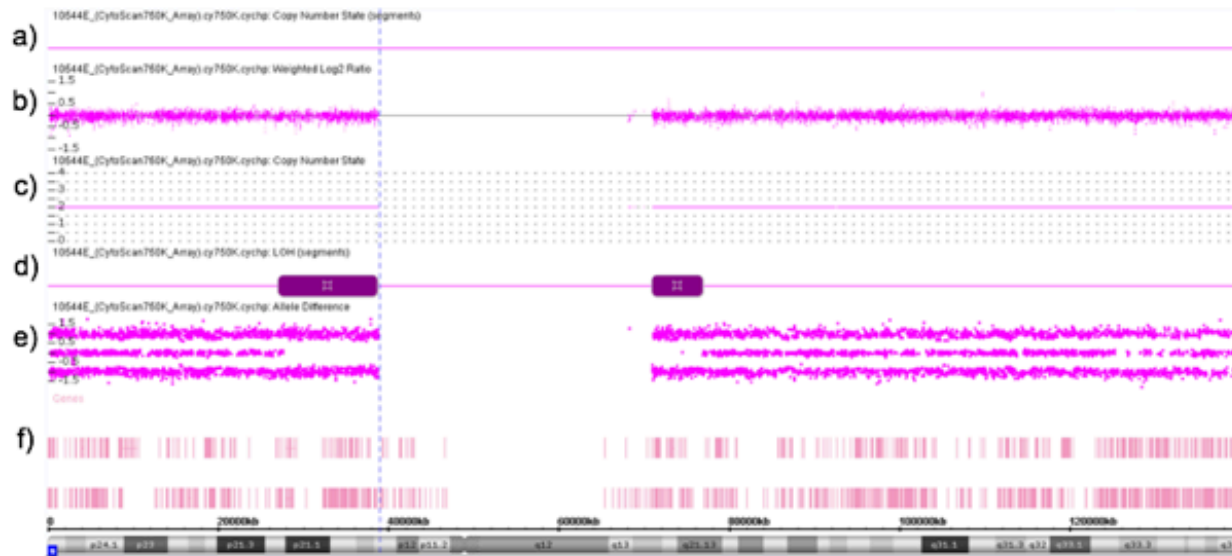


Figura 31. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 7. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 9 e 20 da paciente 7. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose (LOH). Nota-se dois blocos de ausência de heterozigose no cromossomo 9 da paciente 7, muito provavelmente devido à consanguinidade dos seus genitores. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos, exceto nas regiões de LOH, em que está ausente o genótipo heterozigoto para o cromossomo 9. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

Cromossomo 9



Cromossomo 20

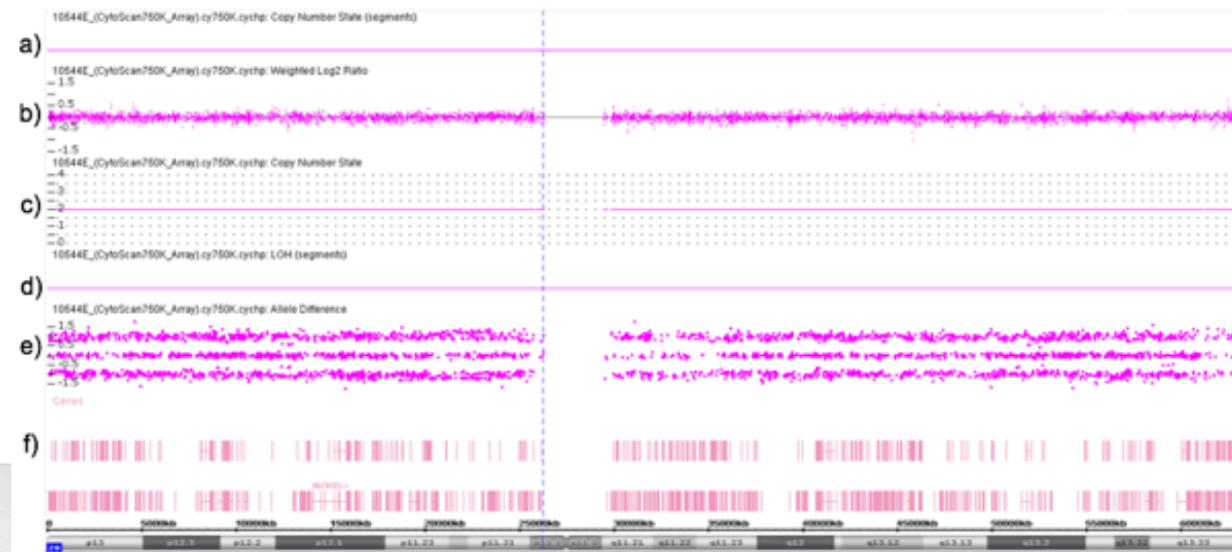


Figura 32. Resultado da análise cromossômica por microarranjo da paciente 8. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 9 e 20 da paciente 8. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose (LOH). Nota-se dois blocos de ausência de heterozigose no cromossomo 9 da paciente 8, muito provavelmente devido à consanguinidade dos seus genitores. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos, exceto nas regiões de LOH, em que está ausente o genótipo heterozigoto para o cromossomo 9. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

9.3. RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO *MATE-PAIR*

Após a análise dos *reads* discordantes presentes nos dados de sequenciamento *mate-pair* correspondentes ao DNA das gêmeas, foram encontrados dois pontos de quebra entre os cromossomos 9 e 20, envolvidos na translocação esperada. O ponto de quebra presente no cromossomo 9 engloba a região chr9:70,379,607-70,379,994 (hg38), com aproximadamente 0,4 kb de extensão e está dentro da banda 9q21.12, não interrompendo nenhum gene. (Figura 33).

O ponto de quebra presente no cromossomo 20 está localizado em chr20:36,440,488-36,440,653 (hg38), com extensão curta, em torno de 0,2 kb. Nessa região, o gene *DLGAP4* (*Discs Large-Associated Protein 4*) (OMIM 616191) está interrompido entre o quinto e o sexto éxons. Essa região está localizada na banda 20q11.23 (Figura 34).

O sequenciamento Sanger para definição precisa dos pontos de quebra ainda está em andamento.

