



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES CANDIDATAS A
MAPEAMENTO FENOTÍPICO ANORMAL A PARTIR DE
REARRANJOS CROMOSSÔMICOS ESTRUTURAIS
CONSIDERADOS BALANCEADOS.**

Ingrid Bendas Feres Lima

**Rio de Janeiro,
Novembro de 2022**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES CANDIDATAS A
MAPEAMENTO FENOTÍPICO ANORMAL A PARTIR DE
REARRANJOS CROMOSSÔMICOS ESTRUTURAIS
CONSIDERADOS BALANCEADOS.**

Ingrid Bendas Feres Lima

Dissertação apresentado(a) à Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética Médica Aplicada à Saúde da Criança e Adolescente.

Orientador: Dr. Juan Clinton Llerena Júnior
Co-Orientadora: Dra. Elenice Ferreira Bastos

**Rio de Janeiro
Novembro de 2022**

CIP - Catalogação na Publicação

Lima, Ingrid Bendas Feres.

Identificação de regiões candidatas a mapeamento fenotípico anormal a partir de rearranjos cromossômicos estruturais considerados balanceados. / Ingrid Bendas Feres Lima. - Rio de Janeiro, 2022.

87 f.; il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2022.

Orientador: Juan Clinton Llerena Junior.

Co-orientadora: Elenice Ferreira Bastos.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Rearranjos estruturais aparentemente balanceados. 2. Sequenciamento de nova geração. 3. Mapeamento fenotípico. 4. FISH. 5. CHG-array. I. Título.

A todos os membros da comunidade científica

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao meu orientador Dr. Juan Llerena por todo ensinamento e pela orientação no projeto.

À minha co-orientadora Dra. Elenice Bastos pela confiança no meu potencial, aulas, auxílios e pela oportunidade de aprendizado constante durante esses anos.

Aos meus colegas de laboratório de citogenética clínica e citogenômica do centro de Genética Médica do Instituto Fernandes Figueira, Anna Luiza, Carlos Roberto, Lúcia e Naiara pelos auxílios e colaboração com esse estudo, além da amizade construída ao longo desses anos.

Ao Dr. Társis Vieira por me abrir as portas do laboratório de Medicina Genômica da Universidade Federal de Campinas e permitir minha visita, além dos ensinamentos sobre a-CGH junto de sua aluna de doutorado Gabriela Roldão.

A todos os funcionários e servidores do Centro de Genética Médica do Instituto Fernandes Figueiras – Fiocruz.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional.

Agradeço aos meus amigos por toda amizade e momentos de descontração.

Ao meu namorado Lucas por alegrar meus dias e pelo incentivo dado a todo o momento.

LISTA DE SIGLAS

AHC – Hipoplasia Adrenal Congênita

BPES – Síndrome de Blefarofimose-ptose-epicanto invertido

BWA – Alinhador Burrows-Wheeler

CGH - Hibridização Genômica Comparativa

CGH-*array* – Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos

CGM – Centro de Genética Médica

DAPI – 4',6-*diamidino-2-phenylindole*

DI – Deficiência Intelectual

DNA – Ácido Dioxirribonucleico

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

EDTA –Etilenodiamino Tetra-Acético

FISH – Hibridização in Situ por Fluorescência

HCl – Ácido Clorídrico

IBMC – *Breakpoint Mapping International Consortium*

IFF – Instituto Fernandes Figueira

IGV – *Integrative Genoma Viewer*

Kb – Kilobase

KCl – Cloreto de Potássio

KH₂PO₄ – Fosfato Monopotássico

Mb – Megabase

MMS – Mesomelia-Sinostose Síndrome

MPS – Sequenciamento “*mate-pair*”

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – Citrato de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

Na_2HPO_4 – Fosfato Dissódico

NaOH – Hidróxido de Sódio

NF1 – Neurofibromatose tipo I

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

NOR – Região Organizadora de Nucléolo

PAP – Fosfatase Ácida Fosfatídico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RHDA3 – hipodisplasia/aplasia renais 3

RNA – Ácido Ribonucleico

MRKH tipo II – Síndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser tipo II

SUS – Sistema Único de Saúde

SVS – Variações Estruturais

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

WAGR – Tumor de Wilms, Aniridia e Anomalias Genitais, Retardo mental

Resumo

A maioria dos casos de portadores de translocações balanceadas são clinicamente normais, porém, cerca de 7% delas estão associadas a alterações fenotípicas, que incluem malformações congênitas e/ou retardo mental. Investigações detalhadas das regiões dos sítios de quebra desses rearranjos estruturais aparentemente balanceados, têm sido utilizadas como estratégia na busca de novos genes candidatos a esses fenótipos clínicos. Este projeto visa caracterizar casos de anomalias cromossômicas estruturais, especialmente os casos de translocações aparentemente balanceadas, em nível da citogenética clássica, pelas técnicas de bandeamento de cromossomos metafásicos e citogenética molecular, pela metodologia de Hibridização *in Situ* por Fluorescência (FISH) e técnicas de biologia molecular, como: Hibridização Genômica Comparativa baseada em microarranjos (a-CGH) e Sequenciamento de “*mate-pair*” delimitando regiões de busca para genes candidatos. E portanto, contribuir para o entendimento dos mecanismos que podem levar à um desfecho de alteração fenotípica em pacientes com translocações aparentemente balanceadas. Foram incluídos no projeto 5 casos de pacientes do Centro de Genética Médica que eram portadores de translocações aparentemente balanceadas *de novo* associados a fenótipo alterados. Caso 1 apresentou uma translocação recíproca entre o braço longo cromossomo 1 e braço longo do cromossomo 8 [46, XY, t(1;8)(p31;q13)], as análises realizadas sugeriram o gene *PLPP3* como o provável candidato para correlação com o fenótipo e uma quebra intragênia no gene *SLCOA5*, que está associado a síndrome Mesomelia-Sinostose. O caso 2 possui uma translocação recíproca entre o braço longo do cromossomo 1 e braço longo do cromossomo 18 [46, XX, t(1;18)(q43;q11.1)], apresentando quadro clínico compatível com a síndrome de *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser* (MRKH), o gene *GREB1L*, localizado na região de quebra 18q11, foi considerado como o principal candidato de interesse a mapeamento fenotípico associado a esta síndrome. O caso 3 é portador de uma translocação envolvendo o braço curto do cromossomo X e o braço longo de um cromossomo autossômico [46, XX, t(X;18)(p21.2;q22.3)], o sequenciamento de *mate-pair* demonstrou uma quebra gênica em *DMD*, sendo crucial para o diagnóstico clínico da paciente. O caso 4 apresenta uma translocação entre o braço longo do cromossomo 18 e braço longo do cromossomo 21 [46, XY t(18;21)(q23;q22.1)], foi observado uma microdeleção na região 18q23 por array-CGH que incluía o gene *TSHZ1*, deleções ou mutações neste gene estão associadas a fenótipos que se relacionam com o quadro clínico do paciente. O caso 5 é portador de uma translocação entre o braço curto do cromossomo 12 e cromossomo 22 [45, XX, -22(p13;q11)] com suspeita clínica de Síndrome de Edwards, foram identificadas duas perdas patogênicas na paciente, uma no cromossomo 13 e outra no cromossomo 22. Devido a presença de alterações adicionais a translocação não foi possível sugerir um gene ou região candidata a relação genótipo-fenótipo da paciente.

Palavras-chave: FISH, CHG-array, mapeamento fenotípico; sequenciamento de nova geração; rearranjos estruturais aparentemente balanceados

Abstract

Most cases of patients with balanced translocations are clinically normal, and about 7% of them are associated with phenotypic changes, which include congenital malformations and/or mental retardation. Related investigations of the break site regions of these apparently balanced rearrangements have been used as a strategy in the search for new candidate genes for these abnormal clinical phenotypes. This project aims to characterize cases of chromosomal anomalies present, especially cases of apparently balanced translocations, at the level of classical cytogenetics, by metaphase chromosome banding techniques, molecular cytogenetics, by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) methodology and sequencing techniques of Deoxyribonucleic Acid (DNA), Comparative Genomic Hybridization based on microarrays (a-CGH) and “mate-pair” sequencing delimiting search regions for genes and candidates for the understanding of individuals that can lead to an outcome of phenotypic change in patients with apparently balanced translocations. The project included 5 cases of patients from the Medical Genetics Center who were carriers of apparently de novo balanced translocations associated with altered phenotype. Case 1 showed a reciprocal translocation between the long arm of chromosome 1 and the long arm of chromosome 8 [46, XY, t(1;8)(p31;q13)], the analyses performed suggested the PLPP3 gene as the likely candidate for correlation with the phenotype and an intragenic break in the SLCOA5 gene, which is associated with Mesomelia-Synostosis syndrome. Case 2 carries a reciprocal translocation between the long arm of chromosome 1 and the long arm of chromosome 18 [46, XX, t(1;18)(q43;q11.1)], presenting a clinical picture compatible with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome, the GREB1L gene, located in the 18q11 break region, was considered as the main candidate of interest for phenotype mapping associated with this syndrome. Case 3 has a translocation involving the short arm of the X chromosome and the long arm of an autosomal chromosome [46, XX, t(X;18)(p21.2;q22.3)], mate-pair sequencing demonstrated a gene break in DMD, being crucial for the clinical diagnosis of the patient. Case 4 has a translocation between the long arm of chromosome 18 and long arm of chromosome 21 [46, XY t(18;21)(q23;q22.1)], a microdeletion was observed in the 18q23 region by array-CGH that included the TSHZ1 gene, deletions or mutations in this gene are associated with phenotypes that relate to the patient's clinical picture. Case 5 carries a translocation between the short arm of chromosome 12 and chromosome 22 [45, XX, -22(p13;q11)] with clinical suspicion of Edwards Syndrome, two pathogenic losses were identified in the patient, one on chromosome 13 and one on chromosome 22. Due to the presence of additional alterations to the translocation it was not possible to suggest a candidate gene or region for the patient's genotype-phenotype correlations.

Keywords: FISH, array-Comparative Genomic Hybridization (a-CGH), molecular cytogenetic; phenotype mapping; next-generation sequencing; apparently balanced chromosomal rearrangements

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Justificativa.....	17
3. Objetivos.....	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos específicos:.....	18
04. Referencial Teórico	19
4.1 Alterações Cromossômicas.....	19
4.2 Translocações	21
4.2.1 Translocação balanceada	22
4.2.2 Translocação aparentemente balanceada com fenótipo anormal	23
4.3 Caracterização citogenética e molecular de alterações cromossômicas	25
4.4 CGH-array	26
4.5 Sequenciamento de nova geração (NGS)	28
4.6 Sequenciamento de “ <i>mate-pair</i> ” (MPS).....	29
5. Metodologia.....	31
5.1 Obtenção de cromossomos metafásicos a partir de sangue periférico:	33
5.2 Obtenção de cromossomos prometafásicos a partir de sangue periférico:	33
5.3 Preparação das lâminas:.....	34
5.4 Técnicas de coloração e marcação cromossômica	34
5.4.1 Técnica de Bandeamento GTG:	34
5.4.2 Técnica de bandeamento QFQ	35
5.4.3 Técnica de marcação CBG	35
5.5 Citogenética Molecular	36
5.5.1 Técnica de Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH):.....	36
5.6 Análise por Biologia Molecular	36
5.6.1 Extração de DNA.....	36
5.6.2 Quantificação do DNA	37
5.6.3 Quantificação com Nanodrop.....	38

5.6.4 Técnica Microarray a-CGH (Hibridização Genômica Comparativa por <i>Microarray</i>)	38
7.6.5 Sequenciamento “ <i>mate-pair</i> ”	42
6. Questões Éticas	44
7. Resultados e Discussões	45
7.1 Caso I – 46, XY, t(1;8)(p31;q13)	45
7.2 Caso II - 46, XX, t(1;18)(q43;q11.1).....	51
7.3 Caso III - 46, XX t(X;18)(p21.2;q22.3)	56
7.4 Caso IV - 46, XY t(18;21)(q23;q22.1)	63
7.5 Caso V - 45, XX, -22 t(12;22)(p13;q11)	66
8. Conclusão	71
9. Referências Bibliográficas.....	73
ANEXO 1 – TCLE	79
ANEXO II	83
ANEXO III	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema demonstrando as alterações cromossômicas estruturais mais comuns (Adaptado de Thompson & Thompson, 2008).....	21
Figura 2 Esquema representando as possíveis recombinações nos gametas originados de um portador de translocação recíproca (Adaptado de Thompson & Thompson, 2008).....	23
Figura 3 Esquema demonstrativo do fluxo da técnica de CGH-array (Adaptado da <i>Internet</i>).	28
Figura 4 Imagem adaptada de <i>Internet</i> demonstrando esquema da técnica de sequenciamento de "mate-pair".....	30
Figura 5 Esquema demonstrando o fluxo da inclusão dos pacientes até as análises metodológicas.....	32
Figura 6 Esquema demonstrando o fluxo da metodologia	43
Figura 7 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 1 e 8 e seus pontos de quebra.	46
Figura 8 - Cariótipo em banda G = 46, XY, t (1;8)(p31;q13) “de novo”	46
Figura 9 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando as sondas MYC (marcação vermelha e verde) e 1qter (marcação verde), demonstrando a presença da região 8q24.21 (MYC) no cromossomo 1 uma vez que o cromossomo apresentou as duas marcações.	47
Figura 10 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando as sondas WCP8 – painting de 8 (verde) e 1qter (marcação vermelha). Podemos observar 3 marcações verdes, uma no cromossomo 8 íntegro, outra no derivado de 8 e outra marcação no derivado de 1 e duas marcações vermelhas, uma na região telomérica do cromossomo 1 íntegro e outra no derivado de 8, o que demonstra a translocação entre os cromossomos 1 e 8.	48
Figura 11 - Esquema demonstrando a região dos pontos de quebra resultantes da análise de <i>mate-pair</i> dos cromossomos 1 (bloco superior) onde abrange a região do gene <i>PPAP2B</i> e do cromossomo 8 (bloco inferior) onde a quebra aconteceu na região do gene <i>SLCO5A1</i>	49
Figura 12 Imagem demonstrativa do <i>Genome Browser</i> da região 1p32.2 englobando os genes <i>PLPP3</i> . Em verde são exibidos genes e alelos registrados no OMIM e em azul os genes <i>RefSeq</i> do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).....	50

Figura 13 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 1 e 18 e seus pontos de quebra.....	52
Figura 14 Cariótipo em banda G [46, XX, t (1;18)(q43;q11.2)]	52
Figura 15 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando sonda LPP18R confirmou translocação recíproca entre os cromossomos 1;18. As setas indicam a presença de material do cromossomo 18, como podemos observar são encontrados em 3 regiões, em um dos cromossomos 18 íntegro, uma pequena marcação no derivado de 18 e no derivado de 1 a parte translocada do cromossomo 18.....	53
Figura 16 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando a sonda LPU020 mostrou a integridade da região 1p36, sinal vermelho e indicado pelas setas e confirmou a natureza recíproca da translocação, sinal verde da marcação 1qter no cromossomo derivado de 18.	54
Figura 17 Imagem demonstrativa do <i>Genome Browser</i> da região 18q11.2. Destacados os genes GREB1L, GATA6 e CABLES1. Em verde são exibidos genes e alelos registrados no OMIM e em azul os genes <i>RefSeq</i> do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).....	55
Figura 18 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos X e 18 e seus pontos de quebra (Xp11.2 e 18q22.3).....	56
Figura 19 Cariótipo em banda G [46, XX, t (X;18)(p21.2;q22.3)]	57
Figura 20 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando a sonda “painting” para o cromossomo 18 (vermelho) e a sonda centromérica do cromossomo X (verde). Podemos notar (seta) a ausência de hibridização na porção terminal do cromossomo derivado de 18 que sabidamente provém do derivado do cromossomo X, cujo braço curto apresenta-se menor.	58
Figura 21 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando utilizando a sonda “painting” para o cromossomo X e a sonda centromérica do cromossomo 18. Podemos observar a presença de segmento do cromossomo X no derivado do cromossomo 18, uma marcação em seu braço longo na região terminal (seta). O círculo branco indica o cromossomo derivado de X, sua marcação em vermelho é menor que do cromossomo X íntegro.....	59
Figura 22 Técnica FISH utilizando a sonda telomérica de 18q, marcação vermelha e a sonda centromérica do cromossomo X, marcação verde. Podemos observar a presença de	

material proveniente do telômero de 18 no cromossomo derivado de X indicada pela seta menor, confirmando uma translocação recíproca.	60
Figura 23 Técnica 5-BrdU em metáfase mostrando a inativação preferencial do cromossomo X normal. As setas azuis mostram o cromossomo X, a seta inferior mostra o cromossomo X normal mais pálido, ou seja, inativado e o cromossomo derivado de X mais corado, indicado pela seta superior. A seta vermelha indica o cromossomo 13 de replicação tardia, como controle da técnica.	61
Figura 24 Esquema demonstrando a região do ponto de quebra resultantes da análise de <i>mate-pair</i> do cromossomo 18 que abrange a região regulador do gene <i>SALL3</i>	62
Figura 25 Esquema demonstrando a região do ponto de quebra resultantes da análise de <i>mate-pair</i> do cromossomo X dentro do gene <i>DMD</i>	63
Figura 26 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 18 e 21 e seus pontos de quebra.	64
Figura 27 Cariótipo em banda G [46, XY, t (18;21)(q23;q22.1)]	64
Figura 28 Imagem demonstrativa do Genome Browser da região 18q22.3. Destacado o gene <i>TSHZ1</i> mais próximo da região de 18q23, que foi delimitada como ponto de quebra da translocação envolvendo os cromossomos 18 e 21 pelo bandeamento GTG. Em verde são exibidos genes e alelos registados no OMIM e em azul os genes <i>RefSeq</i> do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).	65
Figura 29 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 12 e 22 e seus pontos de quebra.	67
Figura 30 Cariótipo em banda G [45, XX, -22, t(12;22)(p13;q11)]	67
Figura 31 Resultado da análise cromossômica por microarranjo cromossomo 13. 1- Segmento que mostra os segmentos alterados e em vermelho mostra a região de deleção na região do braço longo do cromossomo 13q32.3q34 (99,224,026-115,107,733), 2- Segmento as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo. Na região da deleção as sondas correspondentes aparecem em menor quantidade do que o normal (estão abaixo da linha central), 3- Segmento que mostra a quantidade de cópias referentes as sondas da linha 2, na região da deleção há apenas uma cópia, 4- Segmento que mostra regiões de perda de heterozigose, uma vez que houve deleção essas linhas estão mais próximas, 5- Segmento que mostra o inverso da linha 4.	68