Cromossomo: 9

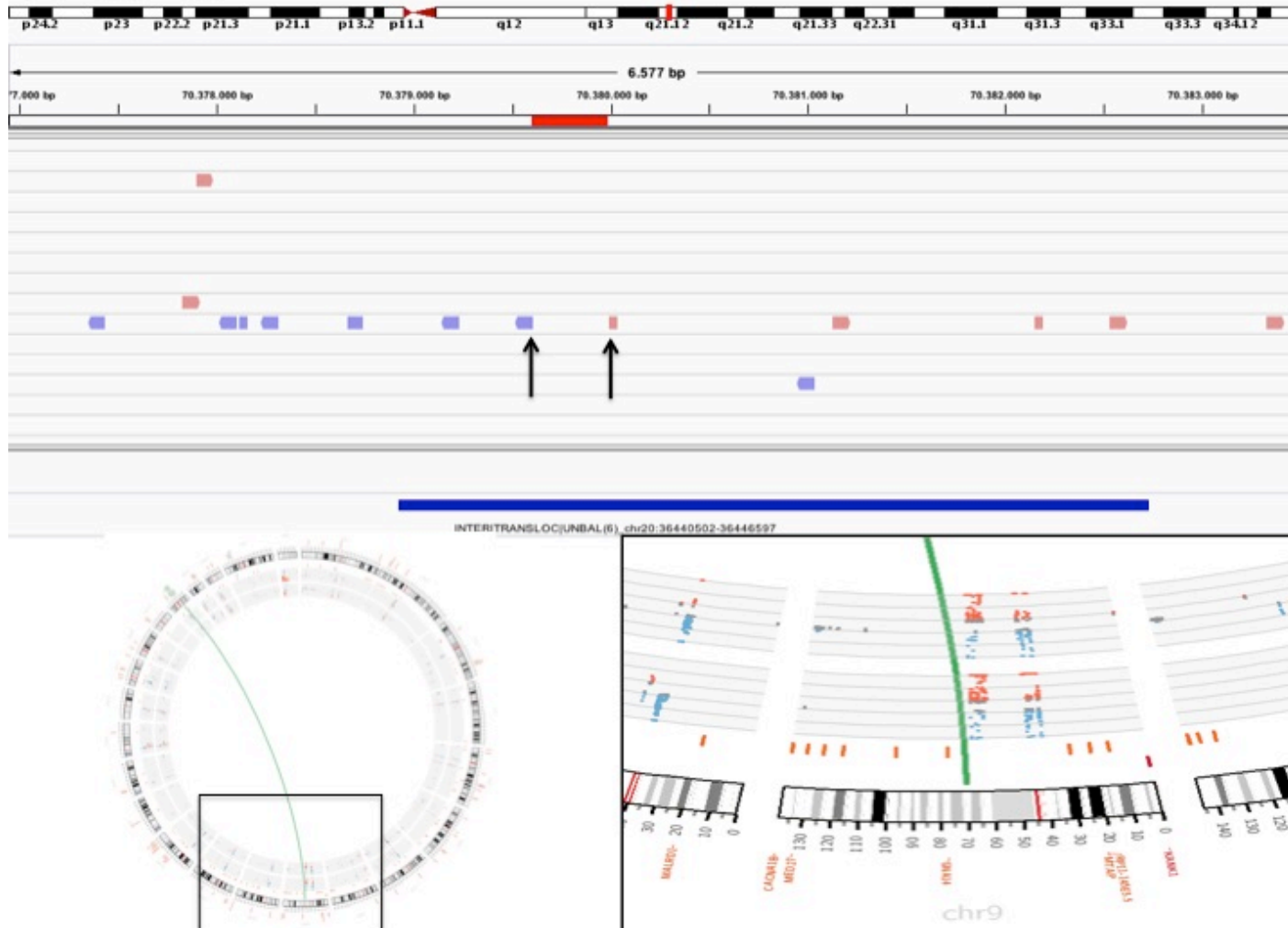


Figura 33. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 9 (chr9:70,379,607-70,379,994 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 7 e 8 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 7, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 8 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os cromossomos 9 (detalhe) e 20. No detalhe é possível ver que não há genes envolvidos nessa região.

Cromossomo: 20



Figura 34. Mapeamento do ponto de quebra no cromossomo 20 (chr20:36,440,488-36,440,653 (hg38)). Acima, imagem do programa IGV 2.3.92 mostrando os *reads* discordantes presentes na amostra das pacientes 7 e 8 (só é mostrado o resultado da análise da paciente 7, mas como são gêmeas monozigóticas, o resultado da paciente 8 pode ser deduzido). As setas e a faixa vermelha acima representam a localização do ponto de quebra. Abaixo, imagem no formato CIRCOS do rearranjo filtrado pelo programa SVDetect. Os cromossomos são mostrados em sequência em volta da circunferência e a linha verde (clara) representa uma translocação entre os cromossomos 9 e 20 (detalhe). No detalhe é possível ver, escrito em verde, o gene *DLGAP4* na região da quebra.

9.4. DISCUSSÃO

As pacientes 7 e 8 apresentam um cariótipo anormal com a presença de uma translocação equilibrada entre os cromossomos 9 e 20, em segmentos localizados nos braços longos de ambos os cromossomos. A análise por microarranjo também comprovou se tratar de uma translocação equilibrada.

O sequenciamento de nova geração foi realizado nas amostras e somente dois pontos de quebra foram encontrados nos cromossomos 9 e 20, envolvidos na translocação, sem outros achados importantes para averiguação.

As pacientes 7 e 8 apresentam um gene interrompido no ponto de quebra encontrado no cromossomo 20, na região 20q11.23: *DLGAP4*. Esse gene faz parte da família de DLGAPs, cujas proteínas são expressas na densidade pós sináptica (DPS) – região altamente especializada, onde se localizam receptores e proteínas ativadas pela ação de neurotransmissores, envolvida na transmissão de sinais através da junção sináptica (114). As proteínas DLGAPs, também conhecidas como SAPAPs, são proteínas *scaffold* que estão expressas na DPS e atuam transmitindo sinais neuronais desde a DPS até outras partes dos neurônios, via receptores de glutamato (115).

As variantes de *DLGAP1-4* foram relacionadas a várias condições e desordens neuropsiquiátricas, como desordem do espectro autista (116), transtorno obsessivo compulsivo (117), comportamento agressivo, síndrome de Tourette (119) e outros.

Em 1997, o gene *Dlgap4* em ratos foi clonado (*Sapap4*) (114). Análises por Northern Blot mostraram que, em roedores, esse gene só era expresso no cérebro. Além disso, uma imunohistoquímica de neurônios desses animais mostrou a expressão de *Sapap4* em diversas estruturas: dendritos, corpos celulares e núcleo celular. Mais tarde o gene *DLGAP4* humano também foi clonado e sua expressão apareceu em todos os tecidos humanos, incluindo todos os tecidos cerebrais (119).

Além desses achados, há também três variantes de *splicing* referentes ao gene em questão. A variante DLGAP4a está unicamente expressa no cerebelo, nas células de Purkinje, assim como DLGAP4b (120). Inclusive, a desregulação de *DLGAP4* está envolvido com ataxia cerebelar (120). RNAs não codificadores (ncRNAs) encontrados dentro do locus de *DLGAP4*, são expressos em níveis altos no cérebro e ainda, expressos especificamente em certas regiões das células de Purkinje, incluindo o núcleo. A descoberta dessa expressão específica pode, de fato, atribuir um papel

regulatório ao ncRNA e este pode então regular a expressão do próprio gene *DLGAP4* ou outra RNAm no cérebro (121).

Camundongos deficientes em *Sapap4* exibiram diversas alterações fisiológicas e comportamentais quando comparados a camundongos normais (122). *Sapap4* regula o tamanho da DPS, envolvendo-se na arborização dendrítica estrutural e funcionalmente; e a sua falta leva ao não desenvolvimento de habilidade cognitivas, como memória espacial e/ou atenção e diminuição da habilidade de manter interações sociais.

Além disso, existem muitos RNAs circulares (circRNAs) altamente expressos no sistema nervoso central, e eles estão envolvidos na regulação de processos fisiológicos e patofisiológicos, como o desenvolvimento e a plasticidade neural (123). O circ*DLGAP4*, derivado dos éxons 8, 9 e 10 do gene *DLGAP4*, atua como um tipo de inibidor do miR-143, impedindo sua expressão e, por causa disso contribui para atenuar déficits neuronais, melhora processos convulsivos, entre outras consequências. Isso sugere que circ*DLGAP4* pode atuar como alvo de intervenções terapêuticas para conter convulsões e como biomarcador para medir atividade de doenças no sistema nervoso central (124).

Todos esses estudos em conjunto, corroboram a ideia de que a haploinsuficiência deste gene, pode sim ser o causador do quadro clínico visto nas pacientes 7 e 8, uma vez que elas apresentam atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e outras características correspondentes ao transtorno do espectro autista.

A presença de um grande bloco de heterocromatina pericentromérica em ambos os cromossomos 9 pode ter mediado a formação do rearranjo, já que o cromossomo 9 é um dos cromossomos envolvidos no rearranjo.

A delimitação mais precisa dos pontos de quebra por sequenciamento Sanger ainda não foi concluída e poderá ajudar a esclarecer como se deu a formação desse rearranjo.

9.5. CONCLUSÕES

O ponto de quebra da translocação equilibrada entre os cromossomos 9 e 20 presente nas pacientes 7 e 8, correspondente ao cromossomo 20 interrompe o gene *DLGAP4*, cuja proteína é importante no sistema nervoso. Apesar de haver evidências

do papel de genes da família DLGAP na etiologia de transtornos do neurodesenvolvimento e da diminuição nas habilidades cognitivas e de interação social nos camundongos deficientes em Sapap4, nosso trabalho é o primeiro a propor a disrupção do gene *DLGAP4* como causa de transtorno do espectro autista.

Capítulo 10.
CASO 9

10.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

A paciente 9 é filha de pais não-consanguíneos. Foi encaminhada ao Serviço de Genética por suspeita de doença genética porque apresentava deficiência de crescimento e distúrbios ósteo-articulares.

A paciente 9 nasceu após aproximadamente nove meses de gestação com agravos (mãe com hipertensão arterial sistêmica e diabetes) através de parto normal. Nasceu com 3.955 g de peso, estatura de 50 cm e 35 cm de perímetro cefálico. Ficou internada por quatro dias e apresentou quadro de hipoglicemia. A paciente 9 ficou em pé com oito meses, andou com um ano e cinco meses e falou as primeiras palavras com mais de 12 meses de idade.

Ao exame físico aos 18 anos não apresentava dismorfias faciais significativas. Apresentava deficiência intelectual, baixa estatura (145,9 cm, E < 3º percentil), mãos com encurtamento de 4º e 5º metacarpos, cúbito valgo, pés com 5º dedo curto bilateralmente e discreta escoliose para a esquerda. A menarca aconteceu aos 13 anos e menstruava normalmente. Demonstrava ter dificuldade de socialização e iniciou quadro de diabetes.

Foram feitos exames de EEG, cujo resultado foi considerado normal; e radiografias de mãos e punhos para ver a maturação do esqueleto, foi considerado dentro dos padrões.

10.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO.

Ao cariótipo foi identificada uma translocação 46,XX,t(2;19)(q31;q13.1). Os pais têm cariótipo normal. A análise cromossômica de microarranjo mostrou que em ambos os cromossomos 2 e 19 não foram identificados deleções e/ou duplicações significativas, sendo, portanto, uma translocação equilibrada (Figura 35).

Nesse caso o sequenciamento NGS-*mate-pair* apresentou baixa qualidade e não foi possível obter resultados confiáveis. Foi feita uma nova coleta de sangue da paciente para conclusão do estudo.



Figura 35. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 9. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções), indicando que não existem alterações significativas nos cromossomos 2 e 19 da paciente 9. b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que está normal em ambos cromossomos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Novamente, está normal em ambos os cromossomos. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presentes. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que está normal para ambos os cromossomos. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

Capítulo 11.

CASO 10

11.1. DESCRIÇÃO CLÍNICA

O paciente 10 foi atendido no Serviço de Genética e foi encaminhado por suspeita de doença genética devido a presença de deficiência intelectual. O diagnóstico clínico primário foi hiperatividade.

O paciente 10 nasceu a termo após 39 semanas de gestação normal, por meio de parto normal, induzido por perda de líquido amniótico, depois de trabalho de parto de aproximadamente 9h, pesando 3.400 g e 52 cm de estatura. Ficou internado por três dias por apresentar icterícia. A mãe teve quatro gestações e três abortos não especificados.

Sua evolução neuromotora foi a seguinte: andou com um ano e seis meses, falou as primeiras palavras com dois anos e, ainda aos quatro anos falava as palavras pela metade.

Na última avaliação estava com 11 anos de idade. Ao exame físico apresentava estreitamento bifrontal com implantação baixa dos cabelos, fendas palpebrais largas, sobrancelhas arqueadas e irregulares, ponta do nariz bulbosa, filtro nasal médio e lábios grossos em arco de cupido, palato alto, dentes grandes e protusos, principalmente os incisivos, orelhas arredondadas com hélices sobredobradas com concha ampla e de baixa implantação. Também apresentava *pectus excavatum*, membros proporcionais com hiperextensibilidade articular e clinodactilia do quinto dedo bilateral.

Além disso, o paciente se mostrava hiperativo e apresentava dificuldade de aprendizado, não fala direito nem lê e escreve o próprio nome e faz cópias; e apresentava atraso no desenvolvimento. Fala enrolado, sem melhora do quadro. Não consegue realizar tarefas simples como fechar botões ou calçar sapatos sozinho.

O paciente fez exames de encefalograma digital cujo resultado foi normal e avaliação audiológica infantil cujo resultado também foi normal.

A irmã do paciente 10 também apresentava algumas características em comum com ele, como: estreitamento bifrontal com implantação baixa dos cabelos, incisivos superiores largos, orelhas com hélice desenrolada e hiperextensibilidade nos cotovelos.

11.2. RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO E ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRANJO

O exame de cariótipo do paciente foi normal para indivíduo do sexo masculino, 46,XY.

A análise cromossômica por microarranjo detectou uma deleção de 12 Mb no cromossomo 18 composta de dois segmentos: 18p11.32p11.31 x1 (5,136,226-5,613,346 bp, hg19) e 18p11.2 x1mos (5,613,346-12,300,136 bp, hg19), sendo que a porção proximal está deletada em apenas parte das células, isto é, está em mosaico (Figura 36).

Cromossomo 18

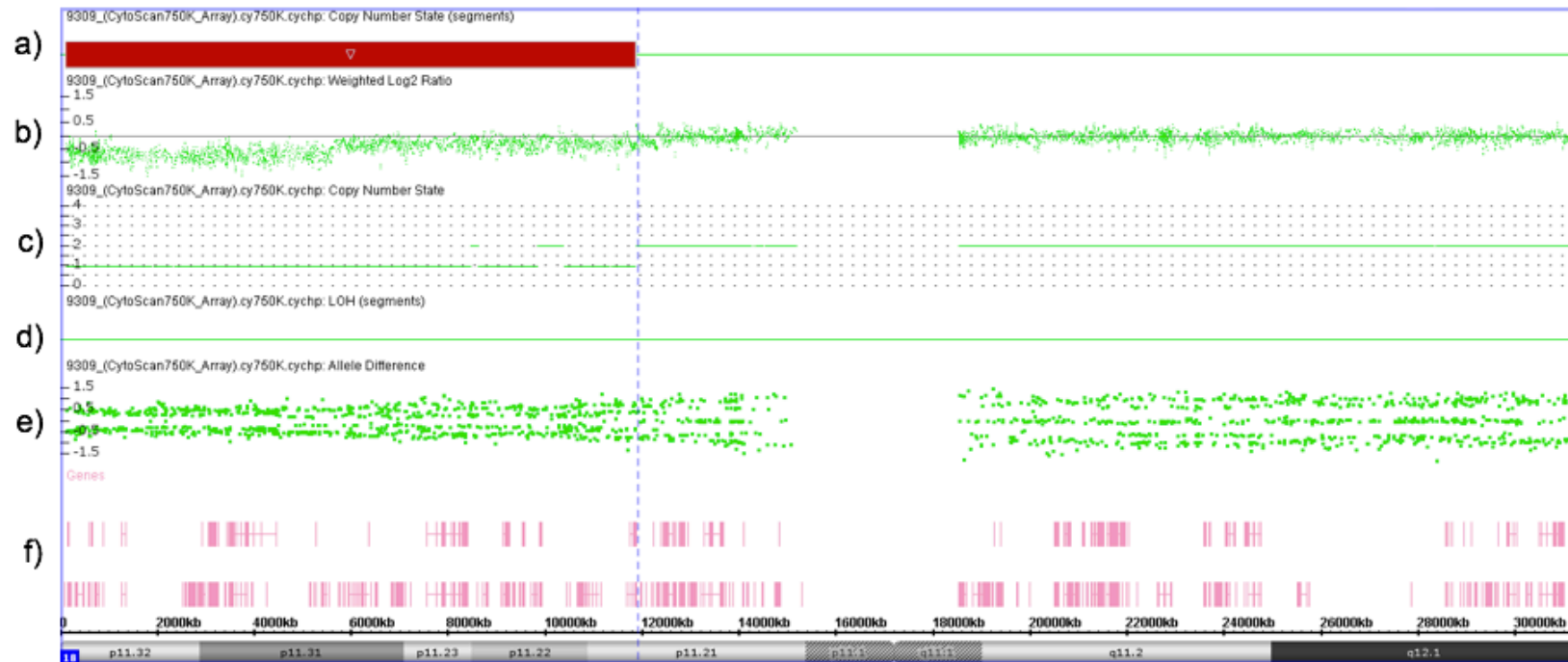


Figura 36. Resultado da análise cromossômica por microarranjo do paciente 10. a) linha que mostra os segmentos alterados (azul para duplicações e vermelho para deleções) e representa a região de deleção na região do braço curto do cromossomo 18, como segue: 18p11.32p11.31 x1 (5,136,226-5,613,346 bp, hg19) e 18p11.2 x1mos (5,613,346-12,300,136 bp, hg19). b) linha que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo em questão. Note-se que na região da deleção, as sondas mais distais em 18p estão marcando quantidade correspondente à deleção total e as sondas seguintes na região de deleção em 18p aparecem em menor quantidade que o normal, mas em maior quantidade que às anteriores, sugerindo uma deleção em mosaico desse segmentos. c) linha que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Note-se que na região da deleção há uma cópia para essa região de sondas. d) linha que mostra regiões de perda de heterozigose, quando presente. e) linha correspondente às sondas do tipo SNP (genotipagem). Note-se que na região da deleção há apenas duas linhas. f) faixa de genes descritos na região em hg19.

11.3. RESULTADO DO EXAME DE *FISH*

Realizamos *FISH* com sondas do cromossomo 18 a fim de confirmar o rearranjo complexo revelado pelo CMA. O resultado mostrou que, de fato, parte das metáfases apresentam uma das sondas (RP11-36J15, localizada em 18p11.22; verde) somente em um dos cromossomos 18 e parte, em ambos, o que confirma o mosaicismo. Já a outra sonda (RP11-92G19, localizada em 18p11.31; vermelha) está deletada em todas as metáfases em um dos cromossomos 18 (Figura 37).