Figura 32 Resultado da análise cromossômica por microarranjo cromossomo 22. 1- Segmento que mostra os segmentos alterados e em vermelho mostra a região de deleção na região do braço longo do cromossomo 22q11.1q11.21(17,034,539-20,312,661 2- Segmento que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo. Na região da deleção as sondas correspondentes aparecem em menor quantidade do que o normal (estão abaixo da linha central). 3- Segmento que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Na região da deleção há apenas uma cópia para essa região de sondas. 4- Segmento que mostra regiões de perda de heterozigose, uma vez que houve deleção essas linhas estão mais próximas, 5- Segmento que mostra o inverso da linha 4. ... 69

Figura 33 Resultado da análise cromossômica por microarranjo do cromossomo 12 envolvido na translocação 1- Segmento que mostra os segmentos alterados, indicando que não há alteração significativa no cromossomo analisado. 2- Segmento que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo, apresentando-se sem alteração. 3- Segmento que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior também não apresentando alterações. 4- Segmento que mostra regiões de perda de heterozigose quando existente, 5- Segmento que mostra o inverso da linha 4..... 69

1. Introdução

As alterações cromossômicas correspondem a uma causa importante de morbidade e mortalidade no homem. Segundo Jacobs e Hassold (1), seis a cada mil nascidos vivos carregam uma alteração cromossômica, sendo as aneuploidias, anormalidades quanto ao número de cromossomos devido à perda ou ganho do mesmo, o tipo mais frequente. As anomalias estruturais compreendem cerca de 40% das alterações cromossômicas nos recém-nascidos (2), sendo os principais tipos: as deleções, quando há perda de segmento cromossômico; as duplicações, quando há ganho de material cromossômico; as inversões, quando o segmento cromossômico está em posição invertida e as translocações, quando há troca de fragmento entre dois cromossomos não homólogos (3). As alterações estruturais são definidas como não-balanceadas, quando há perda ou ganho de material, como no caso das deleções e duplicações, e balanceadas, quando não há perda ou ganho de material genético no conjunto cromossômico, apenas uma alteração na estrutura do cromossomo, como no caso das inversões e translocações(2).

Estes rearranjos estruturais são predominantemente equilibrados e seus portadores normalmente não apresentam sinais ou sintomas clínicos (4). Por outro lado, estima-se que em cerca 6-10% dos casos *de novo* de alterações estruturais citogenéticas aparentemente balanceadas podem estar associados a fenótipos clínicos específicos (5), em decorrência, entre outras causas, de microdeleções e/ou duplicações genômicas nos sítios de quebra envolvidos na anomalia cromossômica, levando há uma quebra de continuidade de genes específicos localizados nessa região ou próximo (6).

A primeira doença mendeliana a ser mapeada a partir de um rearranjo cromossômico balanceado foi a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) no locus Xp21. Foram descritos vários casos de mulheres afetadas por DMD, portadoras de translocações recíprocas entre o cromossomo X e um autossomo (7,8). Em todos os casos o ponto de quebra no cromossomo X ocorreu na banda Xp21, sugerindo o mapeamento do gene da distrofina nesta região e que a doença teria sido consequência da disrupção gênica devido a quebra ocorrida durante o mecanismo da translocação. Junto com a detecção de deleções em homens afetados, estes resultados permitiram posteriormente a clonagem do gene da DMD em Xp21 (9).

Genes localizados em cromossomos autossômicos também tem sido descritos em estudos de rearranjos cromossômicos equilibrados, como o gene da neurofibromatose tipo 1, localizado no cromossomo 17 através do estudo de duas translocações com pontos de quebra em 17q11.2 (10,11). Wallace e cols.(12), verificaram que o gene *neurofibromin 1* (NF1) tinha sido interrompido pelas quebras dessas translocações. Assim como, por exemplo, a indicação da região 3q23 na síndrome de Blefarofimose (BPES) diante de uma t(8p;3q) (13). Posteriormente, o gene FOXL2 mapeado na região 3q21 (14).

Atualmente, o Laboratório de Citogenética Clínica pertencente ao Centro de Genética Médica do Instituto Fernandes Figueira – Fiocruz, mantém uma parceria com um consórcio internacional para o mapeamento de pontos de quebra, o “*Breakpoint Mapping International Consortium (IBMC)*” que é coordenado pelo Prof. Dr. Niels Tommerup da Universidade de Copenhagen, Dinamarca. A proposta deste consórcio é reavaliar os casos

de rearranjos estruturais balanceados pelo método de sequenciamento de nova geração (sequenciamento por “*mate-pair*”) que será direcionado para as regiões dos pontos de quebra envolvidos no mecanismo de rearranjos estruturais.

Assim, pretendemos correlacionar os achados clínicos, laboratoriais (citogenética clássica, citogenética molecular e análise molecular por sequenciamento de próxima geração) com os bancos de dados do genoma humano objetivando a definição de potenciais regiões alvo para o mapeamento destas condições, assim como para identificação de novos genes alvo associados a doenças e/ou condições clínicas.

2. Justificativa

Como centro de referência em Genética Médica, o Instituto Fernandes Figueira (IFF/CGM) recebe muitos pacientes de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro e do Brasil (15). A análise citogenética clássica (através do bandeamento GTG e cariotipagem) nos permite identificar rearranjos num nível de resolução em torno de 4 Mb. Para a detecção de alterações menores, torna-se necessária a utilização de técnicas de biologia molecular associadas a citogenética (citogenética molecular). O desenvolvimento de métodos como os de CGH-*array* e de sequenciamento do DNA chamados métodos de sequenciamento de nova geração, tem permitido um avanço significativo na caracterização de regiões nos pontos de quebra de cromossomos especialmente envolvidos em translocações. Este projeto, além de trazer uma aplicação prática no que se refere ao refinamento do diagnóstico citogenético dos pacientes assistidos no IFF/CGM, também tem o seu caráter de pesquisa, uma vez que o melhor delineamento citogenético-molecular das alterações em questão pode nos trazer valiosos resultados para o entendimento dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na etiologia das malformações congênitas e/ou do déficit intelectual, colaborando, inclusive para o mapeamento fenotípico e identificação de novos genes potencialmente deletérios.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Identificar possíveis genes ou regiões candidatas associadas a alterações cromossômicas estruturais aparentemente balanceadas e a fenótipos clínicos anormais

3.2 Objetivos específicos:

- Identificar e caracterizar alterações cromossômicas estruturais balanceadas;
- Delimitar os pontos de quebra envolvidos em tais alterações por métodos de citogenética convencional e molecular;
- Investigar as anomalias cromossômicas selecionadas pela técnica de CGH-*array*;
- Sequenciar as regiões flangeadoras dos pontos de quebra pela metodologia do “*mate-pair sequencing*”;
- Realizar a correlação cariótipo-genótipo-fenótipo dos casos em questão.

04. Referencial Teórico

4.1 Alterações Cromossômicas

As anomalias cromossômicas têm uma grande importância já que são uma das principais causas de doenças genéticas e de abortos de repetição (2). São classificadas, de modo geral, em alterações numéricas ou estruturais, podendo afetar um ou mais cromossomos simultaneamente, e podem estar presentes em todas as linhagens celulares do indivíduo ou em forma de mosaico. O mosaicismo refere-se a presença de duas ou mais linhagens de células geneticamente diferentes sendo originadas do mesmo zigoto (16).

O conjunto genômico de um indivíduo normal é composto por 46 cromossomos ($2n$ - diplóide) em células somáticas e 23 cromossomos (n - haplóide) nos gametas, assim, qualquer mudança em relação a essa numeração é classificada como alteração numérica, com exceção de algumas translocações, como as robertsonianas, que possuem tanto alteração numérica quanto estrutural. O termo euploidia é utilizado para designar o conjunto cromossômico completo ou seus múltiplos. Assim números euplóides alterados, na espécie humana, correspondem a presença de três ou mais conjuntos cromossômicos completos ($3n$, $4n$, etc). Já aneuploidias, referem-se a presença de cromossomos a mais ou a menos, levando a modificação dessa relação de conjunto cromossômico completo, ($2n + 1$, $2n - 1$, por exemplo). (17).

As euploidias são encontradas em células normais de um indivíduo na forma haplóide e diploide, porém em níveis acima elas são denominadas poliploidias e geralmente os indivíduos são incompatíveis com a vida (18). Já as aneuploidias são o tipo mais comum

de anomalia cromossômica com impacto clínico e são divididas em: a) Polissomias, quando há um ganho no número de cromossomos (trissomia, tetrassomia, etc); b) Monossomia, quando há a perda de apenas um cromossomo do par ou c) Nulissomia, quando há a perda total do par de cromossomos homólogos (19). A causa mais comum da formação das alterações numéricas é devido ao mecanismo de não-disjunção, que ocorre quando há um erro na separação dos pares de cromossomos homólogos, geralmente durante a meiose I, mas também pode ocorrer durante a meiose II (2).

As alterações estruturais, geralmente não interferem no número de cromossomos do indivíduo, e sim em sua morfologia, com exceções de alguns tipos de rearranjos como as translocações robertsonianas onde há alteração no número total de cromossomos. São classificadas em quatro principais grandes grupos (Figura 1) : a) Deleção, quando há perda de segmento cromossômico; b) Duplicação, quando há ganho de material cromossômico; c) Inversão, quando o segmento cromossômico se encontra em posição invertida; d) Translocação, quando há troca de fragmento entre dois cromossomos não-homólogos (17). Ainda existem outros rearranjos cromossômicos, como os e) Isocromossomos, que ocorre devido a uma divisão transversal e não longitudinal das cromátides filhas na meiose acarretando há uma perda de um dos seus seguimentos de braços e a duplicação por completo do braço que não foi perdido, se ligando pelo mesmo centrômero de forma espelhada (20) os f) Cromossomos em anéis, formados a partir da quebra de segmentos nas duas extremidades do braço curto e longo do cromossomo e, pela sua instabilidade, eles se ligam formando uma estrutura circular geralmente com a presença de um único centrômero, mas também existem casos em que o anel pode apresentar mais de um centrômero e as g)

Inserções, quando há a quebra de um segmento cromossômico e ele se insere em um cromossômico não homólogo(2,3).

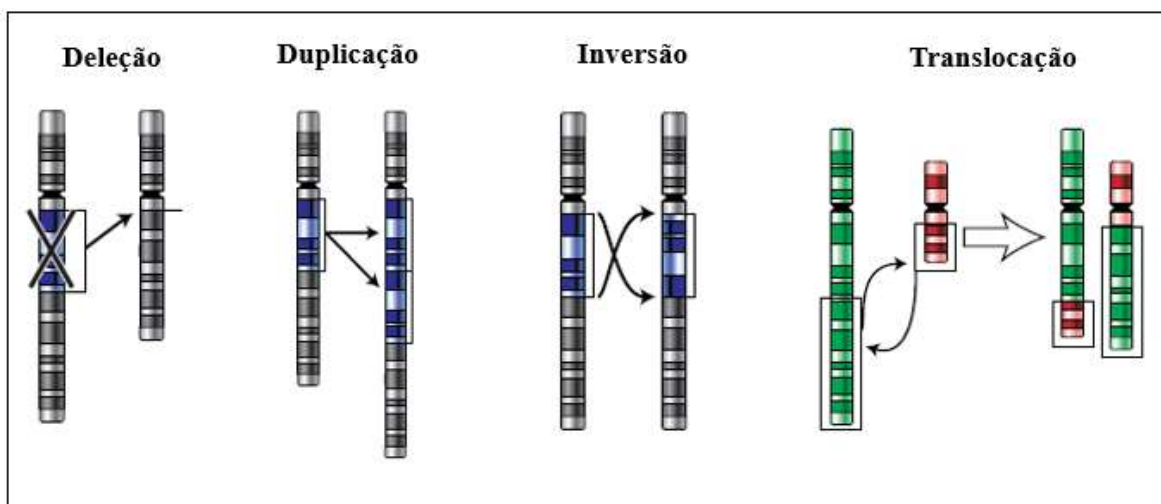


Figura 1: Esquema demonstrando as alterações cromossômicas estruturais mais comuns (Adaptado de Thompson & Thompson, 2008)

Em sua grande maioria, as alterações estruturais se dão devido a uma ruptura cromossômica, seguida pela sua restauração por uma combinação anormal. Podem ocorrer de forma espontânea ou serem induzidas por agentes clastogênicos, como algumas infecções virais, radiações ionizantes ou agentes químicos, em qualquer estágio do ciclo celular e também podem estar presentes em todas as linhagens de células do indivíduo, ou, em um frequência extremamente menor, se apresentar em mosaico (2,3).

4.2 Translocações

Como dito anteriormente, a translocação envolve a troca de segmento entre dois cromossomos e são classificadas em dois principais tipos: a) Robertsonianas e b) Recíprocas (17) e também as c) Não recíprocas, como no caso das inserções. São

consideradas translocações Robertsonianas aquelas que envolvem dois cromossomos acrocêntricos, tendo a perda de seus braços curtos seguido da fusão da região próxima aos centrômeros ou mesmo dentro do centrômero, são os rearranjos mais recorrentes e são encontrados em cerca de um a cada 1000 indivíduos(21). Já as translocações Recíprocas envolvem a ruptura e a troca recíproca dos seguimentos partidos entre cromossomos não homólogos, são menos comuns e estão presentes em cerca 0,52-1,54% dos nascidos vivos(22). Indivíduos fenotipicamente normais, portadores de translocação Robertsonianas, produzem cerca de 12 a 18% de seus gametas desbalanceados (23), e portadores de translocação recíproca aproximadamente 19 a 72% dos gametas, podem ser desbalanceados (24).

A maioria dos rearranjos cromossômicos são herdados, ou seja, transmitidos de genitores para seus descendentes, porém podem ocorrer eventos “*de novo*”, quando a alteração surge apenas naquele indivíduo (2).

4.2.1 Translocação balanceada

Rearranjos balanceados, na grande maioria dos casos, não acarreta alteração no fenótipo, pois, apesar de estruturalmente o cromossomo se apresentar de forma anormal, não há alteração quanto ao conteúdo total do material genético (2). Entretanto, mesmo sem consequências clínicas, os rearranjos balanceados são importantes em termos de aconselhamento genético, pois pessoas portadoras desses rearranjos produzem tanto gametas balanceados quanto desbalanceados (Figura 2), apresentando um risco para as próximas gerações e/ou abortos muito maior que o considerado da população geral (25).

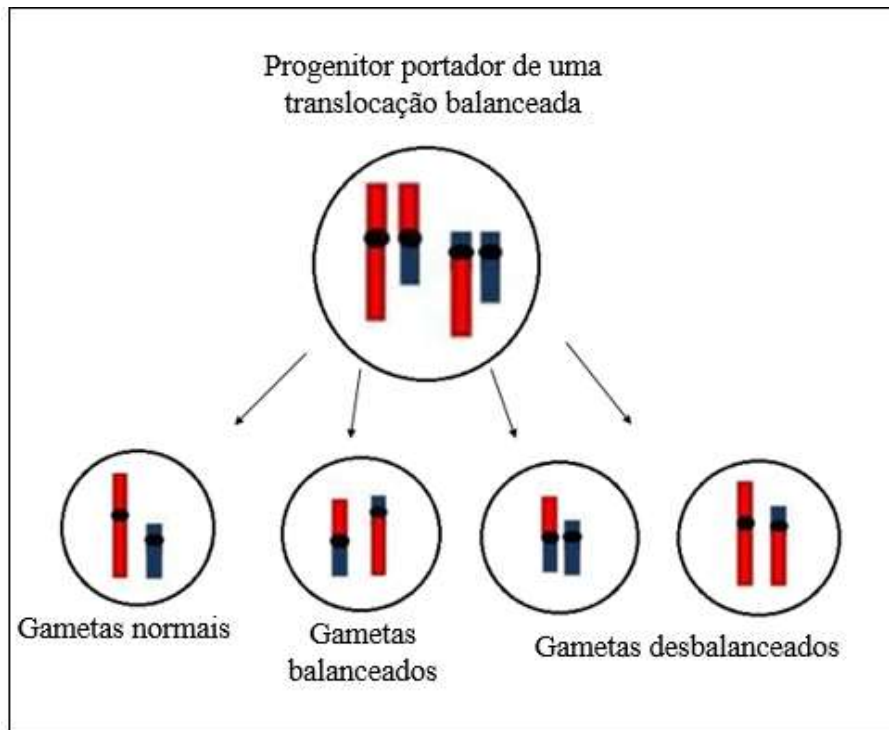


Figura 2 Esquema representando as possíveis recombinações nos gametas originados de um portador de translocação recíproca (Adaptado de Thompson & Thompson, 2008)

4.2.2 Translocação aparentemente balanceada com fenótipo anormal

Existem casos de rearranjos considerados balanceados a nível de resolução citogenética (400-500 bandas por conjunto haploide) associados a fenótipo anormal que devem ser distinguidos daqueles verdadeiramente balanceados, considerando a potencial existência de desbalanceamentos a nível molecular (26,27).

Quando ocorrem essas quebras para a troca de segmento entre os cromossomos, essas regiões podem estar localizadas dentro dos íntrons de dois genes, causando a fusão dos mesmo e gerando um gene anormal, como ocorre em muitos casos na ativação de oncogenes (2), ou, dentro de um único gene, o que pode levar a uma deleção intragênica, alterando sua funcionalidade ou a inativação do mesmo devido a sua disruptura (28). Em

alguns casos, ocorre uma mudança na expressão de genes devido a alteração de sua disposição no cromossomo, quando o mesmo é separado de sua região promotora, ou quando o fragmento translocado é alocado na região promotora de outro gene, mecanismo esse conhecido como efeito de posição (29).

Uma vez que o braço curto dos cromossomos acrocêntricos é pequeno e composto basicamente por região organizadora de nucléolo (NOR), a perda do mesmo não é deletéria, pois apesar da presença nesse local, de DNA ribossômico, estas sequencias são repetidas em todos os outros cromossomos acrocêntricos, que compensam a expressão gênica desses para a formação normal de ribossomos na célula (30). Assim, entende-se que esses rearranjos balanceados estejam sempre associados à fenótipo normal.

O estudo das translocações recíprocas, consideradas balanceadas a nível citogenético tem sido um instrumento importante na tentativa de identificação de regiões e/ou genes candidatos a fenótipo clínico a partir do mapeamento de seus pontos de quebra (6). Uma vez que existem diversos mecanismos genéticos associados a modificação gênica a partir deste tipo de rearranjo, como a ruptura gênica, efeito de posição e a inativação do cromossomo X (7,31,32).

O estudo de rearranjos estruturais equilibrados já vem sendo realizado em nosso laboratório com resultados expressivos. Nosso grupo publicou o caso de uma menina apresentando aniridia sem outras malformações, portadora de uma translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 11 e 13. A caracterização citogenética e molecular identificou uma deleção de cerca de 7,5Kb (Kilobase) na região da síndrome de

genes contíguos WAGR (Tumor de Wilms, aniridia e anomalias genitais associadas ou não ao retardo mental) no cromossomo 11p (33).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares como o NGS (sequenciamento de nova geração) e CHG-*array* a citogenética molecular tem trazido maior precisão na caracterização de rearranjos cromossômicos que possam estar envolvidos no desenvolvimento do quadro clínico de pacientes, principalmente as translocações aparentemente balanceadas, já essas não possuem grandes perdas ou ganhos que possam ser detectados pela citogenética convencional (6,34,35).

4.3 Caracterização citogenética e molecular de alterações cromossômicas

A análise cromossômica após bandeamento GTG e cariotipagem ainda é o exame citogenético de rotina na investigação de pacientes com suspeita de rearranjos cromossômicos (36,37). Os cromossomos metafásicos são analisados com resolução de 400 a 550 bandas por conjunto haplóide, isto corresponde a cerca de 5-10Mb de DNA. Para alguns casos, torna-se necessária a utilização de uma metodologia que nos permita identificar sub-regiões dos cromossomos, metodologia esta conhecida como análise por alta resolução na qual com a utilização de reagentes que intercalam o DNA, é possível obter cromossomos mais alongados com padrão de 650 a 850 bandas por conjunto haplóide (37,38), o que permite, considerando também a perspicácia do profissional analista, a detecção de alterações em torno de até 3Mb de DNA, permitindo assim, com esta última análise, a identificação de alterações cromossômicas segmentares menores, desvendando anomalias crípticas à citogenética convencional (27).

Na década de 80, deu-se início ao desenvolvimento da técnica de hibridação *in situ*, na qual utilizam-se sondas de DNA marcadas por fluorescência (FISH) (39), aprimorando consideravelmente a resolução da análise cromossômica, permitindo a detecção de regiões específicas (100-300kb), complementado assim a análise citogenética clássica. Nas análises por FISH, sondas de DNA de seqüências homólogas as seqüências alvo são marcadas com fluorocromos e hibridizadas em cromossomos metafásicos ou em células interfásicas do paciente para determinar ausência, presença, localização e número das seqüências genômicas analisadas (40). A partir dessa técnica tem sido possível a utilização dessas sondas para a identificação de anomalias cromossômicas sub-microscópicas, como nas síndromes de microdeleção: Prader-Willi, Angelman, Velocardiofacial, DiGeorge; Smith-Magenis e Williams (41). Para a realização deste exame é necessária a precisão da indicação clínica, uma vez que apenas as áreas de interesse são avaliadas (42,43).

Após o sequenciamento do genoma humano, várias sondas moleculares foram desenvolvidas e atualmente muitas das regiões envolvidas em síndromes de microdeleção conhecidas estão disponíveis comercialmente, assim como sondas que reconhecem o cromossomo inteiro, fusões gênicas, amplificação gênica, além regiões teloméricas, centroméricas e acrocêntricas de diferentes cromossomos (44,45).

4.4 CGH-array

A hibridização genômica comparativa (CGH) é uma técnica molecular desenvolvida em 1992 na qual permite um estudo cromossômico mais abrangente, através da análise de

alterações do número de cópias de DNA de todo genoma em um único experimento. Sendo assim, é capaz de detectar tanto perdas e/ou ganhos no DNA como as alterações cromossômicas submicroscópicas (46,47). Esse método vem sendo cada vez mais indicado para a avaliação de indivíduos com características dismórficas e deficiência intelectual (DI) (48), entretanto ainda não é acessível a maioria dos laboratórios dos serviços públicos de saúde no Brasil.

Ao longo dos anos métodos de CGH mais específicos foram desenvolvidos na busca de uma melhor resolução, entre eles o CGH-*Array*, tornando possível o refinamento da análise através da presença segmentos genômicos impressos em plataforma, assim integrando a genética convencional com a genética molecular(27). Diversos estudos mostram que a taxa de detecção de anomalias cromossômicas aumentou, aproximadamente em 10-20%, após o uso dessas tecnologias em comparação as análises realizadas pela citogenética padrão que gira em torno de 3 a 5% (46,48).

A técnica de *array*-CGH oferece vantagens sobre os demais métodos de diagnóstico citogenético devido a sua resolução genômica, que supera as limitações de um cariótipo convencional e sua capacidade de investigar diversas de regiões cromossômicas em uma única análise (36). Além de não haver a necessidade de obtenção de metáfases, o que consequentemente deixa dispensável o cultivo celular e o fato que a análise do DNA pode ser realizada através da extração de diferentes tecidos, incluindo os parafinados (49).

A grande restrição desta técnica é o fato do *array*-CGH não detectar rearranjos cromossômicos balanceados, como algumas inversões ou translocações, pois não há ganho

ou perda de material genético, e alterações de baixa frequência, muitas vezes não sendo possível identificar mosaicismos (50,51).

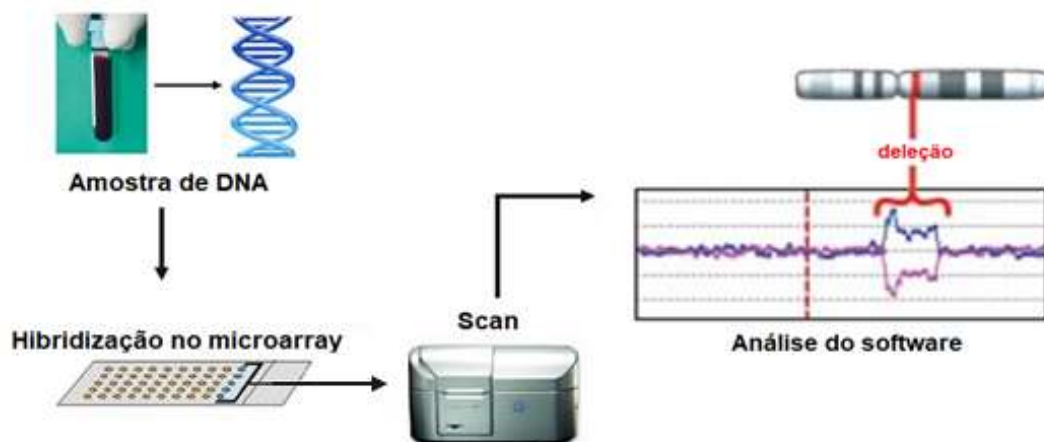


Figura 3 Esquema demonstrativo do fluxo da técnica de CGH-array (Adaptado da *Internet*).

4.5 Sequenciamento de nova geração (NGS)

O sequenciamento de ácidos nucleicos é um método para determinar a ordem exata de nucleotídeos presentes em uma dada molécula de DNA ou RNA (Ácido Ribonucleico) (52). Na última década, a utilização de sequenciamento tem aumentado exponencialmente à medida que se tornou mais acessível para laboratórios clínicos e de pesquisa de todo o mundo (53).

O primeiro grande passo para o sequenciamento de DNA foi o Projeto Genoma Humano, concluído em 2003. O Projeto Genoma Humano foi realizado com sequenciamento de primeira geração, conhecido como sequenciamento Sanger (método de terminação de cadeia), desenvolvido em 1975 por Edward Sanger, considerado padrão ouro para sequenciamento durante as próximas duas décadas e meia (54).

Desde a conclusão da primeira sequência do genoma humano, a demanda por métodos de sequenciamento mais baratos e mais rápidos tem aumentado consideravelmente (55). Essa demanda impulsionou o desenvolvimento de métodos de sequenciamento de nova geração (NGS), onde se é possível realizar um sequenciamento paralelo e massivo de milhões a bilhões de fragmentos de DNA a partir de uma única amostra com um menor custo e de forma mais rápida (56). Esta metodologia permite que um genoma inteiro seja sequenciado em menos de um dia ou que apenas sua área de interesse seja sequenciada, incluindo todos seus genes codificadores (exôma) ou apenas um determinado gene.(57,58).

Hoje em dia já existem um enorme número de diferentes plataformas de NGS que utilizam diferentes tipos de tecnologias (57).

4.6 Sequenciamento de “*mate-pair*” (MPS)

O princípio desta metodologia é similar ao método proposto por Sanger, pois temos em ambas a síntese de uma fita complementar ao DNA alvo utilizando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos (59). A fluorescência emitida após a incorporação de cada nucleotídeo é registrada como imagem e no final, através de uma decodificação destas imagens, a sequência de interesse é obtida (60).

Como toda técnica de NGS, antes do sequenciamento é necessário o preparo das bibliotecas onde vai conter o DNA a ser analisado (61). Essas bibliotecas podem ser classificadas em *paired-end* ou *mate-pair*. A primeira gera fragmentos com tamanhos entre 200 e 500 nucleotídeos, já na segunda, são gerados fragmentos maiores em ordem de

kilobases. Ou seja, o sequenciamento baseado em MPS envolve o corte de DNA em fragmentos genômicos de 2 a 10kb. Após a clivagem, e os fragmentos de DNA *mate-pair* serão ligados à adaptadores complementares em ambas as extremidades e serão circularizados com a adição de um marcador de biotina, refragmentados, gerando um único fragmento unidos pelo adaptador interno. O MPS permite a detecção de variações estruturais em projetos de ressequenciamento e de geração de “*scaffolds*” em projetos de sequenciamento de novo (60,62).

Este tipo de sequenciamento pode ser útil na caracterização de pontos de quebra em rearranjos cromossômicos estruturais, uma vez que torna-se possível a elaboração de painéis de sequenciamento sobrepondo as regiões envolvidas e assim, a identificação de possíveis micro rearranjos, deleções e ou duplicações dentro destas regiões (63).

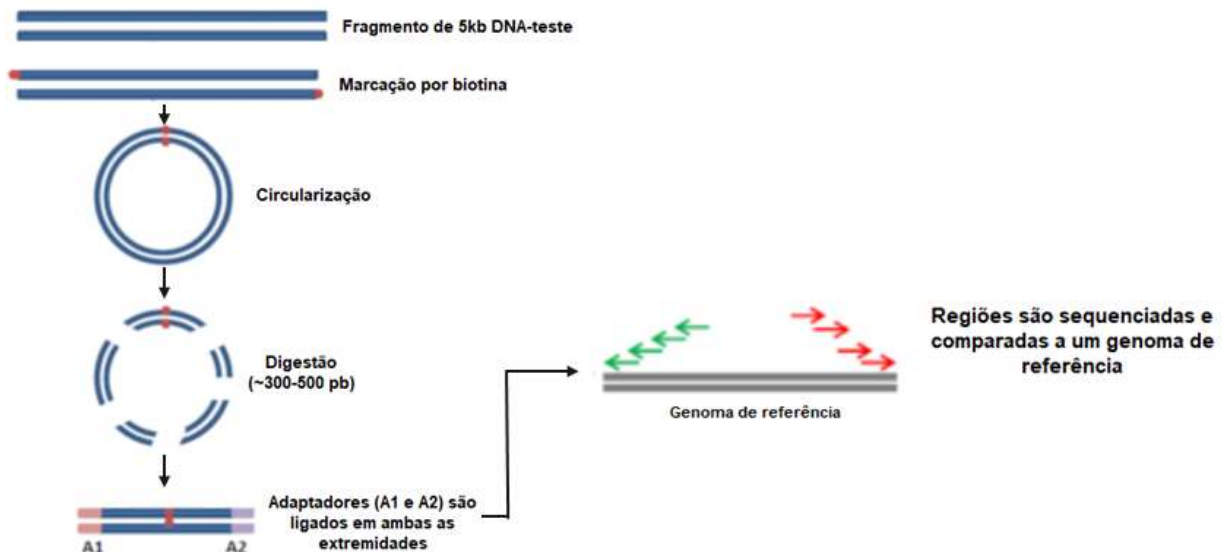


Figura 4 Imagem adaptada de *Internet* demonstrando esquema da técnica de sequenciamento de "mate-pair".

5. Metodologia

Os pacientes foram indicados para a avaliação citogenética por médicos geneticistas do IFF e/ou de instituições parceiras via Sistema Único de Saúde (SUS). A partir da identificação citogenética de uma alteração cromossômica estrutural, o paciente foi devidamente esclarecido pelo corpo clínico e, consentindo com o estudo pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), a amostra foi selecionada para a caracterização dos pontos de quebra a partir da utilização de diferentes metodologias.

Foi realizado um estudo retrospectivo e prospectivo. Envolveu a revisão de prontuários, livros de cadastros de citogenética e a realização de técnicas de citogenética e de citogenética molecular para complementação do estudo e caracterização de casos novos.

Os critérios de inclusão do estudo foram pacientes com cariótipo demonstrando translocação aparentemente balanceada, sem nenhuma outra alteração cromossômica, associada a fenótipo clínico alterado e os de exclusão os pacientes com translocação herdada de um dos pais sendo ele fenotipicamente normal, ou pacientes onde não seja possível analisar a amostra de um dos pais. As análises foram realizadas no Laboratório de Citogenética Clínica do Centro de Genética Médica Dr. José Carlos Cabral de Almeida do Instituto Nacional da Saúde da Mulher da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira - Fundação Osvaldo Cruz.

O estudo citogenético foi realizado a partir da obtenção de cromossomos metafásicos (técnica padrão descrita por Moorehead e colaboradores (64)) e adaptada na

rotina de nosso laboratório), corados pela técnica de bandeamento GTG (65). A análise foi realizada avaliando-se um número mínimo de 20 metáfases com um nível de resolução de 450 bandas e 850 bandas por conjunto haplóide e o cariótipo organizado segundo o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (37), após captura por um sistema de captura de imagens (*Lucia Inc, Cytocell*).

A análise citogenética molecular envolveu a utilização das técnicas de FISH com diferentes sondas moleculares de acordo com os cromossomos envolvidos para melhor delimitação dos pontos de quebras e a técnica de CGH-*array* para investigação de eventuais perdas e/ou ganhos de regiões genômicas.

Os casos normais pela técnica de CGH-*array* foram submetidos à análise molecular pela técnica de sequenciamento de nova geração, utilizando *primers* de sequencias flanqueadoras dos pontos de quebra detectadas nas translocações e definidas a partir do bando de dados *Genome Browser*.

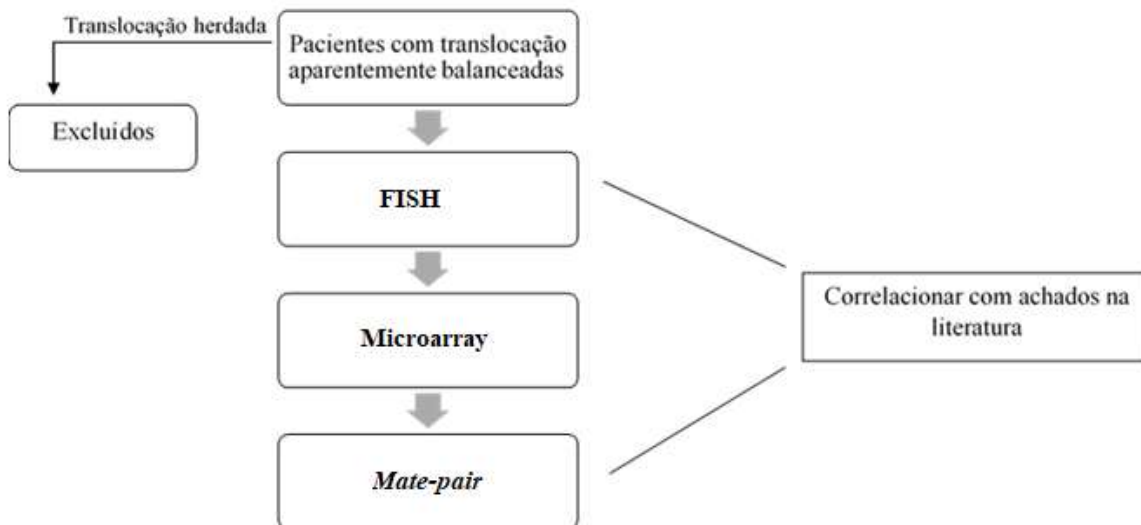


Figura 5 Esquema demonstrando o fluxo da inclusão dos pacientes até as análises metodológicas.