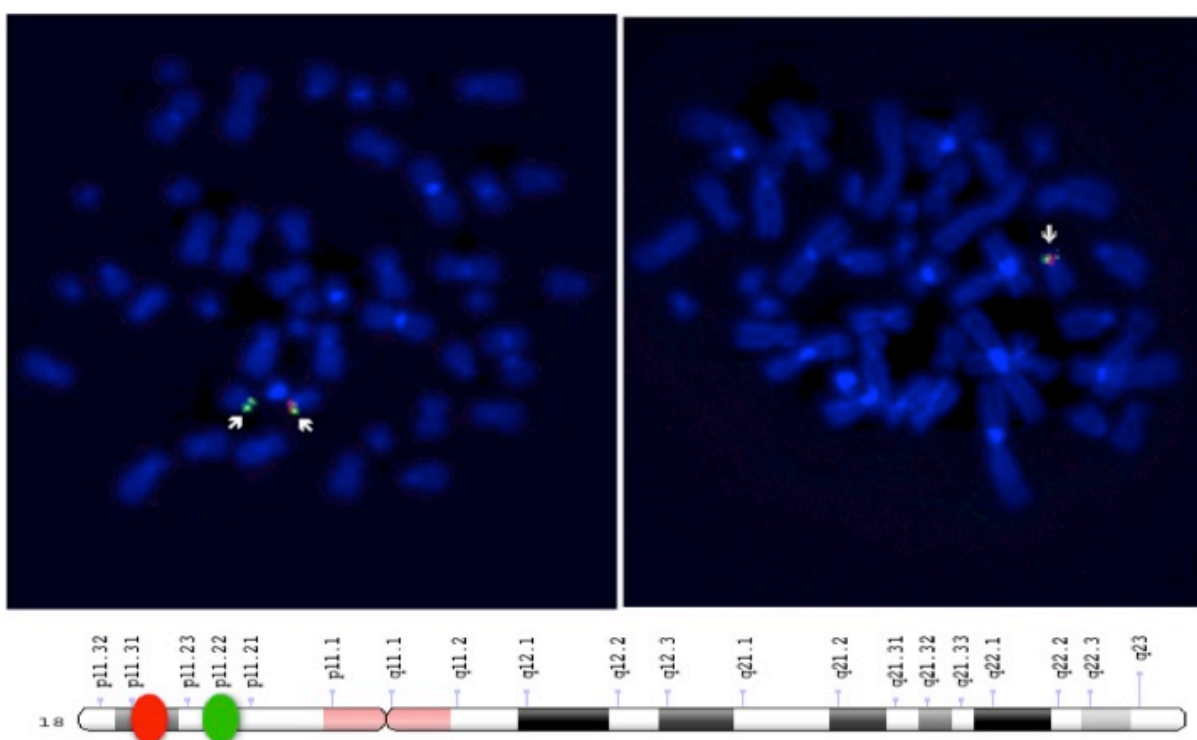


Figura 37. Resultado da análise de *FISH* nas metáfases do paciente 10. Na imagem à esquerda as setas mostram as sondas presentes nos cromossomos 18 do paciente. Nessa metáfase, a sonda RP11-36J15 (verde) está presente em ambos os cromossomos e a sonda RP11-92G19 (vermelha) está presente somente em um, ou seja, ela está deletada. Na imagem à direita, é possível ver somente o sinal verde em apenas um cromossomo 18, evidenciando nessa metáfase a condição de mosaico dessa região cromossômica e, novamente somente um sinal vermelho, confirmando a deleção dessa região em um dos cromossomos 18. O esquema abaixo representa a posição e marcação das sondas RP11-92G19 (vermelha) e RP11-36J15 (verde) no cromossomo 18 humano. Este esquema foi adaptado a partir do sítio <https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/18/ideogram.png> (Acesso 11.04.17).

11.4. DISCUSSÃO

No caso do paciente 10 o cariótipo foi normal e a análise cromossômica por microarranjo mostrou duas deleções distais no braço curto do cromossomo 18, sendo uma delas em mosaico. Decidimos incluir esse caso no trabalho por se tratar de rearranjo cromossômico complexo.

A deleção de um dos segmentos em mosaico foi confirmada pela técnica de FISH que mostrou que a deleção mais proximal está deletada em mosaico, ao contrário da mais distal, que está deletada em todas as células.

A perda do segmento distal do cromossomo 18 no paciente 10, pode ter ocorrido como um evento *de novo* durante a formação do embrião ou pode ainda ter sido herdado de um dos seus genitores, informação essa que não foi possível ter acesso até o momento. Já o segmento perdido em mosaico, provavelmente ocorreu durante um processo pós-zigótico, em que parte das células, que já não possuíam o segmento distal, perderam também a região gênica seguinte.

A monossomia parcial do cromossomo 18 (OMIM 146390) já foi descrita anteriormente em pacientes com deficiência intelectual, atraso no crescimento, dismorfismos craniofaciais (face arredondada ao nascer, orelhas displásicas, boca larga e problemas dentários), anormalidades nos membros, genitália, cérebro, olhos e coração (125; 126).

Entre as características em comum entre o paciente 10 e os achados da literatura destacam-se orelhas proeminentes com anormalidade nas hélices, desenvolvimento global atrasado e atraso na fala e na aquisição da linguagem (127). Outras características comuns a pacientes da síndrome de deleção 18p e o paciente 10 ainda incluem alterações de comportamento (como a hiperatividade), comissuras labiais voltadas para baixo, anormalidades dentárias e clinodactilia.

A variabilidade de fenótipos associados a essa síndrome é bem ampla e, dois indivíduos afetados na mesma região gênica de 18p podem ter quadros clínicos bem diferentes. Isso sugere que muitos genes podem estar relacionados com uma mesma característica ou um mesmo gene pode ter expressividade variável também, o que dificulta a identificação de genes candidatos associados aos achados clínicos. Entretanto, outro estudo sugere que uma região crítica relacionada à deficiência intelectual esteja localizada em 18p11.1 e 18p11.21 (128). Parte dessa região está

deletada no paciente 10, o que corrobora a informação supracitada, já que ele apresenta atraso no desenvolvimento.

11.5. CONCLUSÕES

O paciente 10 apresenta um rearranjo cromossômico complexo, constituído de uma deleção terminal do braço curto do cromossomo 18 e uma deleção em mosaico do segmento adjacente. O quadro clínico é compatível com o descrito para a síndrome de deleção 18p. Nossa hipótese é que os dois rearranjos tenham ocorridos em dois momentos distintos, sendo o rearranjo terminal na meiose que deu origem a um dos gametas que formou o embrião e a deleção em mosaico teria origem pós-zigótica.

Capítulo 12.
CONCLUSÃO

12.1. CONCLUSÃO

Analizamos uma amostra de oito famílias de portadores de rearranjos cromossômicos complexos ou aparentemente equilibrados aplicando técnicas de citogenética clássica e molecular e em três delas o sequenciamento NGS-*mate-pair*.

Dois pacientes apresentavam inversões. O paciente 1 tinha uma duplicação invertida no cromossomo 17 que inclui muitos genes e explica seu quadro clínico. No outro caso (paciente 2), a inversão mostrou-se não equilibrada, com um segmento deletado que inclui o gene *GLI3* e outros próximos a ele. A deleção desse gene e dos genes próximos a ele causam a Síndrome Cefalopolissindactilia de Greig de genes contíguos, quadro clínico apresentado pelo paciente 2.

Uma das pacientes do estudo era portadora de translocação equilibrada entre os cromossomos 2 e 9 (paciente 3). Seu filho era gravemente afetado e era portador de um cromossomo extranumerário, produto da segregação da translocação. Pela análise cromossômica por microarranjo do filho foi possível demonstrar que a quebra no cromossomo 2 interrompia o gene *LINC00299*, responsável pelo quadro clínico de deficiência intelectual da paciente 3.

O paciente 4 é portador da translocação equilibrada herdada 46,XY,t(2;11)(q13;q12.1). O ponto de quebra no cromossomo 2 interrompe o gene *PTPN4*, forte gene candidato a responsável pelo quadro clínico de deficiência intelectual e atraso cognitivo e neuropsicomotor.

As paciente 5 e 6 são portadoras da translocação equilibrada 46,XX,t(3;12)(q29;q14) que apresenta no ponto de quebra no cromossomo 12 a interrupção do gene *HMGA2* e região próxima a ele, sugerindo a Síndrome de Silver-Russell como fenótipo e a macrocrania resultado de alteração na região próxima ao gene.

As pacientes 7 e 8 são portadoras da translocação equilibrada 46,XX,t(9;20)(q22;q13.3),9qh+,9qh+. O ponto de quebra no cromossomo 20 interrompia o gene *DLGAP4*, possivelmente responsável pelo quadro clínico de transtorno do espectro autista.