5.1 Obtenção de cromossomos metafásicos a partir de sangue periférico:

O implante das culturas de linfócitos foi realizado em tubos de centrifuga estéreis e descartáveis. Cerca de 6mL de meio RPMI-1640 (CULTILAB) contendo antibióticos; 1,2mL de soro fetal bovino (CULTILAB); 0,2mL de fitohemaglutinina M (CULTILAB) e 0,5mL de sangue total. A cultura será mantida a 37°C durante 72 horas. Uma hora antes do término será adicionado 0,05mL de colchicina (0,8g/mL), permanecendo em estufa a 37°C. Após as 72 horas do implante da cultura de linfócitos, os tubos foram centrifugados a 1.800 rpm por 10 minutos e, em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionados 6mL de Cloreto de Potássio (KCl) (0,075 M) a cada tubo, sendo homogeneizados e as amostras serão mantidas a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, essas amostras foram centrifugadas novamente a 1.800rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado homogeneizado. Acrescentar-se 6mL de fixador (3 metanol: 1 ácido acético) à temperatura ambiente e centrifugar-se as amostras a 1.800rpm por 10 minutos. Foram realizadas mais duas ou três lavagens com fixador até que o sobrenadante fique totalmente límpido.

5.2 Obtenção de cromossomos prometafásicos a partir de sangue periférico:

Foi realizada uma cultura de linfócitos de sangue periférico, semelhante à anteriormente descrita. Entretanto, 02 horas antes do término da cultura foram adicionados 0,3mL de Brometo de Etídio (16mg/100mL) e quinze minutos antes do término da cultura adicionados 0,05mL de colchicina (0,8µg/mL), mantendo sempre a cultura a 37°C em estufa.

O término das culturas seguiu o protocolo padrão da obtenção de cromossomos metafásicos.

5.3 Preparação das lâminas:

As lâminas previamente lavadas com água e em sabão e mantidas em água gelada. Serão gotejadas cerca de 02 a 03 gotas do material fixado sobre as lâminas que foram secas naturalmente em temperatura ambiente.

5.4 Técnicas de coloração e marcação cromossômica

5.4.1 Técnica de Bandeamento GTG:

Técnica segundo Seabright e colaboradores, 1971 (65).

Para obter-se um padrão de bandeamento GTG as lâminas, contendo material fixado de cromossomos e preparadas com antecedência de dois dias, foram imersas em uma solução de tripsina (100mg/100mL tampão dulbeco) [136,87mM Cloreto de Sódio (NaCl) (REAGEN); 2,68mM KCl (REAGEN); 50,02mM Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4) (REAGEN); 5,37mM Fosfato Dissódico (Na_2HPO_4) (REAGEN)] a temperatura ambiente por 10 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas rapidamente em tampão fosfato (136,87mM KH_2PO_4 ; 15,09mM Hidróxido de Sódio (NaOH), pH:6,8) a temperatura ambiente para interromper a ação da tripsina e, por fim, coradas com solução de azul de metileno segundo Giemsa a 5% durante 5 minutos, sendo lavadas em água, secas ao ar e observadas sob microscopia ótica.

5.4.2 Técnica de bandeamento QFQ

Técnica descrita por Murer-Orlando e cols, 1988 (66).

As lâminas recém preparadas contendo material fixado de cromossomos metafásicos foram tratadas durante 10 minutos a temperatura ambiente com uma solução de KCl 2%. Após este tempo, foram tratadas com solução de quinacrina mustarda durante 20 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em KCl, montadas com lamínulas e seladas com gel apropriado. Os cromossomos foram analisados num fotomicroscópio Zeiss para fluorescência.

5.4.3 Técnica de marcação CBG

Técnica descrita por Salamanca e Armendares, 1974 (67).

As lâminas foram primeiramente tratadas com Ácido Clorídrico (HCl) a 0,2N (5,0 ml de HCl para 295,0ml de água deionizada) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Depois de lavadas, serão mergulhadas numa solução de bário preparada com 92 ml de água deionizada e 8 ml de solução estoque de bário (39,5 grs. de hidróxido de bário diluidas em 300 ml de água deionizada - ferver até reduzir o volume para 250 ml, filtrar e usar) e mantidas durante 10 minutos a 40° C (banho-maria), sendo posteriormente lavadas em água corrente e incubadas em solução salina citrato (SSC 1X - 11,55grs. de NaCl; 8,82grs. de Citrato de Sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$); 1000 ml de água deionizada) durante duas horas a 65° C (banho-maria). Ao final das duas horas, as lâminas serão lavadas em água deionizada, coradas durante 25 minutos em solução de Giemsa a 2%, lavadas em água deionizada e observadas sob microscopia ótica.

5.5 Citogenética Molecular

5.5.1 Técnica de Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH):

As sondas serão utilizadas seguindo as instruções do fabricante (*Cytocell, Inc*).

As lâminas foram preparadas em lençol d'água e envelhecidas durante 24 horas. Em seguida, tratadas numa solução 2x SSC (solução salina de citrato, pH 7,0) durante 30 minutos a 37° C. Logo após, foi realizada uma desidratação gradual tratando-se as lâminas com álcool 70%, 85% e 100% durante 2 minutos cada, a temperatura ambiente. Foram dimensionados 10 µl de sonda previamente desnaturada por área de 25mm x 25mm e aplicadas na lamínula de vidro. Assim as lâminas serão seladas e incubadas por 16 horas em câmara úmida a 37°C. Após esse período, realizou-se o processo de lavagem que consiste em submeter estas lâminas a uma solução de 0,4xSSC/0,3% *Tween* 20 a 72°C (pH 7,0) por 1 minuto e em seguida, em solução de 2xSSC/0,1% *Tween* 20 (pH 7,0) por 2 minutos em temperatura ambiente. Os cromossomos e os núcleos interfásicos foram corados por 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e analisados em microscópio de fluorescência com filtro apropriado. O resultado obtido foi adquirido pelo sistema de FISH do *Lucia Cytogenetics* version 2x.

5.6 Análise por Biologia Molecular

5.6.1 Extração de DNA

Técnica segundo Miller e cols., 1988 (68).

Dez mililitros de sangue foram diluídos em 35ml de tampão de lise de hemácias. Após 30 minutos à temperatura ambiente os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 1000 rpm durante 4 min. Descarta-se o sobrenadante e ao precipitado é adicionado 10 ml de tampão de lise de hemácias. O material foi centrifugado novamente a 1000 rpm por 4 min e o processo repetido até se obter um precipitado branco. Em seguida o material foi ressuspensão em 3,0 ml de tampão de lise de núcleo, homogeneizando o tubo. Foram adicionados 100ul de SDS 10% agitando o tubo e misturando 200ul de pronase (1mg/l). O material foi incubado a 37°C durante a noite.

No dia seguinte foi adicionado 1 ml de NaCl saturado 6M, sendo o material misturado vigorosamente por 15 segundos e centrifugado por 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo ao qual foi adicionado 10 ml de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado então foi transferido para outro tubo ao qual foram adicionados 500ul de etanol 70%. Após nova centrifugação a 1400 rpm durante 1 minuto, o material foi seco a temperatura ambiente e ressuspensão em TE e armazenado na geladeira.

5.6.2 Quantificação do DNA

A concentração de DNA das amostras foi calculada após a realização de uma eletroforese em mini-gel de agarose (Gibco) 0,8% em TBE 1X (89mM Tris Base (Pharmacia), 89mM ácido bórico (Gibco) e 2mM Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) (pharmacia) submerso, utilizando também o TBE como tampão de corrida.

A corrida foi realizada por 02 horas a 60V e o gel corado com brometo de etídio (0,5mg/mL). A quantidade de DNA foi inferida comparando-se a intensidade da banda obtida em cada amostra com o padrão DNA (100ng/mL, 200ng/mL e 300 ng/mL), utilizando luz ultravioleta.

5.6.3 Quantificação com Nanodrop

Utilizar o software NanoDrop, selecionando o aplicativo de Ácido Nucleico. Foram despejados 1uL de tampão para primeira aferição. Logo após foi dispensado 1uL do ácido nucleico. O software calculou automaticamente as taxas de ácido nucléico, concentração e pureza.

5.6.4 Técnica Microarray a-CGH (Hibridização Genômica Comparativa por Microarray)

A plataforma utilizada para o método de *array*-CGH é a *CytoScan*® 750k *Array* (Affymetrix®), que contém 750.000 oligonucleotídeos distribuídos pelo genoma humano (200.000 SNPs - polimorfismos de base única). Os dados escaneados dos chips serão analisados com o programa CHAS.

Na técnica de aCGH na utiliza-se de 5 µL de DNA genômico (concentração de 50 ng/µL e relação 260/280 nm entre 1.8 e 2.0) de cada amostra, é quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000c - *Thermo Fisher Scientific*®. É aconselhado fazer o processo em duplicata para aumento da exatidão dos resultados.

A reação de digestão é a primeira etapa do *array*-CGH e, portanto, foi utilizado 14,75 µL de master-mix (contendo 11,55 µL de água *nuclease-free*, 2,00 µL de tampão da enzima Nsp1, 0,20 µL de BSA [100X] e 1,0 µL da enzima Nsp1) em cada amostra, incluindo os controles positivo (DNA fornecido por *Thermo Fisher Scientific*®) e negativo (somente contendo TE). Após homogeneizar as amostras em Vortex, seguido por

um spin em centrífuga (2000 rpm por 1 minuto) e colocadas no termociclador (37°C por 2 horas; 65°C por 20 minutos; manter a 4°C até que seja realizada a etapa de ligação).

Em seguida foi feita a reação de ligação onde utiliza-se 5,25 µL de *master-mix* (contendo 2,5µL de tampão T4 DNA Ligase [10X], 0,75µL de adaptador NspI e 2,0µL de enzima DNA ligase) em cada amostra, incluindo os controles positivo e negativo, vortexar para homogeneização, feito um *spin* em centrífuga para baixar as gotas do tubo (2000 rpm a 1') e colocada no termociclador (16°C por 3 horas; 70°C por 20 minutos; manter a 4°C até que seja realizada a etapa de PCR).

A próxima etapa foi a reação em cadeia da polimerase (PCR), onde foi preparado 90 µL de *master-mix* (39,5µL de água Affymetrix pré-PCR, 10 µL de tampão Titanium PCR [10x], 20,0 µL de reagente GC-Melt, 14,0 µL de mix de dNTP e 4,5 µL de PCR *primer*, 2,0 µL enzima Titanium Taq DNA polimerase [50x]) adicionou-se 90 µL do *master-mix* em cada amostra e nos controles positivo e negativo. Foram homogeneizadas, seguindo o procedimento anterior, levando ao termociclador (94°C por 3 minutos; 94°C por 30 segundos; 60°C por 45 segundos; 68°C por 15 segundos; 68°C por 7 minutos; manter os produtos da PCR a 4°C). Para verificar a eficiência da PCR, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose a 2% de concentração com voltagem de 120 Volts por ~40 min. utilizando um marcador de massa molecular de 100pb. A maioria dos produtos deve estar entre 150 e 2000 pb para que se possa prosseguir para o próximo passo.

A reação de purificação do produto da PCR foi o próximo passo, adicionou-se 720 µL de solução *Purification beads* em cada amostra, homogeneizando-as por inversão 10x e aguardando por 10 minutos à temperatura ambiente. A centrifugação foi feita em 16.100

rpm por 3 minutos. Ao término, colocou-se as amostras em estante magnética para que as “beads” possam se aderir na parede dos tubos. Com uma pipeta de 1000 μL , o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 1 mL do tampão *Purification wash* em cada tubo, na parede contrária à das “beads”, homogenizou em vortex na velocidade máxima por 2 minutos e foram centrifugadas a 16.100 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Após isso, levou novamente os tubos para a estante magnética para que as “beads” possam aderir à parede dos tubos, como anteriormente, descartando o líquido. Feito isso, os tubos foram deixados abertos fora da estante magnética por um tempo não superior a 10 minutos, a fim de evaporar o tampão e, em seguida, adicionou-se 52 μL de tampão de eluição dispensando-o sobre as “beads”, vortexar em máxima velocidade por 10 min. Verificou-se se as “beads” desprenderam-se da parede dos tubos, homogeneizou-se em vortex mais 2 min. e centrifugou-se a 16.100 rpm por 3 minutos. Sendo assim, os tubos foram inseridos novamente na estante magnética por 10 minutos (até as “beads” migrarem para a parede) e transferiu 47 μL do sobrenadante (sem tocar nas “beads”) para a placa nova (purificado). Selou-se a placa, vortexou e deu-se um spin em velocidade alta para baixar a solução. Com isso, foi identificado um *strip* e adicionado 18 μL de água pós-PCR em cada poço da placa e adicionou-se 2 μL do purificado. Certificar quanto a vedação da placa e vortexar para fazer a homogeneização. Foi aferido a concentração das amostras (2 μL) através de Nanodrop, devendo estar entre 250 e 400 ng/ μL .

Para realizar a reação de fragmentação, preparou-se 625 μL de *master-mix* (contendo 271,2 μL de água do pós-PCR, 343,8 μL de tampão de fragmentação [10x] e 10 μL de enzima de fragmentação) e transferindo 10 μL do master-mix para em cada amostra na placa, já selada vortexar a 2000 rpm por 1 minuto e colocou-se no termociclador (por

aproximadamente 50 minutos). Ao término do ciclo a placa foi inserida no gelo. Para verificar a eficácia da fragmentação, foi preparado um gel de agarose *low melting* a 4% em TBE 0,5x (30 mL), utilizando 4 μ L de água do pós-PCR, 2 μ L de tampão de amostra de corrida rápida e 4 μ L da amostra fragmentada. Assim, 5 μ L do mix e 3 μ L de marcador de 25 pb foram aplicados no gel e correu a eletroforese à 150 volts por aproximadamente 40 minutos.

A etapa de marcação foi feita utilizando, em cada amostra incluindo os controles, 19,5 μ L de master-mix, (14,0 μ L de tampão 5xTdT, 2,0 μ L do marcador 30mMDNA e 3,5 μ L da enzima TdT). A placa precisa foi vortexada e colocada no termociclador (37°C por 4 horas; 95°C por 15 minutos; manter os produtos marcados a 4°C).

No processo de hibridização foram utilizados 190 μ L de master-mix (165,0 μ L de tampão de hibridização parte 1, 15,0 μ L de tampão de hibridização parte 2, 7,0 μ L de tampão de hibridização parte 3, 1,0 μ L de tampão de hibridização parte 4 e 2,0 μ L de *Oligo control reagent*) em cada amostra e controles. Levou-se a placa, após selada e vortexada ao termociclador (95°C por 10 minutos; manter a temperatura do termociclador a 49°C). Ao fim do programa, verificou-se a presença de precipitado nos poços. No caso positivo, vortexou-se a solução até a sua total homogeneização. Feito isso, as amostras foram recolocadas no termociclador por 2 minutos à 49° C. Após o selo da placa ter sido removido, injetou-se 200 μ L da reação de cada paciente no furo inferior dos chips em temperatura ambiente, evitando a criação bolhas de ar. Os furos dos chips foram adesivados, sem que a área do visor fosse coberta, foram colocados no suporte para hibridização e foi levado ao forno por aproximadamente 16 horas.

Para a lavagem dos chips foram utilizados três grupos de tubos com cores diferentes, um contendo 500 µL de *stain buffer 1*, no outro 500 µL de *stain buffer 2* e no último 800 µL de *Holding buffer*. Aos *ependorfs* cobertos com papel alumínio e colocados na geladeira. Ao sinal de término da lavagem emitida pela estação, os chips foram removidos conferindo a presença de bolhas e colocados para leitura.

7.6.5 Sequenciamento “*mate-pair*”

Para identificar o local exato dos pontos de interrupção cromossômica, foi utilizada a técnica de sequenciamento por “*mate-pair*” (MPS) (Illumina San Diego, CA, EUA) em DNA de sangue periférico dos pacientes.

A biblioteca de DNA foi criada a partir de 1µg de DNA usando o kit Nextera (para sequenciamento “*mate-pair*”) da Illumina seguindo as instruções para preparar uma biblioteca de 2 kb de tamanho de inserção (“*mate pair*”, Biblioteca v2, Illumina). As bibliotecas finais foram quantificadas utilizando *Pico Green (Quant-iT, Invitrogen)* e *Agilent Bioanalyzer DNA 1000 kit (Quant-iT, Invitrogen)*. As amostras foram indexadas e agrupadas em grupos de quatro. Cada poço foi sequenciado sobre uma única pista do HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, EUA) (2 × 100 pb). Alternativamente, oito amostras indexados foram reunidas e sequenciadas em uma plataforma Illumina 500 NextSeq (2x75 ou 2x150 pb). As leituras de sequência bruta foram aparadas e as sequências de adaptação foram removidas usando “*cutadapt*”. Os pares restantes passaram por filtragem Illumina *Chastity* (> 0,6) e foram alinhados com a sequência do genoma humano de referência hg19

usando o alinhador *Burrows-Wheeler* (BWA). Para identificar as variações estruturais (SVS) exclusivamente presentes em uma amostra, os SVS foram comparados tanto com um conjunto de dados de sequenciamento de *mate-pair* como com uma base de dados de variantes genómicas. Ao importar os arquivos BED criados por *SVdetect* no *Integrative Genome Viewer* (IGV) as variações estruturais são visualizadas e a localização aproximada dos “*breakpoints*” é determinado. Além disso, uma Circos plots foi criado para ilustrar a localização dos pontos de ruptura genómicas (<http://genome.cshlp.org/content/19/9/1639.full>). Os locais exatos dos pontos de quebra foram confirmados por *split reads*, ou por PCR e sequenciamento Sanger.

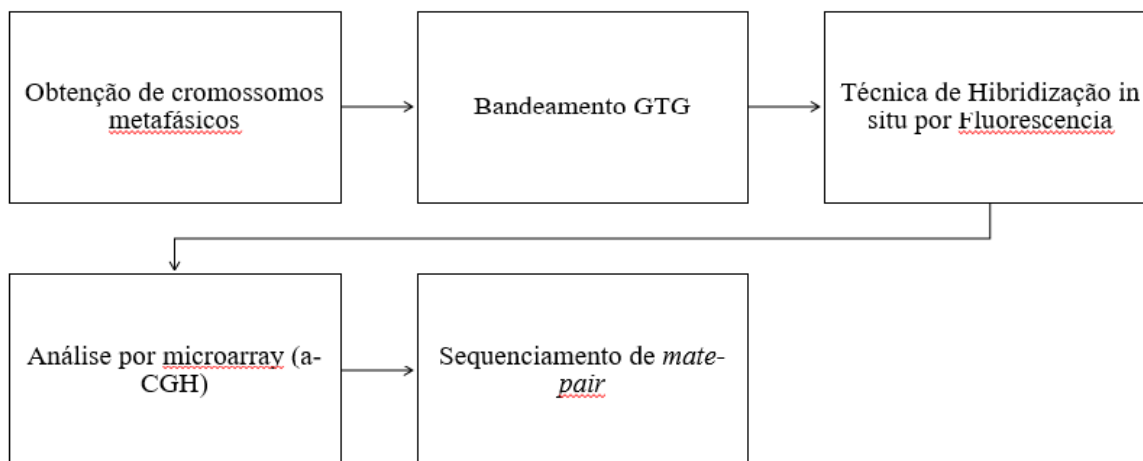


Figura 6 Esquema demonstrando o fluxo da metodologia

6. Questões Éticas

Este trabalho está cadastrado e foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Fernandes Figueira, FIOCRUZ com os registros: CAAE: 35766720.7.0000.5269 e número do parecer de aprovação do CEP: 4.307.66

7. Resultados e Discussões

Casos
Caso I - 46, XY, t(1;8)(p31;q13)
Caso II - 46, XX, t(1;18)(q43;q11.1)
Caso III- 46, XX t(X;18)(p21.2;q22.3)
Caso IV - 46, XY t(18;21)(q23;q22.1)
Caso V - 45, XX, -22 t(12;22)(p13;q11)

Tabela 1: casos incluídos no estudo

7.1 Caso I – 46, XY, t(1;8)(p31;q13)

Paciente do sexo masculino com 4 anos e 8 meses encaminhado para avaliação genética devido à atraso de linguagem e histórico familiar de autismo (Asperger) e déficit de linguagem. Pais não consanguíneos. Irmão mais velho e primo materno com Asperger. Primo materno com déficit de linguagem com processamento auditivo normal. Desenvolvimento motor adequado e normal. Déficit de linguagem falando sílabas aos 3 anos e não forma frases. Déficit de comunicação verbal e não-verbal. Não compreende ordens verbais e não possui autonomia. Dados antropométricos normais e dentro do canal de crescimento da família.

A análise cromossômica por bandeamento GTG demonstrou uma translocação aparentemente balanceada envolvendo o braço curto do cromossomo 1 e o braço longo do cromossomo 8 com pontos de quebra em 1p31 e 8q13 (Figura 5).

O estudo cromossômico dos pais foi normal, caracterizando o cariótipo como: 46, XY, t(1;8)(p31;q13) “de novo”.

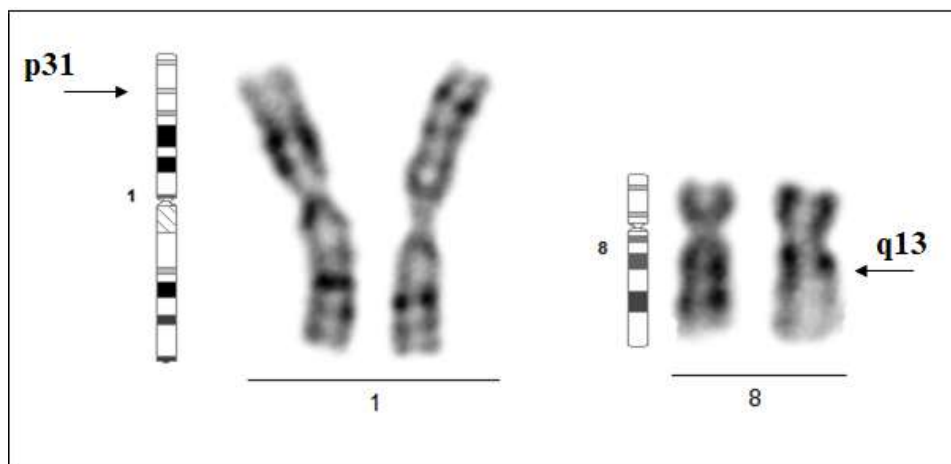


Figura 7 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 1 e 8 e seus pontos de quebra.

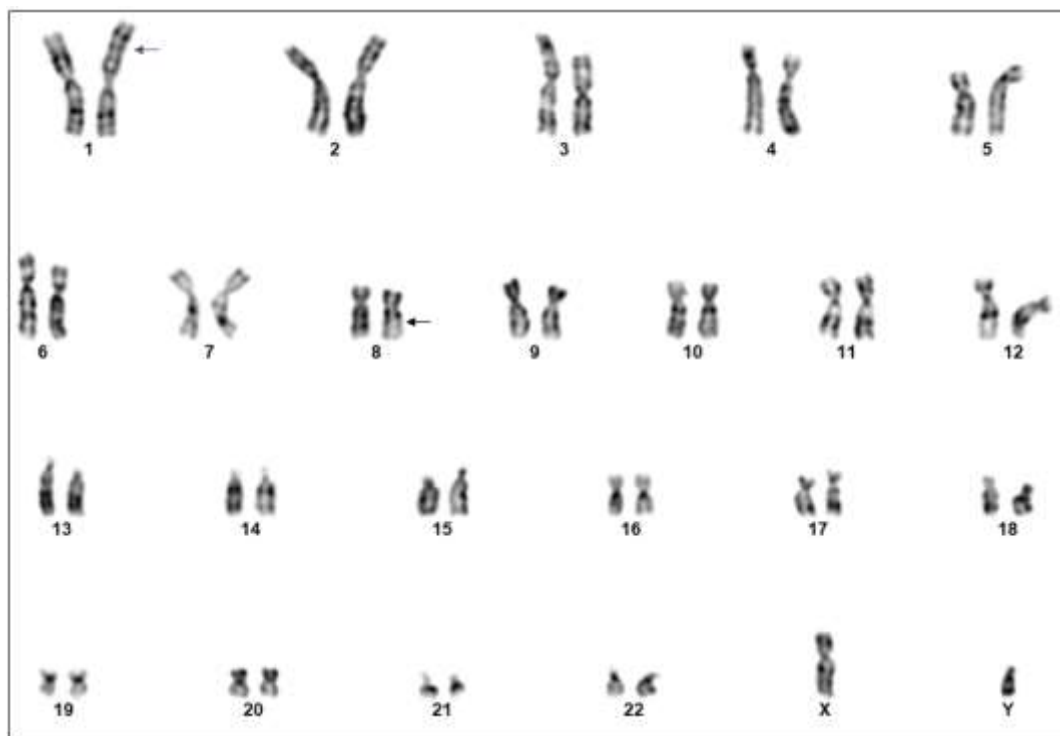


Figura 8 - Cariótipo em banda G = 46, XY, t(1;8)(p31;q13) “de novo”

Objetivando melhor caracterizar a translocação, foi realizada a técnica FISH utilizando a sonda “*MYC break-apart*” que reconhece a região 8q24.21 (marcação verde-

vermelho) e uma sonda para região do cromossomo 1 qter (marcado em verde). Essa análise demonstrou a presença da marcação verde-vermelha (MYC) no braço curto do derivado do cromossomo 1, além da marcação no cromossomo 8 normal (Figura 7).

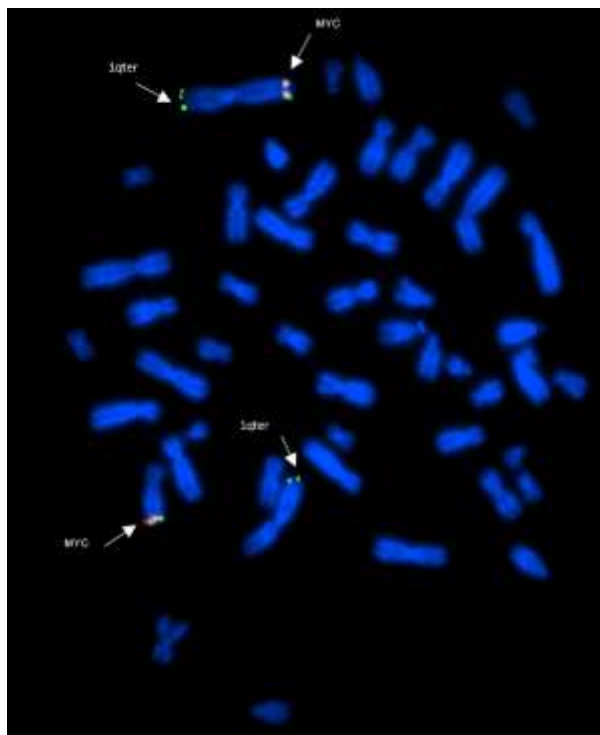


Figura 9 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando as sondas MYC (marcação vermelha e verde) e 1qter (marcação verde), demonstrando a presença da região 8q24.21 (MYC) no cromossomo 1 uma vez que o cromossomo apresentou as duas marcações.

Também foi realizado um outro experimento utilizando uma sonda que reconhece o cromossomo 8 inteiro (WCP8, marcado em verde) juntamente com uma sonda que reconhece a região sub-telomérica do braço curto do cromossomo 1 (vermelho). Foi possível observar que grande parte do cromossomo 8 estava presente no cromossomo derivado de 1, enquanto havia marcação telomérica de 1p no cromossomo derivado de 8 (Figura 8), confirmando assim a reciprocidade da translocação, nos permitindo considerar menores regiões de busca para possíveis candidatos a mapeamento fenotípico, tanto no cromossomo 1 quanto no cromossomo 8.

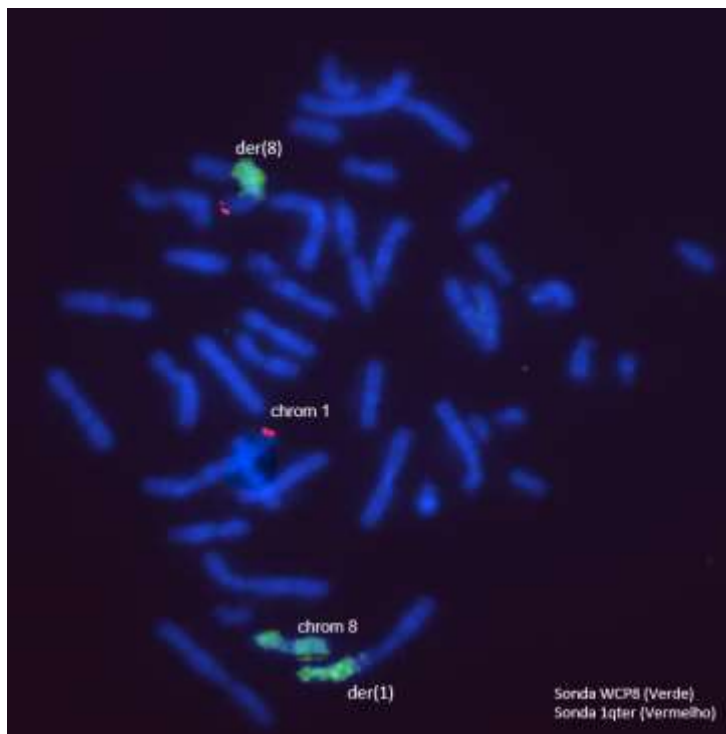


Figura 10 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando as sondas WCP8 – painting de 8 (verde) e 1qter (marcação vermelha). Podemos observar 3 marcações verdes, uma no cromossomo 8 íntegro, outra no derivado de 8 e outra marcação no derivado de 1 e duas marcações vermelhas, uma na região telomérica do cromossomo 1 íntegro e outra no derivado de 8, o que demonstra a translocação entre os cromossomos 1 e 8.

Após a análise por FISH, os pontos de quebra foram delimitados em 1p36.3 e 8q21, confirmando uma translocação balanceada a nível citogenético molecular.

Partindo para uma análise mais refinada dos pontos de quebra, foi realizada a técnica de *microarray CGH*. Esta técnica identificou uma alteração a nível molecular no cromossomo 15: perda de 21kb em 15q12 (Arr 27,151,153-27,173,084) envolvendo parcialmente a região codificante do gene *GABRA5*. Até a última revisão não identificamos uma relação de patogenicidade com este gene, havendo relatos na literatura, nas quais variações idênticas a esta tem origem parental e não apresentam consequências clínicas. Não foram identificadas alterações tanto no cromossomo 1 quanto no cromossomo 8, o que corrobora com o conhecimento de que translocações balanceadas não são detectadas por essa metodologia.

Com a colaboração do Laboratório de Citogenética do Departamento de Medicina Celular e Molecular da Universidade de Copenhagen foi realizada a análise por sequenciamento de *mate-pair* das regiões dos pontos de quebra da translocação.

Em relação à região delimitada no braço curto do cromossomo 1 (chr1:56499153-56499456) foi identificada uma quebra no início do gene *PPAP2B*, também conhecido com *PLPP3* - phospholipid phosphatase 3 (Figuras 9 e 10). Segundo o banco de dados (*Genecard*, 2022), a proteína codificada por este gene é um membro da família fosfatase do ácido fosfatídico (PAP). Os PAPs convertem o ácido fosfatídico em diacilglicerol e funcionam na síntese de novo de glicerolípídios, bem como na transdução de sinal ativado por receptor mediado pela fosfolipase D. Como um transdutor de sinal, pode ser apontado como um potencial candidato ao mapeamento fenotípico de autismo observado em nosso paciente.

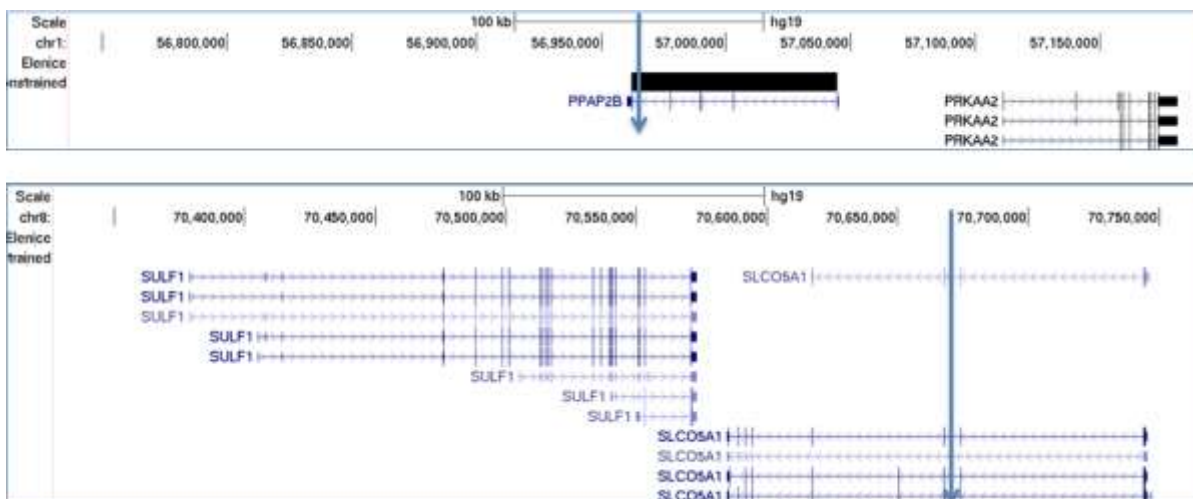


Figura 11 - Esquema demonstrando a região dos pontos de quebra resultantes da análise de *mate-pair* dos cromossomos 1 (bloco superior) onde abrange a região do gene *PPAP2B* e do cromossomo 8 (bloco inferior) onde a quebra aconteceu na região do gene *SLC05A1*.

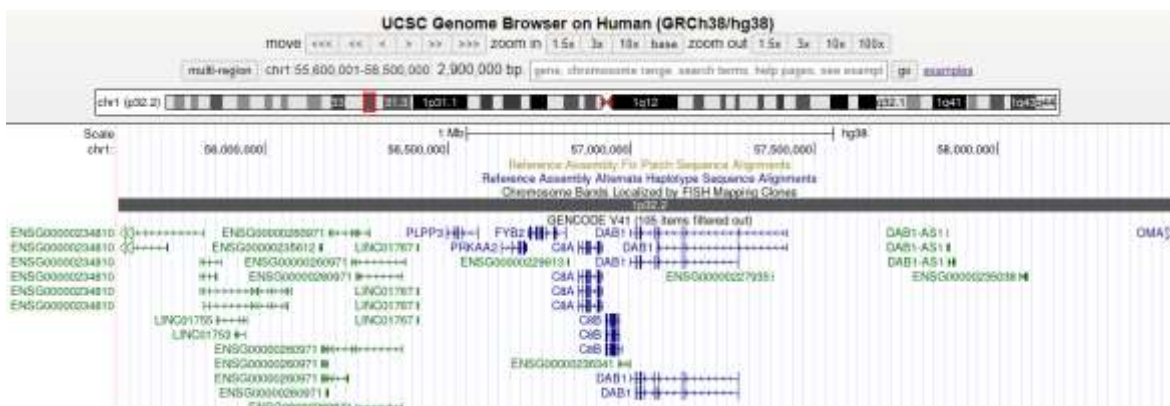


Figura 12 Imagem demonstrativa do *Genome Browser* da região 1p32.2 englobando os genes *PLPP3*. Em verde são exibidos genes e alelos registrados no OMIM e em azul os genes *RefSeq* do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

Quanto à região do cromossomo 8 (chr8:69757682-69757875), o sequenciamento identificou uma quebra dentro do gene *SLCO5A1*, sugerindo perda de função. Este gene codifica uma proteína de 12 domínios transmembrana (membro da superfamília de transportadores de ânions orgânicos portadores de solutos) (Genecard, 2022).