A paciente 9 é portadora de uma translocação equilibrada 46,XX,t(2;19)(q31;q13.1). Não foi possível obter mais dados relacionados a esse rearranjo por baixa qualidade no sequenciamento *mate-pair* e, uma nova coleta de sangue foi feita para conclusão futura do estudo.

O paciente 10, apesar de apresentar cariótipo normal, era portador de um rearranjo complexo do cromossomo 18. Em um dos segmentos deletados no braço curto do cromossomo 18, a deleção era em mosaico. Não foi possível, nesse caso, realizar o sequenciamento *mate-pair* para propormos um possível mecanismo de formação para o rearranjo.

Nas três famílias que apresentavam translocações verdadeiramente equilibradas, o sequenciamento *mate-pair* permitiu identificarmos o intervalo da quebra cromossômica. Nos três rearranjos foi possível identificar um gene na região do ponto de quebra que explica o quadro clínico dos pacientes, mostrando a importância do uso dessa metodologia para estudo desses rearranjos.

Capítulo 13.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

13.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Carroll, S.B. *Introdução à genética*. (9 ed.). Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan; 2008.
2. Snustad, D.P., Simmons, M.J. *Fundamentos de genética*. (4 ed.). Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan; 2008.
3. Kirkpatrick, M. How and Why Chromosome Inversions Evolve. *PLoS Biol.* 2010;8(9): e1000501.
4. Gersen, S.L., Keagle, M.B. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. (3 ed.). Nova Iorque: Springer; 2013.
5. Pardo, B., Gómez-González, B., Aguilera, A. DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66: 1039-1056.
6. Tsai, A.G., Lieber, M.R. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics.* 2010;11(suppl 1): S1.
7. Seoyoung, K., Peterson, S.E., Maria, J., Scott, K. Mechanisms of germ line genome instability. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2016;54: 177-187.
8. Lam, I., Keeney, S. Mechanisms and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2015;7(1): 1-35.
9. Kim, S., Peterson, S.E., Jasin, M., Keeney, S. Mechanisms of germ line genome instability. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2016;54: 177-187.
10. Bohlander, S.K., Kakadia, P.M. DNA repair and Chromosomal Translocation. *Recent Results in Cancer Research.* 2015;200: 1-37.
11. Hastings, P.J., Lupski, J.R., Rosenberg, S.M., Ira, G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Rev Genet.* 2009;10(8): 551-564.

12. Liu, P., Carvalho, C.M.B., Hastings, P.J., Lupski, J.R. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev.* 2012;22(3): 211-220.
13. Ibiologyorg. IBiology. [Online]. Disponível em: <https://www.ibiology.org/ibioeducation/exploring-biology/molecular-biology/dna-repair-and-replication/single-strand-annealing.html> [Acessado em 22 Novembro 2017].
14. Bhargava, R., Onyango, D.O., Stark, J.M. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. *Trends in Genetic - Cell Press.* 2016;32(9): 566-575.
15. Downs, J.A., Nussenweig, M.C., Nussenweig, A. Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature.* 2007;447: 951-958.
16. Ghezraoui, H., Piganeau, M., Renouf, B., Renaud, J.B., Sallmyr, A., Ruis, B., Oh, S., Tomkinson, A., Hendrickson, E.A., Giovannangeli, C., Jasin, M., Brunet, E. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Mol. Cell.* 2014;55(6): 829-842.
17. Fonseca, A.C.S. Caracterização de rearranjos cromossômicos citogeneticamente equilibrados associados a quadros clínicos [Tese]. São Paulo - SP: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2015.
18. Matoso, E.M.R.C. Desequilíbrios genômicos nas patologias do desenvolvimento e do comportamento [Tese]. Coimbra (Portugal): Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2014.
19. D'Angelo, C.S. Pesquisa dos mecanismos de rearranjos cromossômicos subteloméricos na monossomia 1p36, expansão do espectro da variabilidade fenotípica e comportamental, diagnósticos diferenciais e caracterização de uma região crítica para obesidade [Tese]. São Paulo – SP: Universidade de São Paulo; 2009.

20. Hastings, P.J., Ira, G., Lupski, J.R. A Microhomology-mediated Break-Induced Replication Model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet* 2009;5:e1000327.
21. Schluth-Bolard, C., Labalme, A., Cordier, M.-P., Till, M., Nadeau, G., Tevissen, H., Lesca, G., Boutry-kryza, N., Rossignol, S., Rocas, D., Dubruc, E., Edery, P., Sanlaville, D. Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. *Journal of medical genetics*. 2013;50(3): 144–150.
22. Vandeweyer, G., Kooy, R.F. Balanced translocations in mental retardation. *Human Genetics*. 2009;126(1): 133–147.
23. Tharapel, A.T., Summit, R.L., Wilroy, R.S., Martens, P. Apparently balanced de novo translocations in patients with abnormal phenotypes: report of 6 cases. *Clinical Genetics*. 1977;11: 255-269.
24. Schluth-Bolard, C., Delobel, B., Sanlaville, D., Boute, O., Cuisset, J.M., Sukno, S., ... Andrieux, J. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: Array CGH study of 47 unrelated cases. *European Journal of Medical Genetics*. 2009;52(5): 291–296.
25. Feenstra, I., Hanemaaijer, N., Sikkema-Raddatz, B., Yntema, H., Dijkhuizen, T., Lugtenberg, D., Verheij, J., Green, A., Hordijk, R., Reardon, W., Vries, B.D., Brunner, H., Bongers, E., van Ravenswaaij-Arts, C. Balanced into array: genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced de novo chromosome rearrangement and a meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*. 2011;19(11): 1152–1160.
26. Rendi, C., Brand, H., Collins, R.L., Kammin, T., Mitchell, E., Hodge, J.C. et al. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. *Nature Genetics*. 2016;advanced online publication: 1-12.

27. Baptista, J. Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82: 927–936.
28. Zatz, M., Vianna-Morgante, A.M., Campos, P., Diament, A.J. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *J Med Genet.* 1981;18: 442-447.
29. Boyd, Y., Buckle, V., Holt, S., Munro, E., Hunter, D., Craig, I. Muscular dystrophy in girls with X; autosome translocations. *J. Med. Genet.* 1986;23(6): 484-490.
30. Rowley, J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243: 290–293
31. Erikson, J., ar-Rushdi, A., Drwinga, H.L. et al. Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80: 820–824
32. . Wilkins, J.F., Haig, D. What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nature Rev Genet.* 2003;4:1-10.
33. Patsalis, P.C., Evangelidou, P., Charalambous, S., Sismani, C. Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *European Journal of Human Genetics.* 2004;12: 647-653.
34. Russell, P.J. *iGenetics: A Molecular Approach.* (3 ed.). San Francisco (USA): Benjamin Cummings; 2010.
35. Nora, E.P., Goloborodko, A., Valton, A.L., Gibcus, J.H., Uebersohn, A., Abdenuur, N., Dekker, J., Mirny, L.A., Bruneau, B.G. Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome from Genomic Compartmentalization. *Cell.*

2017;169(5): 930-944.e22.

36. Fuhrer, D. Lessons from studies of complex disorders: identification of FOXL2 - a novel transcription factor on the wing to fertility. *Eur. Jour. of Endocrinology*. 2002;146: 15-18.

37. Beysen, D., Paepe, A. De., Baere, E. De. FOXL2 Mutations and Genomic Rearregements in BPES. *Human Mutation*. 2008;30: 158-169.

38. Muncke, N., Wogatzky, B.S., Breuning, M., Sistermans, E.A., Endris, V., Ross, M., Vetrie, D., Castman-Berrevoets, C.E., Rappold, G. Position effect on PLP1 may cause a subset of Pelizaeus-Merzbacher disease symptoms. *J. Med. Genet*. 2004. 41(e121): 1-5.

39. Flanagan, S.F., Munns, C.F.J., Hayes, M., Williams, B., Berry, M., Vickers, D., Rao, E., Rappold, G.A., Batch, J.A., Hyland, C.J., Glass, I.A. Prevalence of mutations in the short stature homeobox containing gene (SHOX) in Madelung deformity of childhood. *J Med Genet*. 2002;39: 758–763 .

40. Tjio, J.H., Levan, A. The chromosome number of man. *Hereditas*. 1956; 1-8.

41. Ford, C.E., Hamerton, J.L. The chromosomes of man. *Nature*. 1956; 178(4541): 1020-1023.

42. Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J. Fluorescent labeling of chromosomal DNA: superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science*. 1970;170(3959): 762.