A partir da correlação clínica, esse gene pode ser excluído como candidato do fenótipo apresentado por nosso caso, entretanto, essa informação é considerada extremamente importante para a pesquisa de novos genes associados a doenças, uma vez que encontramos na literatura diversos relatos que sugerem fortemente o envolvimento desse gene com uma condição conhecida como Síndrome de Mesomelia Sinostose (MMS) [OMIM 600383].

A MSS é uma doença rara autossômica dominante caracterizada pelo encurtamento mesomélico de membros associados a múltiplas malformações congênitas e sinostose acral típica (69,70). Até o presente momento, não existe um consenso quanto ao gene ou genes que possam ser responsáveis por essa síndrome. A maioria dos indivíduos afetados possuem uma deleção na região 8q13 abrangendo dois genes próximos, *SLCO5A1* e *SULF1*, que são apontados como os prováveis genes candidatos da MMS (71–73).

Até 2017 cinco pacientes com MMS haviam sido descritos na literatura com microdeleções na região 8q13, com variações de 582 kb to 738 kb porém sempre

envolvendo perda de função em ambos os genes *SULF1* e *SLCO5A1* (69,70,74,75). Dardis e cols reportou um caso de um único paciente com MMS que não possuía alteração estrutural na região 8q13, porém foi detectado uma expressão monoalélica de *SULF1*, levando a uma haploinsuficiência deste gene, com a expressão de *SLCO5A1* preservada (72).

Considerando que nosso paciente não apresenta nenhuma característica fenotípica da MMS, nossos achados demonstram que a perda de função do gene *SLCO5A1* sozinho não é suficiente para a patogenicidade desta síndrome, corroborando com os resultados de Isidor e cols, 2010 que propõe a necessidade da haploinsuficiência combinada de ambos os genes *SLCO5A1* e *SULF1* como principal hipótese para a etiologia da MMS (Anexo II).

7.2 Caso II - 46, XX, t(1;18)(q43;q11.1)

Paciente do sexo feminino, ao exame físico com 14 anos. Pais não-consanguíneos, ele 39 anos e ela 23 anos de idade ao nascimento. Foi encaminhada para avaliação genética devido a características dismórficas como: face alongada, nariz proeminente, narinas antevértidas, lábio superior fino; macrostomia; orelhas grandes, clinodactilia do 5º dedo, convulsões e atraso no desenvolvimento. A genitália feminina externa revelou a ausência de orifício vaginal. O exame de ultrassonográfica pélvica dos revelou atresia renal direita; ausência de estruturas müllerianas, e nenhuma visualização do útero e ovário. Esses achados clínicos são consistentes com diagnóstico de síndrome *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser* tipo II (MRKH tipo II).

A análise cromossômica por bandeamento GTG demonstrou uma translocação aparentemente balanceada entre o braço longo do cromossomo 1 e o braço longo do cromossomo 18 com pontos de quebra em 1q43 e 18q11.2 (Figura 11), definindo cariótipo como: 46, XX, t(1;18)(q43;q11.2).

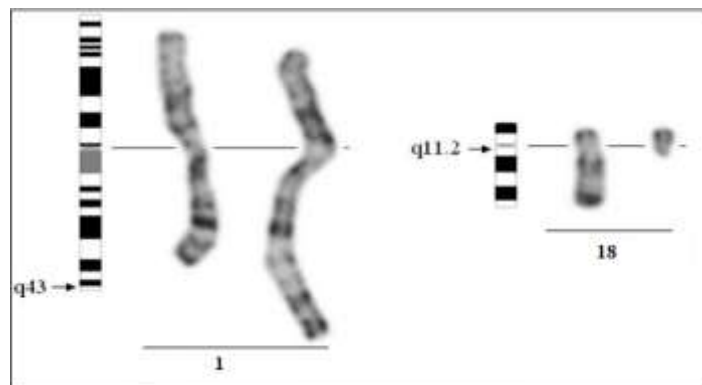


Figura 13 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 1 e 18 e seus pontos de quebra.

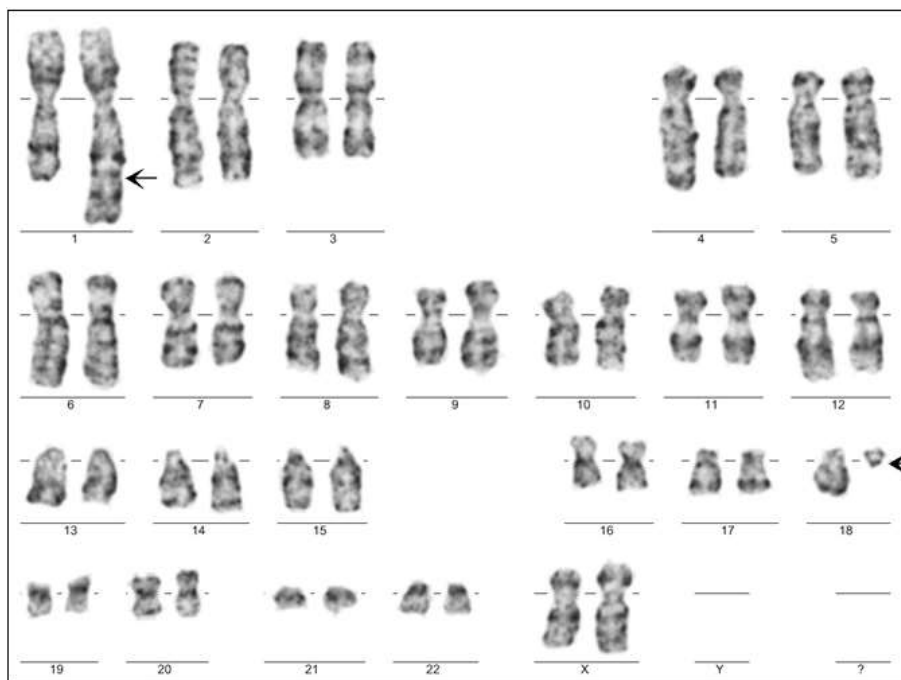


Figura 14 Cariótipo em banda G [46, XX, t(1;18)(q43;q11.2)]

A análise por FISH foi realizada utilizando as sondas LPP18R (*painting* 18) (Figura 13) LPU020 (regiões 1p36 e 1qter) (Figura 14), a fim de refinar a localização dos pontos de quebra. A técnica confirmou a natureza recíproca da translocação definindo os pontos de quebras como 1q43 e 18 q11.2.

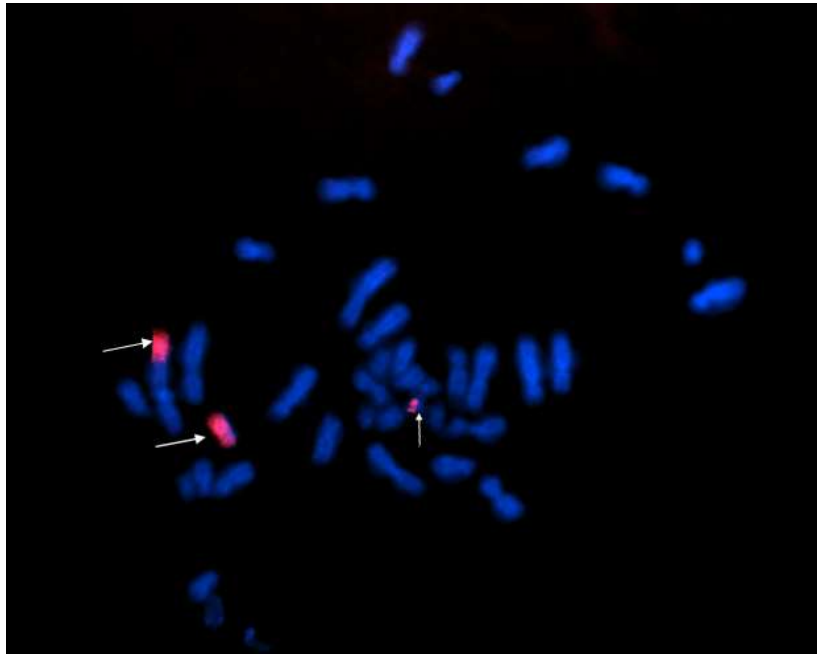


Figura 15 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando sonda LPP18R confirmou translocação recíproca entre os cromossomos 1;18. As setas indicam a presença de material do cromossomo 18, como podemos observar são encontrados em 3 regiões, em um dos cromossomos 18 íntegro, uma pequena marcação no derivado de 18 e no derivado de 1 a parte translocada do cromossomo 18.

O fato da paciente apresentar amenorréia primária e ausência de ductos müllerianos associado a relatos na literatura do possível envolvimento do gene *WNT4*, localizado na região 1p36, com esse fenótipo (76), realizamos a análise dessa região por FISH, mesmo não estando associada aos pontos de quebra envolvidos na translocação. A análise demonstrou integridade da região 1p36 (Figura 14) excluindo a anomalia cromossômica a nível citogenético molecular.

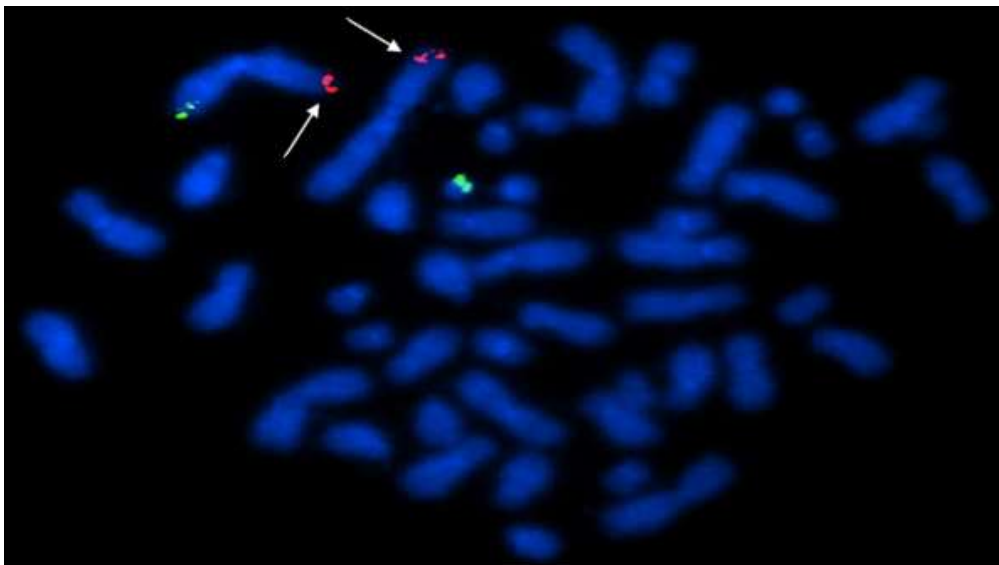


Figura 16 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando a sonda LPU020 mostrou a integridade da região 1p36, sinal vermelho e indicado pelas setas e confirmou a natureza recíproca da translocação, sinal verde da marcação 1qter no cromossomo derivado de 18

A MRKH tipo II é caracterizada por anomalias congênitas do órgão reprodutor feminino com uma incidência de 1 a cada 4.000/5.000 mulheres. A agenesia das estruturas müllerianas, atresia vaginal, anomalias uterinas e tubárias associadas à amenorreia primária e ao cariótipo normal é considerada o principal critério diagnóstico desta síndrome (77). A etiologia de MRKH ainda não é conhecida, porém na literatura mutações dentro do gene *WNT4*, que está localizado na região 1p36.3 parecem estar associadas à amenorreia e ausência de estruturas müllerianas (78). A análise por FISH corroborou com estudos que excluem o gene *WNT4* como candidato à síndrome MRKH (79).

A região do ponto de quebra do cromossomo 1 (q43) engloba alguns genes importantes, como *ZBTB18* [OMIM 608433] que está associado com problemas no desenvolvimento intelectual, contudo é uma doença autossômica dominante e não está associada com o quadro clínico da paciente. Ademais a região 1q43 não contém nenhum gene conhecido associado a anomalias de desenvolvimento renal e/ou genital.

Em contraste, a região 18q11.2 abrange uma série de genes incluindo o gene *GATA6* (Figura 15) [OMIM 601656] e outros genes, associados a doenças cardíacas congênitas e

anomalias renais. Além disso, a região também engloba o gene *CABLES 1* (Figura 15) [OMIM 609194], um regulador da proliferação e diferenciação celular que já foi descrito em câncer de endométrio e colo do útero.

Jacquinet e cols em 2020 publicaram um primeiro estudo demonstrando a presença de mutações no gene *GREBIL* em pacientes com MRKH /aplasia uterovaginal sem causa conhecida, sugerindo um contribuinte genético significativo, principalmente quando anomalias renais estão presentes (MRKH tipo II) (80).

O gene *GREBIL* [OMIM 617782] é um gene codificador de proteína localizado na região 18q11.1-q11.2 (Figura 15) que está relacionado a patologias como surdez autossômica dominante e hipodisplasia/aplasia renais 3 (RHDA3). Estudos foram realizados e pode-se observar alta expressão do gene nos rins e fígado de tecidos fetais, sugerindo envolvimento no desenvolvimento renal em humanos, e em tecidos vaginais de mulheres adultas (81). Além disso, mutações heterozigotas em *GREBIL* foram encontradas em pacientes com agenesia renal e uterovaginal combinada (77).

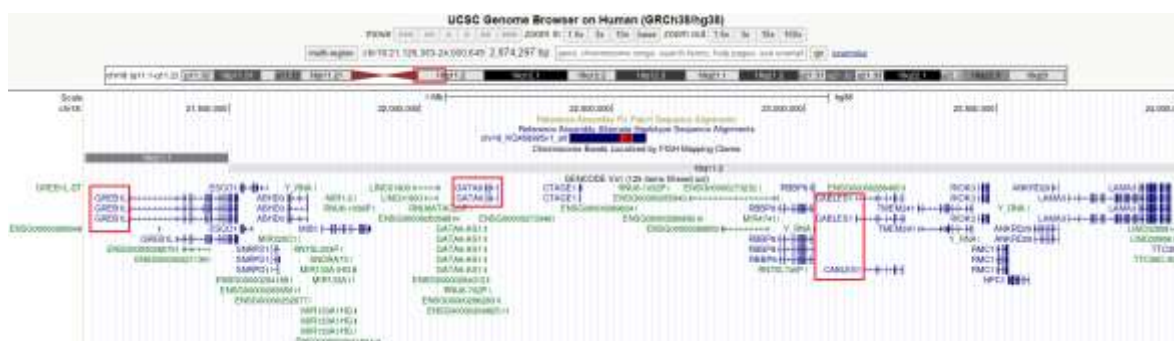


Figura 17 Imagem demonstrativa do *Genome Browser* da região 18q11.2. Destacados os genes *GREBIL*, *GATA6* e *CABLES1*. Em verde são exibidos genes e alelos registados no OMIM e em azul os genes *RefSeq* do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

Mais estudos e técnicas serão necessários para uma melhor caracterização das regiões dos pontos de quebra, porém com bases nas análises realizadas até o presente momento e achados na literatura o gene *GREBIL*, localizado na região 18q11, mostrou-se

como o principal candidato a mapeamento fenotípico associado à síndrome de *Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser* tipo II.

7.3 Caso III - 46, XX t(X;18)(p21.2;q22.3)

Paciente do sexo feminino, 2 anos de idade ao exame inicial, filha de pais não consanguíneos. Foi encaminhada para avaliação da genética por ser pequena para idade gestacional, evoluiu com baixa estatura pré e pós-natal, apresentou atraso do desenvolvimento global e muscular, fácies pequena, estreitamento bitemporal com a testa proeminente, pés e mãos pequenos e hipotonia moderada. Foram realizadas pesquisas para erros inatos do metabolismo, porém foram inconclusivas.

A análise cromossômica por bandeamento GTG demonstrou uma translocação entre o braço curto do cromossomo X e o braço longo do cromossomo 18 (Figura 16). Definindo o cariótipo como: 46,XX, t(X;18)(Xp21.2 e 18q22.3). Não foi observado material de 18q translocado no derivado de X a este nível de resolução. A análise cromossômica dos pais foi normal, caracterizando o caso como "de novo".

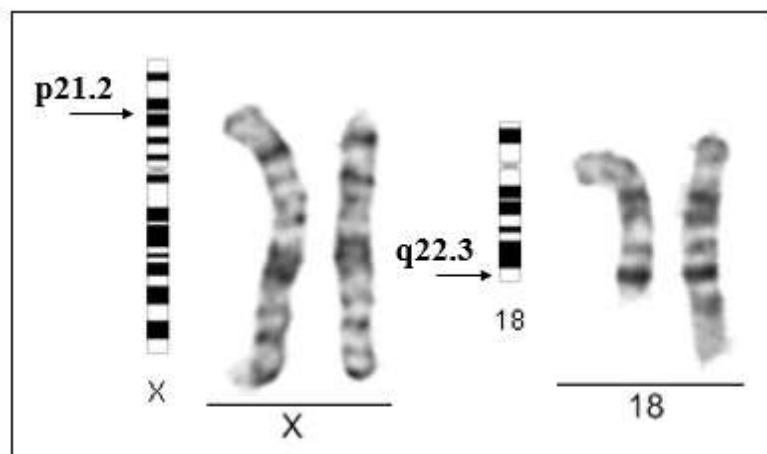


Figura 18 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos X e 18 e seus pontos de quebra (Xp21.2 e 18q22.3).

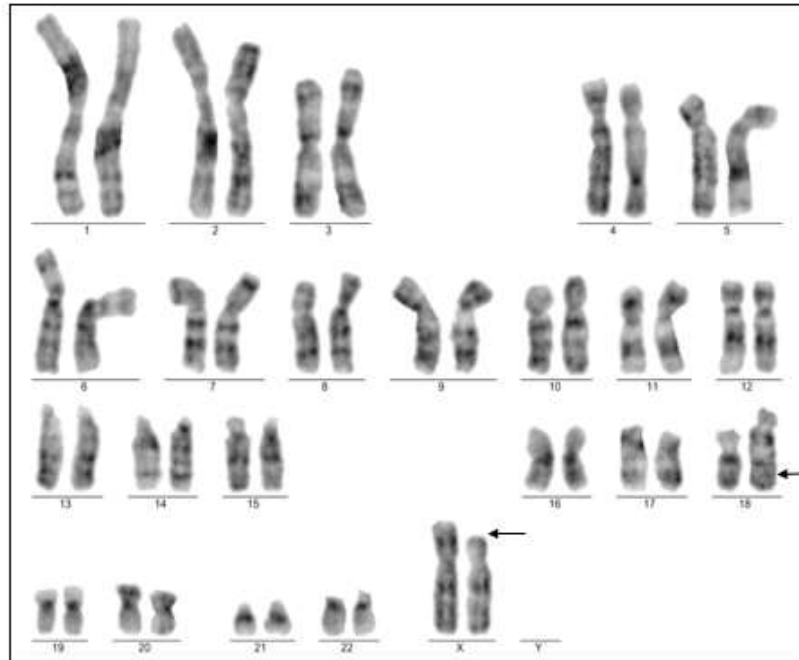


Figura 19 Cariótipo em banda G [46, XX, t (X;18)(p21.2;q22.3)]

Com o objetivo de melhor delinear os pontos de quebra envolvidos, utilizamos a técnica FISH com diferentes sondas. A análise por FISH utilizando as sondas LPP18R (*painting* 18) e centrômero do cromossomo X (Figura 18), confirmou a reciprocidade da translocação uma vez que percebe-se a ausência de hibridização na porção terminal do cromossomo derivado de 18 que sabidamente provém de um dos cromossomos X (marcados no centrômero em verde) cujo braço curto apresenta-se menor.

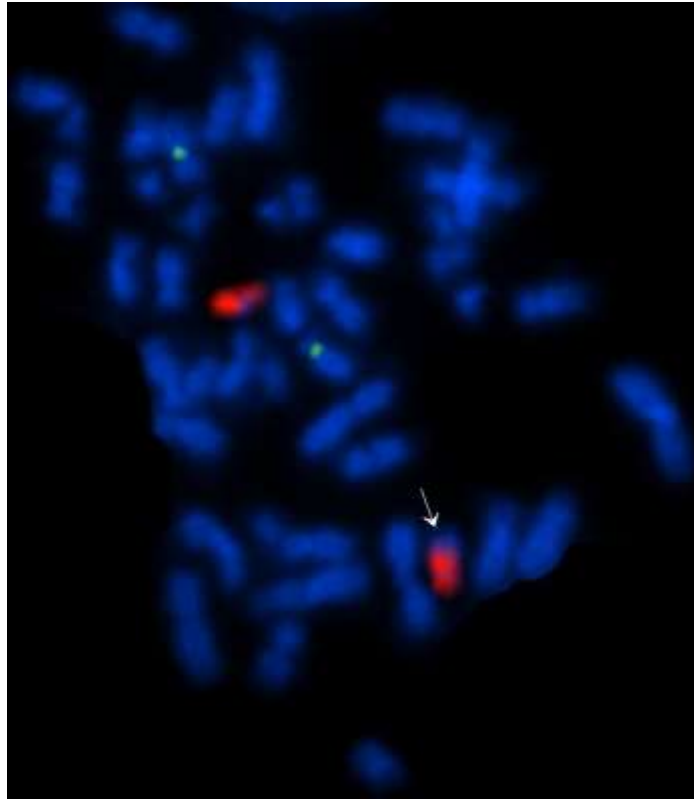


Figura 20 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando a sonda “painting” para o cromossomo 18 (vermelho) e a sonda centromérica do cromossomo X (verde). Podemos notar (seta) a ausência de hibridização na porção terminal do cromossomo derivado de 18 que sabidamente provém do derivado do cromossomo X, cujo braço curto apresenta-se menor.

Em outro experimento de FISH utilizando a sonda centromérica do cromossomo 18 e *painting* de X (Figura 19) complementou a avaliação anterior confirmando a reciprocidade da translocação.

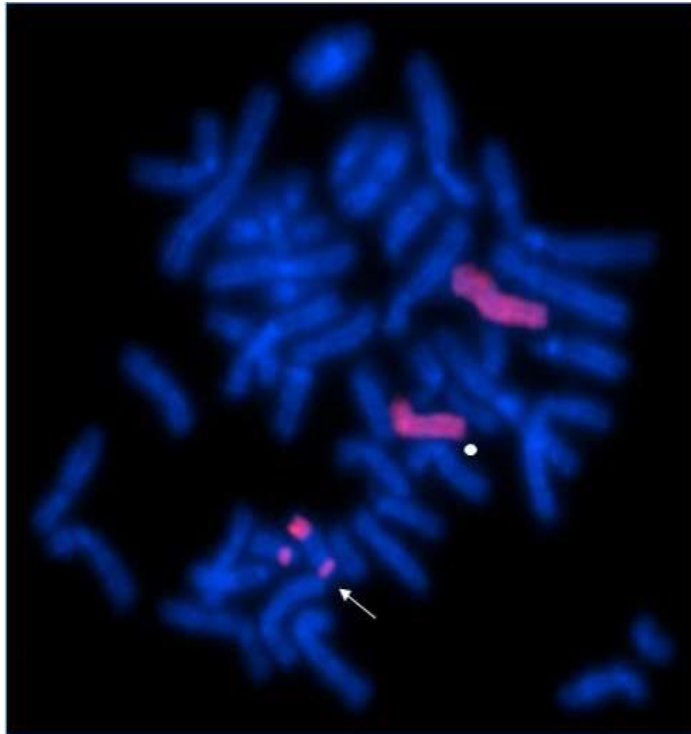


Figura 21 Resultado da análise de FISH em metáfase utilizando a sonda “painting” para o cromossomo X e a sonda centromérica do cromossomo 18. Podemos observar a presença de segmento do cromossomo X no derivado do cromossomo 18, uma marcação em seu braço longo na região terminal (seta). O círculo branco indica o cromossomo derivado de X, sua marcação em vermelho é menor que do cromossomo X íntegro.

Uma terceira análise por FISH foi realizada utilizando uma sonda telomérica de 18q (Figura 20), uma vez que a região não foi observada no derivado de X pela análise de GTG, o que poderia indicar a perda dessa região e uma justificativa do fenótipo apresentado. Entretanto, esta investigação nos mostrou a presença de segmento telomérico de 18q no cromossomo derivado de X (Figura 14), confirmando a natureza da translocação como recíproca e balanceada. Os pontos de quebra foram então definidos como Xp21.2 e 18q22.3

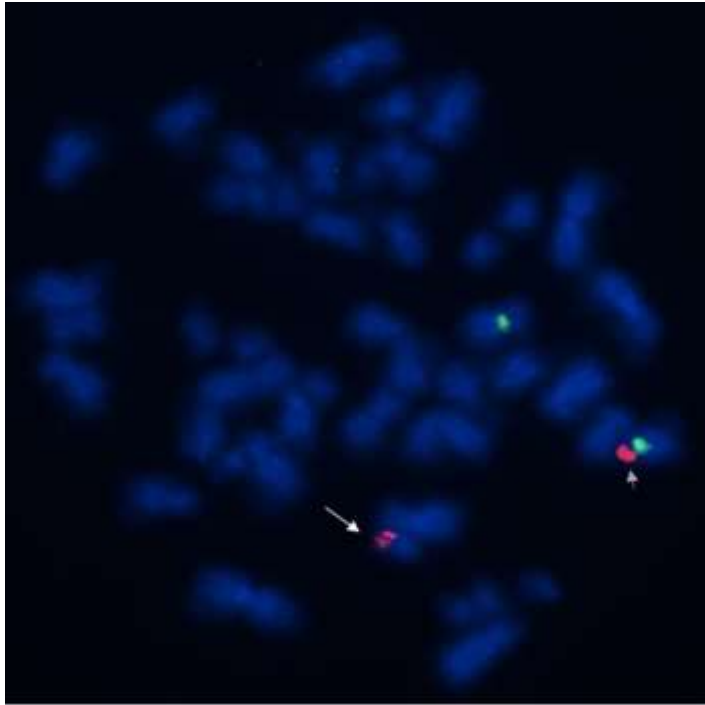


Figura 22 Técnica FISH utilizando a sonda telomérica de 18q, marcação vermelha e a sonda centromérica do cromossomo X, marcação verde. Podemos observar a presença de material proveniente do telômero de 18 no cromossomo derivado de X indicada pela seta menor, confirmando uma translocação recíproca.

A técnica de inativação do cromossomo X foi realizada com o objetivo de avaliar uma possível influência do mecanismo de inativação no fenótipo neste caso, como já relatado em estudos anteriores que envolviam translocação X;autossomo (82).

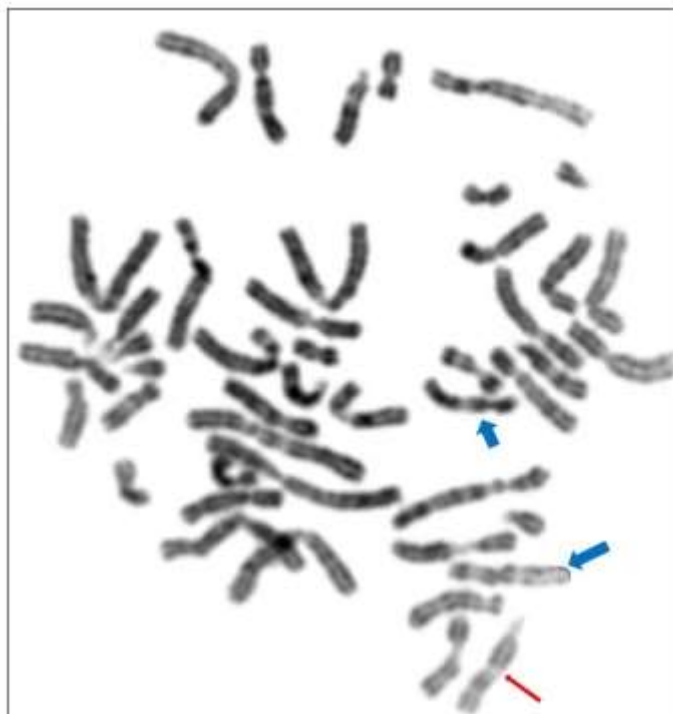


Figura 23 Técnica 5-BrdU em metáfase mostrando a inativação preferencial do cromossomo X normal. As setas azuis mostram o cromossomo X, a seta inferior mostra o cromossomo X normal mais pálido, ou seja, inativado e o cromossomo derivado de X mais corado, indicado pela seta superior. A seta vermelha indica o cromossomo 13 de replicação tardia, como controle da técnica.

A análise identificou, em todas as metáfases avaliadas, um padrão compatível com a inativação do cromossomo X normal (Figura 21). Esse padrão de inativação foi confirmado posteriormente pelo método de biologia molecular. O resultado mostra-se concordante com a literatura que sugere uma inativação preferencial do cromossomo X normal evitando que genes autossômicos translocados para o derivado do cromossomo X sejam silenciados (83). Por outro lado, essa inativação preferencial do cromossomo normal pode levar a ausência de expressão total de genes ligados aos X, caso tenha ocorrido uma ruptura gênica em consequência da translocação (82).

A partir dos pontos de quebra estabelecidos, foi realizada a técnica de *microarray CGH* em colaboração a Universidade de Copenhague que não identificou perdas e/ou ganhos a nível molecular, compatível com a translocação balanceada. Posteriormente, foi realizada a técnica de sequenciamento *mate-pair* das regiões flancoadoras dos pontos de quebra 18q22.3 e Xp21.2.

Esta análise demonstrou uma quebra na região do cromossomo 18 (chr18:78466312-78466876) envolvendo o domínio regulador do gene *SALL3* [OMIM 605079] (Figura 22), que é um codificante de uma proteína dedo de zinco. Até o atual momento são desconhecidos fenótipos relacionados a mutações em *SALL3* ou efeito de posição de longo alcance.

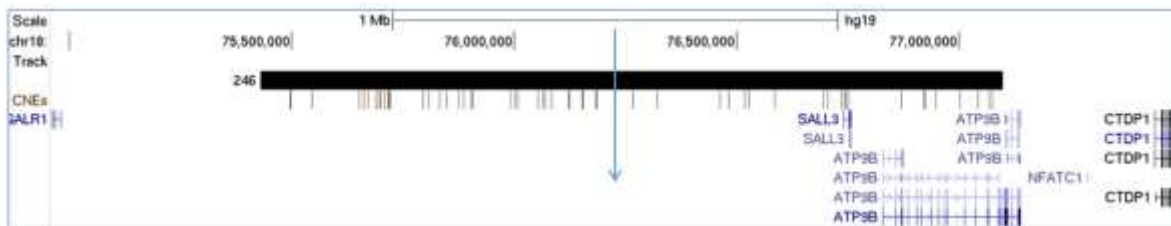


Figura 24 Esquema demonstrando a região do ponto de quebra resultantes da análise de *mate-pair* do cromossomo 18 que abrange a região regulador do gene *SALL3*.

A avaliação na região Xq21.2 revelou uma quebra dentro do gene *DMD* [OMIM 300377] (chrX:31913313-31913568) (Figura 23), que possui como produto gênico a distrofina, que é uma proteína do complexo distrofina-glicoproteínas ligando o citoesqueleto da fibra muscular à matriz extracelular, através da membrana celular (84). A deficiência nesta proteína é a causa primária os mais graves tipos de distrofia muscular como a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Distrofia Muscular de Becker e cardiopatias musculares.

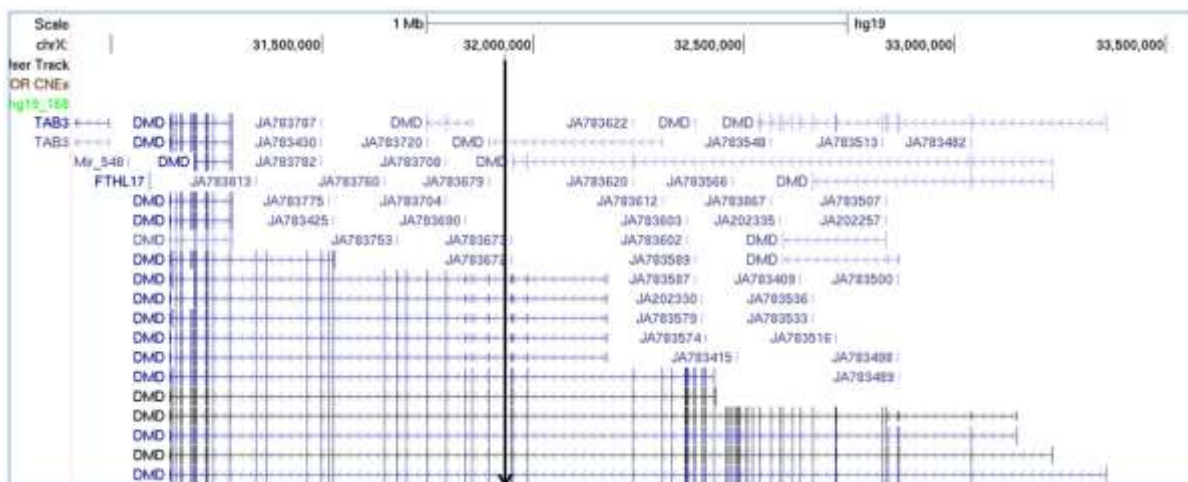


Figura 25 Esquema demonstrando a região do ponto de quebra resultantes da análise de *mate-pair* do cromossomo X dentro do gene DMD.

A partir dos resultados da investigação molecular, que indicava o comprometimento do gene *DMD*, foi sugerida a reavaliação clínica da paciente. Foram realizados exames complementares incluindo uma biópsia de muscular que apresentou músculo com padrão dismórfico, apresentando miopatia em atividade, com afluxo de macrófagos e fibrose moderada. A pesquisa de distrofina revelando ausência de marcação multifocal favoreceu o diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne. Atualmente a paciente é acompanhada pelo corpo clínico do Departamento de Genética Médica, visando monitorar a evolução clínica e a eventual intervenção terapêutica.

Esse caso serve como demonstração da atuação de diferentes mecanismos genéticos podem estar envolvidos na etiologia de uma doença monogênica a partir a uma alteração cromossômica. A quebra do gene da distrofina em consequência da translocação somada à inativação preferencial do cromossomo X normal, levou ao desencadeamento de uma doença recessiva ligada ao X em um indivíduo do sexo feminino, sem história familiar.

7.4 Caso IV - 46, XY t(18;21)(q23;q22.1)

Paciente do sexo masculino, 11 anos de idade na avaliação e filho de pais não consanguíneos. Foi encaminhado para acompanhamento genético por apresentar déficit

auditivo, agenesia de seio frontal direito, hipoplasia dos seios esfenoidais e do seio frontal esquerdo com velamento do recesso fronto etimoidal e um cariótipo anterior que sugeriu uma deleção do braço longo do cromossomo 21 (del 22q?).