43. Arrighi, F.E., Hsu, T.C. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*. 1971;10(2): 81-86.

44. Drets, M.E., Shaw, M.W. 1971. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1971;68(9): 2073-2077.

45. Dutrillaux, B., Lejeune, J. A new technic of analysis of the human karyotype. *C R*

Acad.. Sci. Hebd. Seances. Sci. D. 1971;272(20): 2638-2640.

46. Holmquist, G.P. Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. *Am. J. Hum. Genet.* 1992;51(1): 17-37.

47. Dolan, M. The role of Giemsa stain in cytogenetics. *Biotechnic & Histochemistry.* 2011; 86(2): 94-97.

48. Speicher, M.R., Carter, N.P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature reviews. Genetics.* 2005;6(10): 782–792.

49. Bauman, J.G., Wiegant, J., Borst, P., van Duijn, P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp. Cell. Res.* 1980;128(2): 485-490.

50. Van Der Ploeg, M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. *European Journal of Histochemistry.* 2000;44(1): 7–42.

51. Neves, S.M.N., Guedes, R.M.C. Hibridização in Situ Fluorescente : Princípios Básicos E Perspectivas Para O Diagnóstico De Doenças Infecciosas Em Medicina Veterinária. *Arq. Inst. Biol.* 2012;79(4): 627–632.

52. Femino, A.M., Fay, F.S., Fogarty, K., Singer, R.H. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science.* 1998;280(5363): 585-590.

53. Levsky, J.M., Singer, R.H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of cell science.* 2003;116(14): 2833–2838.

54. Wippold, F.J., Perry, A. Neuropathology for the Neuroradiologist: Fluorescent in situ Hybridization. *AJNR.* 2007;28: 406-410.

55. Miller, D.T., Adam, M.P., Aradhya, S., Biesecker, L.G., Brothman, A.R., Carter, N.P., Church, D.M., Crolla, J.A., Eichler, E.E., Epstein, C.J., Faucett, W.A., Feuk, L., Friedman, J. M., Hamosh, A., Jackson, L., Kaminsky, E.B., Kok, K., Krantz, I.D., Kuhn,

R.M., Lee, C., Ostell, J.M., Rosenberg, C., Scherer, S.W., Spinner, N.B., Stavropoulos, D.J., Tepperberg, J.H., Thorland, E.C., Vermeesch, J.R., Waggoner, D.J., Watson, M.S., Martin, C.L., Ledbetter, D.H. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86: 749-64.

56. Zhou, X., Li, C., Mok, S.C., Chen, Z., Wong, D.T. Whole genome loss of heterozygosity profiling on oral squamous cell carcinoma by high-density single nucleotide polymorphic allele (SNP) array. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;151(1): 82-8

57. Cottrell, C.E., Mendell, J., Hart-Kothari, M., Ell, D., Thrush, D.L., Astbury, C., ... Pyatt, R.E. Maternal uniparental disomy of chromosome 4 in a patient with limb-girdle muscular dystrophy 2E confirmed by SNP array technology. *Clinical Genetics.* 2012;81(6), 578–583.

58. Olshen, A.B., Gold, B., Lohmueller, K.E., Struewing, J.P., Satagopan, J., Stefanov, S.A., Eskin, E., Kirchhoff, T., Lautenberger, J.A., Klein, R.J., Friedman, E., Norton, L., Ellis, N.A., Viale, A., Lee, C.S., Borgen, P.I., Clark, A.G., Offit, K., Boyd, J. Analysis of genetic variation in Ashkenazi Jews by high density SNP genotyping. *BMC Genet.*2008;9: 14.

59. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1977;74(12): 5463–5467.

60. Reis-Filho, J.S. Next-generation sequencing. *Breast cancer research BCR.* 2009;11(3): S12.

61. Metzker, M.L. Sequencing technologies - the next generation. *Nature reviews. Genetics.* 2010;11(1): 31–46.

62. Grada, A., Weinbrecht, K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology.* 2013;133(8): e11–4.

63. Nazaryan, L., Stefanou, E.G., Hansen, C., Kosyakova, N., Bak, M., Sharkey, F.H., ... Tommerup, N. The strength of combined cytogenetic and mate-pair sequencing techniques illustrated by a germline chromothripsis rearrangement involving FOXP2. *European journal of human genetics. EJHG.* 2014;(May): 1–6.
64. Le Scouarnec, S., Gribble, S.M. Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity.* 2012;108: 75-85.
65. Yang, R., Chen, L., Newman, S., Gandhi, K., Doho, G., Moreno, C.S., Vertino, P.M., Bernal-Mizarchi, L., Lonial, S., Boise, L.H., Rossi, M., Kowalski, J., Qin, Z.S. Integrated analysis of whole-genome paired-end and mate-pair sequencing data for identifying genomic structural variations in multiple myeloma. *Cancer Informatics.* 2014;13: 49–53.
66. Gao, G., Smith, D.I. Mate-pair sequencing as a powerful clinical tool for the characterization of cancers with a DNA viral etiology. *Viruses.* 2015;7(8): 4507–4528.
67. Korbel, J.O., Urban, A.E., Affourtit, J.P., Godwin, B., Grubert, F., Simons, J.F., Kim, P.M., Palejev, D., Carriero, N.J., Du, L., Taillon, B.E., Chen, Z., Tanzer, A., Saunders, A.C., Chi, J., Yang, F., Carter, N.P., Hurles, M.E., Weissman, S.M., Harkins, T.T., Gerstein, M.B., Egholm, M., Snyder, M. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science.* 2007;318: 420-426.
68. Utami, K.H.L., Hillmer, A.M., Aksoy, I., Chew, E.G., Teo, A.S., Zhang, Z., Lee, C.W., Chen, P.J., Seng, C.C., Ariyaratne, P.N., Rouam, S.L., Soo, L.S., Yousoof, S., Prokudin, I., Peters, G., Collins, F., Wilson, M., Kakakios, A., Haddad, G., Menuet, A., Perche, O., Tay, S.K., Sung, K.W., Ruan, X., Ruan, Y., Liu, E.T., Briault, S., Jamieson, R.V., Davila, S., Cacheux, V. Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. *PLoS One.* 2014;9: e90852.
69. Lasho, T., Johnson, S.H., Smith, D.I., Crispino, J.D., Pardanan, A., Vasmataz, G., Tefferi, A. Identification of submicroscopic genetic changes and precise breakpoint mapping in myelofibrosis using high resolution mate-pair sequencing. *Am. J. Hematol.*

2013;88(9): 741-746.

70. Vergult, S., Van Binsbergen, E., Sante, T., Nowak, S., Vanakker, O., Claes, K., Poppe, B., Van der, A.N., Van Roosmalen, M.J., Duran, K., Tavakoli-Yaraki, M., Swinkels, M., van den Boogaard, M.J., van Haelst, M., Roelens, F., Speleman, F., Cuppen, E., Mortier, G., Kloosterman, W.P., Menten, B. Mate pair sequencing for the detection of chromosomal aberrations in patients with intellectual disability and congenital malformations. *Eur J Hum Genet.* 2014;22: 652-659.

71. Ji, X., Liang, D., Sun, R., Liu, C., Ma, D., Wang, Y., Hu, P., Xu, Z. Molecular characterization of ring chromosome 18 by low-coverage next generation sequencing. *BMC Med. Genet.* 2015;16: 57.

72. Tommerup, N., Rasmussen, M.B., Mehrjouy, M.M., Bache, I., Lind Thomsen, A., Dos Santos Fonseca, A.C., Halgren, C., Bak, M., Jacky, P. International Breakpoint Mapping Consortium (IBMC). Systematic Mapping of Chromosomal Breakpoints in the Context of Phenotypes and Nuclear Genome Organization. *Cancer Genetics.* 2015;208: 359-360.

73. Anazi, S., Maddirevula, S., Faqeih, E., Alsedairy, H., Alzahrani, F., Shamseldin, H.E., Patel, N., Hashem, M., Ibrahim, N., Abdulwahab, F., Ewida, N., Alsaif, H.S., Al sharif, H., Alamoudi, W., Kentab, A., Bashiri, F.A., Alnaser, M., et al. Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Molecular Psychiatry.* 2016;00: 1-10.

74. Bernkopf, M., Webersinke, G., Tongsook, C., Koyani, C.N., Rafiq, M.A., Ayaz, M., Muller, D., Enzinger, C., Aslam, M., Naeem, F., Schmidt, K., Gruber, K., Speicher, M. R., Malle, E., Macheroux, P., Ayub, M., Vincent, J.B., Windpassinger, C., Duba, H-C. Disruption of the methyltransferase-like 23 gene METTL23 causes mild autosomal recessive intellectual disability. *Human Molecular Genetics.* 2014;23(15):4015-4023.

75. Roosenboom, J., Lee, M.K., Hecht, J.T., Heike, C.L., Wehby, G.L., Christensen, K., Feingold, E., Marazita, M.L., Maga, A.M., Shaffer, J.R., Weinberg, S.M. Mapping genetic variants for cranial vault shape in humans. *PLoS ONE.* 2018;13(4): e0196148.

76. Midro, A.T., Tommerup, N., Borys, J., Panasuik, B., Kosztyla-Hojna, B., Zalewska, R., Konstantynowicz, J., Tebkowska, U., Cooper, L., Scherer, S.E., Mehjoury, M.M., Liu, Q., Skowronski, R., Stankiewicz, P. *Clinical Genetics*. 2018;1-3.
77. Rio, M., Ozilou, C., Cormier-Daire, V., Turleau, C., Prieur, M., Vekemans, M., Chaveau, P., Munnich, A., Colleaux, L. Partial maternal heterodisomy of chromosome 17q25 in a case of severe mental retardation. *Hum Genet*. 2001;108:511-515.
78. Démurger, F., Ichkou, A., Mougou-Zerelli, S., Le Merrer, M et al. New insights genotype-phenotype correlation for GLI3 mutations. *European Journal of Human Genetics*. 2015; 23: 92-102.
79. Greig, D.M. Oxycephaly. *Edinburgh Med. J*. 1928;33: 189–218.
80. Cremades, D.M., Trives, I.M., López, V.B., Más, L.A., Martínez, M.R.G., Sánchez, F.G. Microdelección 7p14.1 y cefalopolisindactilia de Greig. *An Pediatr (Barc)*. 2011;74(4): 266-269.
81. Schwarzbraun, T., Windpassinger, C., Ofner, L., Vincent, J.B., Cheung, J., Scherer, S.W., Wagner, K., Kroisel, P.M., Petek, E. Genomic analysis of five chromosome 7p deletion patients with Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS). *European Journal of Medical Genetics*. 2006;49: 338-345.
82. Hurst, J.A., Jenkins, D., Vasudevan, P.C., Kirchoff, M., Skovby, F., Rieubland, C., Gallati, S., Rittinger, O., Kroisel, P.M., Johnson, D., Biesecker, L.G., Wilkie, A.O.M. Metopic and sagittal synostosis in Greig cephalopolysyndactyly syndrome: five cases with intragenic mutations or complete deletions of GLI3. *European Journal of Human Genetics*. 2011;19: 757-762.
83. Biesecker, L.G. What you can learn from one gene: GLI3. *J. Med. Genet*. 2006;43: 465–469.
84. Schulz, S., Volleth, M., Muschke, P., Wieland, I., Wieacker, P. Greig

cephalopolysyndactyly (GCPS) contiguous gene syndrome in a boy with a 14 Mb deletion in region 7p13-14 caused by a paternal balanced insertion (5; 7). *Appl. Clin. Genet.* 2008;1: 19-22.

85. Bhan, A., Mandal, S.S. Long Noncoding RNAs: Emerging Stars in Gene Regulation, Epigenetics and Human Disease. *Chem. Med. Chem.* 2014;9(9): 1932-1956.

86. Guo, W., Lei, W., Yu, D., Ge, Y., Chen, Y., Xue, W., Li, Q., Li, S., Gao, X., Yao, W. Involvement of lncRNA-1700040D17Rik in Th17 cell differentiation and the pathogenesis of EAE. *Int. Immunopharmacol.* 2017;47:141-149.

87. Li, Z., Jin, C., Chen, S., Zheng, Y., Huang, Y., Jia, L., Ge, W., Zhou, Y. Long non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p. *Mol. Cell. Biochem.* 2017;Published Online 05/april/2017.

88. Shen, S., Jiang, H., Bei, Y., Xiao, J., Li, X. Long Non-Coding RNA in Cardiac Remodeling. *Cell Physiol. Biochem.* 2017;41(5): 1830-1837.

89. Tang, Y., He, Y., Shi, L., Yang, L., Wang, J., Lian, Y., Fan, C., Zhang, P., Guo, C., Zhang, S., Gong, Z., Li, X., Xiong, F., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Zeng, Z. Co-expression of AFAP1-AS1 and PD-1 predicts poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2017;Published online 24/03/2017.

90. Wu, J., Cheng, G., Zhang, C., Zheng, Y., Xu, H., Yang H., Hua, L. Long noncoding RNA LINC01296 is associated with poor prognosis in prostate cancer and promotes cancer-cell proliferation and metastasis. *Onco Targets Ther.*2017;10: 1843-1852.

91. Chang, S., Chen, B., Wang, X., Wu, K., Sun, Y. Long non-coding RNA XIST regulates PTEN expression by sponging miR-181a and promotes hepatocellular carcinoma progression. *BMC Cancer.* 2017;17(1): 248.

92. Mercer, T.R., Dinger, M.E., Sunkin, S.M., Mehler, M.F., Mattick, J.S. Specific

expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(2): 716–721.

93. Guttman, M., Amit, I., Garber, M. et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 2009;458(7235): 223–227

94. Francescato, M., Vitezic, M., Heutink, P., Saxena, A. Brain-specific noncoding RNAs are likely to originate in repeats and may play a role in up-regulating genes in cis. *Int. Journal Biochem. Cell Biol*. 2014;54:331– 337

95. Sauvageau, M., Goff, L.A., Lodato, S. et al. Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development. *Elife*. 2013; 2:e01749

96. Talkowski, M.E., Maussion, G., Crapper, L., Rosenfeld, J.A., Blumenthal, I. et al. Disruption of a Large Intergenic Noncoding RNA in Subjects with Neurodevelopmental Disabilities. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;91: 1128-1134.

97. Blake, J., Riddell, A., Theiss, S., Gonzalez, A.P., Haase, B., Jauch, A., Janssen, J.W., Ibberson, D., Pavlinic, D., Moog, U., Benes, V., Runz, H. Sequencing of a patient with balanced chromosome abnormalities and neurodevelopmental disease identifies disruption of multiple high risk loci by structural variation. *PLoS One*. 2014; 9, 3.

98. Szczatuba, K., Chmielewska, J.J., Sokolowska, O., Rydzanicz, M., Szymanska, K., Feleszko, W., Wlodarski, M., Biernacka, A., Pienkowski, V.M., Walczak, A., Bargel, E., Krolewczyk, K., Nowacka, A., Stawinski, P., Nowis, D., Dziembowska, M., Ploski, R. Neurodevelopmental phenotype caused by a de novo PTPN4 single nucleotide variant disrupting protein localization in neuronal dendritic spines. *Clinical Genetics*. 2018;94:581-585.

99. Whited, J.L., Robichaux, M.B., Yang, J.C., Garrity, P.A. Ptpmeg is required for the proper establishment and maintenance of axon projections in the central brain of *Drosophila*. *Development*. 2007;134(1): 43--53.

100. Williamson, S.L., Ellaway, C.J., Peters, G.B., Pelka, G.J., Tam, P.P.L., Christodoulou, J. Deletion of protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4 (*PTPN4*) in twins with a Rett syndrome-like phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(9): 1171-1175.
101. Kina, S.I., Tezuka, T., Kusakawa, S., Kishimoto, Y., Kakizawa, S., Hashimoto, K., Ohsugi, M., Kiyama, Y., Horai, R., Sudo, K., Kakuta, S., Iwakura, Y., Lino, M., Kano, M., Manabe, T., Yamamoto, T. Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. *Eur J Neurosci.* 2007;26: 2269-2278.
102. Hironaka, K., Umemori, H., Tezuka, T., Mishina, M., Yamamoto, T. The Protein-tyrosine Phosphatase PTPMEG Interacts with Glutamate Receptor $\alpha 2$ and ϵ Subunits*. *J Biol Chem.* 2000;275(21): 16167-16173.
103. Tonkin, E.T., Smith, M., Eichhorn, P., Jones, S., Imamwerdi, B., Lindsay, S., Jackson, M., Wang, T-J. A giant novel gene undergoing extensive alternative splicing is severed by a Cornelia de Lange-associated translocation breakpoint at 3q26.3. *Hum. Genet.* 2004;115(2): 139-148.
104. Borg, K., Stankiewicz, P., Bocian, E., Kruczek, A., Obersztyn, E., Lupski, J.R., Mazurczak, T. Molecular analysis of a constitutional complex genome rearrangement with 11 breakpoints involving chromosomes 3, 11, 12, and 21 and a ~0.5Mb submicroscopic deletion in a patient with mild mental retardation. *Hum. Genet.* 2005;118: 267-275.
105. Valli, L.G.; Sobrinho, J. de A. Mecanismo de ação do glutamato do sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. *Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria.* 2014;18(1): 58-67.
106. Cooper, G.M., Coe, B.P., Girirajan, S., Rosenfeld, J.A., Vu, T., Baker, C., Williams, C., Stalker, H., Hamid, R., et al. A Copy Number Variation Morbidity Map of Developmental Delay. *Nat Genet.* 2011;43(9): 838-846.

107. Fusco, I., Babu, D., Mellone, S., Barizzonne, N., Prodam, F., Fanelli, A., Muniswamy, R., Petri, A., Bellone, S., Bona, G., Giordano, M. Variations in the high-mobility group-A2 gene (*HMGA2*) are associated with idiopathic short stature. *Basic Science Investigation*. 2015;79(2):1-4.
108. Zhou, X., Benson, K.F., Ashar, H.R., Chada, K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature*. 1995;376: 771-774.
109. Takenouchi, T., Enomoto, K., Nishida, T., Torii, C., Okasaki, T., Takahashi, T., Kosaki, K. 12q14 Microdeletion Syndrome and Short Stature With or Without Relative Macrocephaly. *Am. J. Med. Genet*. 2012;Part A:1-3.
110. Buysse, K., Reardon, W., Mehta, L. The 12q14 microdeletion syndrome: additional patients and further evidence that *HMGA2* is an important genetic determinant for human height. *Eur J. Med. Genet*. 2009;52: 101-117.
111. Lynch, S.A., Foulds, N., Thuresson, A-C., Collins, A.L., Annerén, G., Hedberg, B-O., Delaney, C.A., Iremonger, J., Murray, C.M., Crolla, J.A., Costigan, C., Lam, Fitzpatrick, D.R., Regan, R., Ennis, S., Sharkey, F. The 12q14 microdeletion syndrome: six new cases confirming the role of *HMGA2* in growth. *Eur. Journ. Hum. Genet*. 2011;19: 534-539.
112. Fischetto, R., Palumbo, O., Ortolani, F., Palumbo, P., Leone, M.P., Causio, F.A., Pesce, S., Digilio, M.C., Carella, M., Papadia, F. Clinical and molecular characterization of a second family with the 12q14 microdeletion syndrome and review of the literature. *Am. J. Med. Genet*. 2016;173A: 1922-1930.
113. Leszinski, G.S., Warncke, K., Hoefele, J., Wagner, M. A case report and review of the literature indicate that *HMGA2* should be added as a disease gene for Silver-Russell syndrome. *Gene*. 2018;663: 110-114.
114. Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M., Takai, Y. SAPAPs: A family of PSD-95/SAP90-Associated proteins localized at postsynaptic density. *The Journal*

of Biological Chemistry. 1997;272(18): 11943-11951.

115. Rasmussen, A.H., Rasmussen, H.B., Silaharoglu, A. The DLGAP family: neuronal expression, function and role in brain disorders. *Molecular Brain*. 2017;10:43:1-13.

116. Chien, W-H., Gau, S. S-F., Liao, H-M., Chiu, Y-N., Wu, Y-Y., Huang, Y-S., Tsai, W-C., Tsai, H-M., Chen, C-H. Deep exon resequencing of DLGAP2 as a candidate gene of autism spectrum disorders. *Molecular Autism*. 2013;4(26):1-12.

117. Li, J-M, Lu, C-L, Cheng, M-C, Luu, S-U, Hsu, S-H, Chen, C-H. Exonic resequencing of the DLGAP3 gene as a candidate gene for schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2013;208(1):84–87.

118. Crane, J., Fagerness, J., Osiecki, B., Stewart, S.E., Pauls, D.L., Scharf, J.M., TSAICG. Family-based Genetic Association Study of DLGAP3 in Tourette Syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr*. 2011;156B(1): 108-114.

119. Nagase, T., Ishikawa, K., Suyama, M., Kikuno, R., Hirose, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., Ohara, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*. 1999;6:63-70.

120. Minocherhomji, S., Hansen, C., Kim, H-G., Mang, Y., Bak, M., Guldborg, P., Papadoulos, N., Eiberg, H., Doh, G.D., Mollgard, K. et al. Epigenetic remodelling and dysregulation of DLGAP4 is linked with early-onset cerebellar ataxia. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(23): 6163-6176.

121. Minocherhomji, S., Seemann, S., Mang, Y., El-schich, Z., Bak, M., Hansen, C., Papadoulos, N., Josefsen, K., Nielsen, H., Gorodkin, J., Tommerup, N., Silaharoglu, A. Sequence and expression analysis of gaps in human chromosome 20. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(14): 6660-6672.

122. Schob, C., Morelini, Ohana, O., Bakota, L., Hrynchak, M.V., Brandt, R.,

Brockmann, M.D., Cichon, N., Hartung, H., Hanganu-Opatz, I.L., Kraus, V., Scharf, S., Herrmans-Borgmeyer, I., Schweizer, M., Kuhl, D., Wöhr, M., Vörckel, K.J., Calzada-Wack, J., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., de Angelis, M.H, Garner, C.C., Kreienkamp, H-J, Kindler, S. *Transl Psychiatry*. 2019; 9: 7.

123. You, X., Vlatkovic, I., Babic, A., Will, T., Epstein, I., Tushev, G., Akbalik, G., Wang, M., Glock, C., Quedenau, C., Wang, X., Hou, J., Liu, H., Sun, W., Sambandan, S., Chen, T., Schuman, E.M., Chen, W. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat Neurosci*. 2015; 18(4): 603-610.

124. Bai, Y., Zhang, Y., Han, B., Yang, L., Chen, X., Huang, R., Wu, F., Chao, J., Liu, P., Hu, G., Zhang, J.H., Yao, H. Circular RNA DLGAP4 Ameliorates Ischemic Stroke Outcomes by Targeting miR-143 to Regulate Endothelial-Mesenchymal Transition Associated with Blood-Brain Barrier Integrity. *Neurobiology of Disease*. 2018; 38(1): 32-50.

125. Campbell, I.M., Shaw, C.A., Stankiewicz, P., Lupski, J.R. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends in Genetics*. 2015;xx: 1-11.

126. De Grouchy, J., et al. Dysmorphie complexe avec oligophrénie: Délétion des bras courts d'un chromosome 17-18. *D. R. Acad. Sci*. 1963;256: 1028.

127. Thompson, R.W., Peters, J.E., Smith, S.D. Intellectual, behavioral, and linguistic characteristics of three children with 18p- syndrome. *J Dev Behav Pediatr*. 1986;7(1):1-7.

128. Turleau, C. Monosomy 18p. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2008;3(4): 1-5.

Capítulo 14.

ANEXO

14.1. Anexo I.

A Balanced Reciprocal Translocation t(2;9) (p25;q13) Disrupting the *LINC00299* Gene in a Patient with Intellectual Disability

Halinna Dornelles-Wawruk^a Romina Soledad Heredia^{b,c} Milton Rego de Paula-Junior^c Maria T. de Oliveira Cardoso^b Raphael S. Bonadio^d
Bianca Fujita dos Reis^b Aline Pic-Taylor^{a,d} Silviene F. de Oliveira^{a,d}
Juliana Forte Mazzeu de Araújo^{a,e}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^bHospital de Apoio de Brasília, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, Brasília, Brazil; ^cPrograma de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^dDepartamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^eFaculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.**Established Facts**

- Long intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) are involved in a range of biological processes including gene regulation and development
- These molecules have also been involved in the pathogenesis of different types of cancer.

Novel Insights

- We confirm that *LINC00299* may be a candidate gene for intellectual disability and therefore plays a role in the development and maintenance of the central nervous system.

KeywordsIntellectual disability · LincRNA · *LINC00299***Abstract**

Long intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) are a class of noncoding RNAs implicated in several biological processes. LincRNA 299 (*LINC00299*) maps to 2p25.1 and its function is still unknown. However, this gene has been proposed as a candidate for intellectual disability (ID) in a patient with a balanced translocation where the breakpoint disrupted its ORF.

Here, we describe a new case of *LINC00299* disruption associated with ID. The individual, a 42-year-old woman, was referred to the clinical geneticist because of her son, who had severe syndromic ID. G-banding and chromosomal microarray analysis were performed. Karyotyping of the boy revealed an extranumerary derivative chromosome identified as an unbalanced translocation between chromosomes 2 and 9 of

HD./W. and R.S.H. contributed equally to this work.

KARGER

© 2019 S. Karger AG, Basel

E-Mail: karger@karger.com
www.karger.com/tnyJuliana Forte Mazzeu de Araújo
Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília
Campus Universitário Darcy Ribeiro
Brasília, DF 70910-900 (Brazil)
E-Mail: jufmazzeu@pq.cnpq.br