Nossa análise por bandeamento GTG identificou uma translocação aparentemente balanceada entre o braço longo do cromossomo 18 e o braço longo do cromossomo 21 (Figura 24 e 25). Os pontos de quebra foram sugeridos como 18q23 e 21q22.1

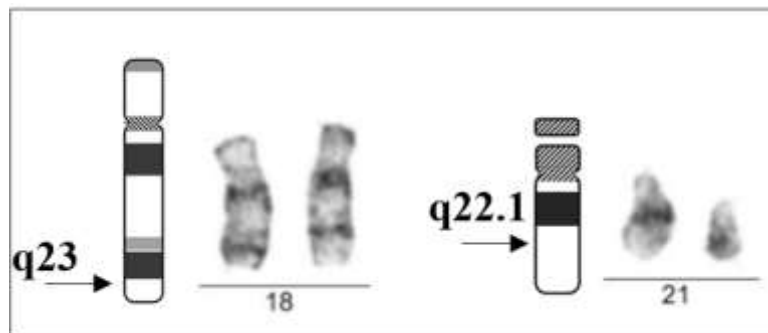


Figura 26 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 18 e 21 e seus pontos de quebra.

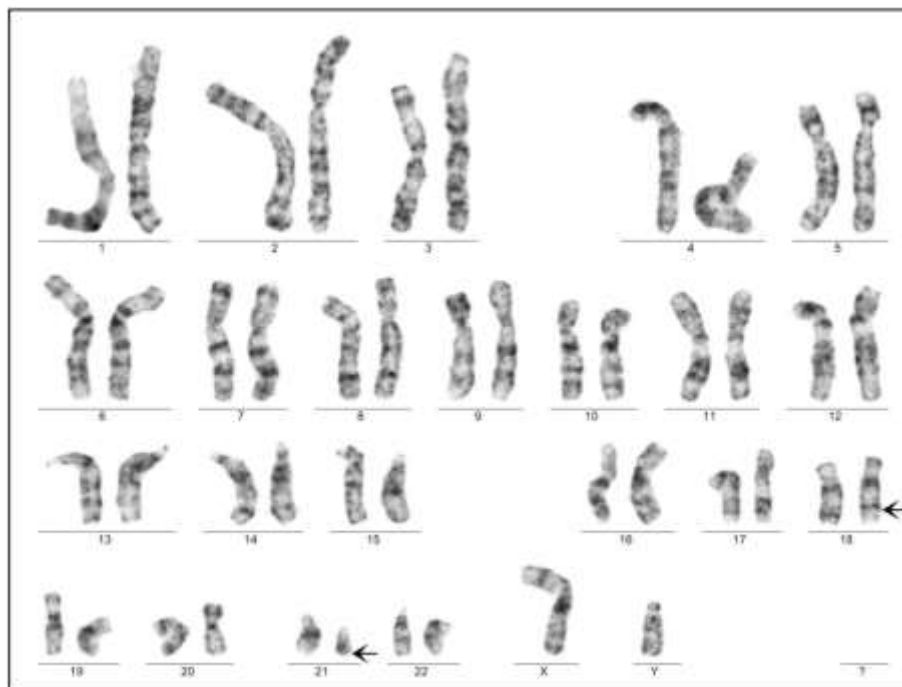


Figura 27 Cariótipo em banda G [46, XY, t (18;21)(q23;q22.1)]

A análise por *microarray CGH*, detectou uma deleção de 2.964kb, classificada como patogênica, na região 18q22.3-q23 (arr 71761216-74724903 x1) envolvendo vários genes, pseudogenes e miRNAs, sem perdas ou ganhos envolvendo o cromossomo 21.

Ao realizar uma busca nos bancos de dados OMIM e Genome Browser foram encontrados diversos genes presentes na região 18q22.3-q23, como: *CBLN2* [OMIM 600433], expresso no córtex cerebral, hipotálamo, bulbo olfativo e tálamo; *TIMM21* [OMIM 615180], que está envolvido no processo da cadeia respiratória mitocondrial; *CYB5A* [OMIM 613212] que está associado a fenótipos de genitália ambígua e a concentração aumentada de metemoglobina no sangue, entre outros (Figura 26).

Mais proximal ao ponto de quebra delimitado pela análise de bandeamento GTG em 18q23 encontra-se o gene *TSHZ1* [OMIM 614427](Figura 26), alterações e mutações neste gene estão associadas a fenótipo clínico de Atresia Aural Congênita. Esta condição é caracterizada por surdez de condução bilateral, atresia óssea da porção externa do canal auditivo, membrana timpânica rudimentar, perda da sensibilidade ofaltiva, embora nem todas as condições estejam presentes nos pacientes (85), o que se assemelha e pode ser correlacionado com as manifestações clínicas de nosso paciente.

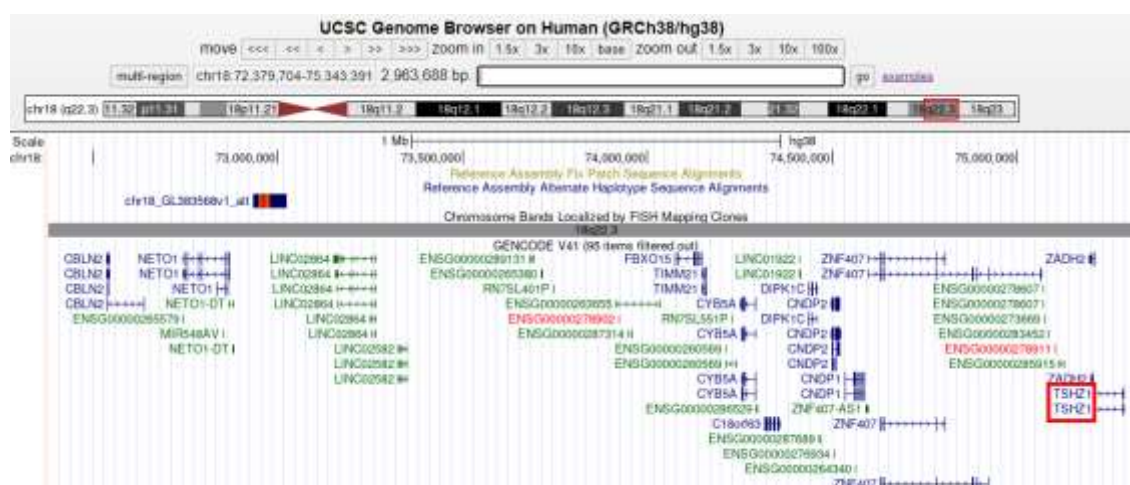


Figura 28 Imagem demonstrativa do Genome Browser da região 18q22.3. Destacado o gene TSHZ1 mais próximo da região de 18q23, que foi delimitada como ponto de quebra da translocação envolvendo os cromossomos 18 e 21 pelo bandeamento GTG. Em verde são exibidos genes e alelos registrados no OMIM e em azul os genes RefSeq do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI).

A deleção encontrada pela análise de *microarray* exemplifica um dos mecanismos propostos para a determinação do fenótipo anormal a partir de rearranjos cromossômicos aparentemente balanceados, além de definir o mapeamento fenotípico no ponto de quebra no braço longo do cromossomo 18 (q22.3)

Os achados obtidos através desta investigação foram suficientes para uma proposta diagnóstica de atresia aural congênica para o paciente, uma vez que a deleção encontrada é considerada patogênica e inclui a região onde se localiza o gene *TSHZ1* que possui associação a fenótipos alterados correspondentes ao da paciente.

7.5 Caso V - 45, XX, -22 t(12;22)(p13;q11)

Paciente do sexo feminino, pais jovens, não consanguíneos, encaminhada para acompanhamento genético recém-nascida por apresentar características clínicas sugestivas de Síndrome de Edwards.

A análise cromossômica por bandeamento GTG identificou uma translocação entre o braço curto do cromossomo 12 e a região centromérica do cromossomo 22, acarretando uma pseudo monossomia do cromossomo 22 e perda somente da região organizadora de nucléolo (Figura 27), sendo o cariótipo definido como: 45, XX, -22, t(12;22)(p13;q11). Não foram encontradas alterações envolvendo o cromossomo 18, como sugeridas pela a indicação clínica inicial.

O estudo cromossômico dos pais não apresentou alterações, caracterizando o rearranjo como “*de novo*”.

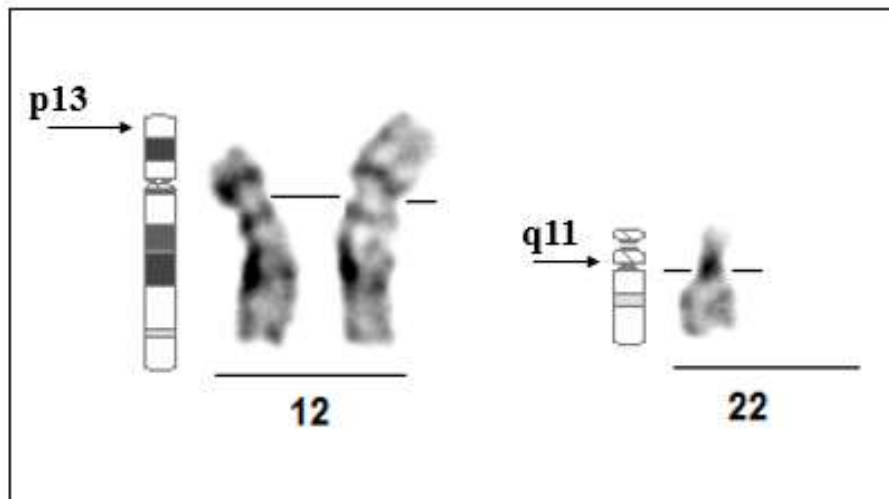


Figura 29 Cariótipo parcial demonstrando a translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 12 e 22 e seus pontos de quebra.

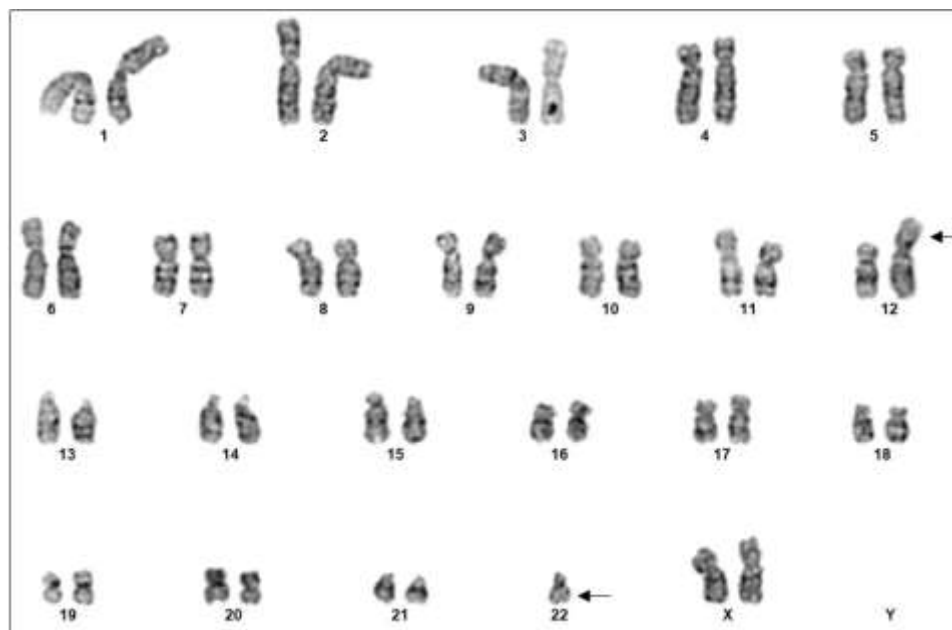


Figura 30 Cariótipo em banda G [45, XX, -22, t(12;22)(p13;q11)]

Considerando uma translocação aparentemente balanceada, foi realizada a análise cromossômica por *microarray* objetivando a pesquisa de perdas ou ganhos nos segmentos envolvidos.

Foram detectadas duas microdeleções ambas identificadas como patogênicas. Uma localizada no braço longo do cromossomo 13 de cerca de 15,884 kbp arr[hg19] 13q32.2q34 (99,224,026-115,107,733) x1 (Figura 29), não identificada inicialmente pela análise citogenética clássica e não relacionada com a translocação em questão. A outra correspondendo a um segmento de 3,278 kbp arr [hg19] 22q11.1q11.21(17,034,539-20,312,661) x1 do braço longo do cromossomo 22 (Figura 30). Em relação ao cromossomo 12 não foram identificadas perdas e/ou ganhos a nível molecular (Figura 31).

Após a análise por *microarray* o cariótipo em banda G foi revisto considerando a deleção do cromossomo 13 [45, XX, -22, del(13)(q32.3-q34), t(12;22)(p13;q11)].

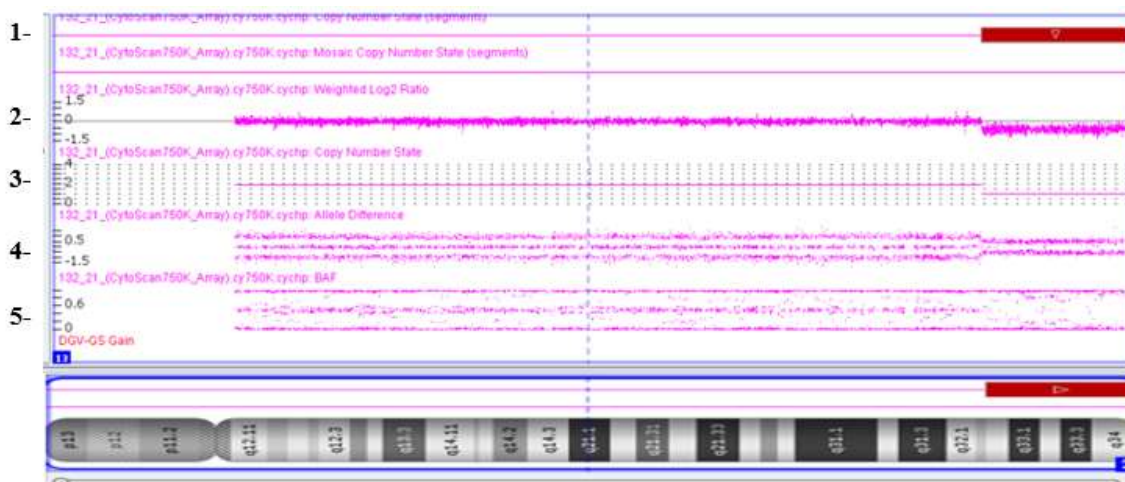


Figura 31 Resultado da análise cromossômica por microarray cromossomo 13. 1- Segmento que mostra os segmentos alterados e em vermelho mostra a região de deleção na região do braço longo do cromossomo 13q32.3q34 (99,224,026-115,107,733), 2- Segmento as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo. Na região da deleção as sondas correspondentes aparecem em menor quantidade do que o normal (estão abaixo da linha central), 3- Segmento que mostra a quantidade de cópias referentes as sondas da linha 2, na região da deleção há apenas uma cópia, 4- Segmento que mostra regiões de perda de heterozigose, uma vez que houve deleção essas linhas estão mais próximas, 5- Segmento que mostra o inverso da linha 4.

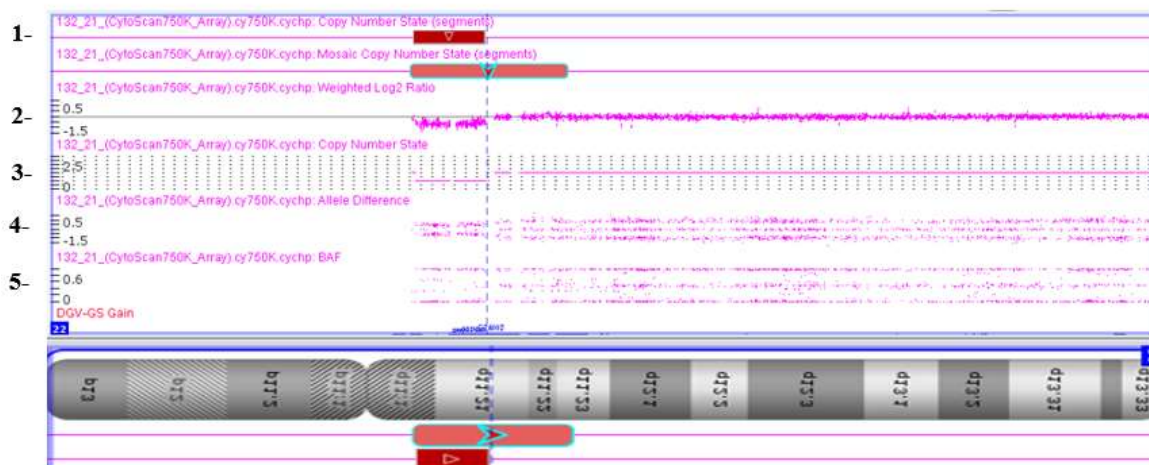


Figura 32 Resultado da análise cromossômica por microarranjo cromossomo 22. 1- Segmento que mostra os segmentos alterados e em vermelho mostra a região de deleção na região do braço longo do cromossomo 22q11.1q11.21(17,034,539-20,312,661 2- Segmento que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo. Na região da deleção as sondas correspondentes aparecem em menor quantidade do que o normal (estão abaixo da linha central). 3- Segmento que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior. Na região da deleção há apenas uma cópia para essa região de sondas. 4- Segmento que mostra regiões de perda de heterozigose, uma vez que houve deleção essas linhas estão mais próximas, 5- Segmento que mostra o inverso da linha 4.

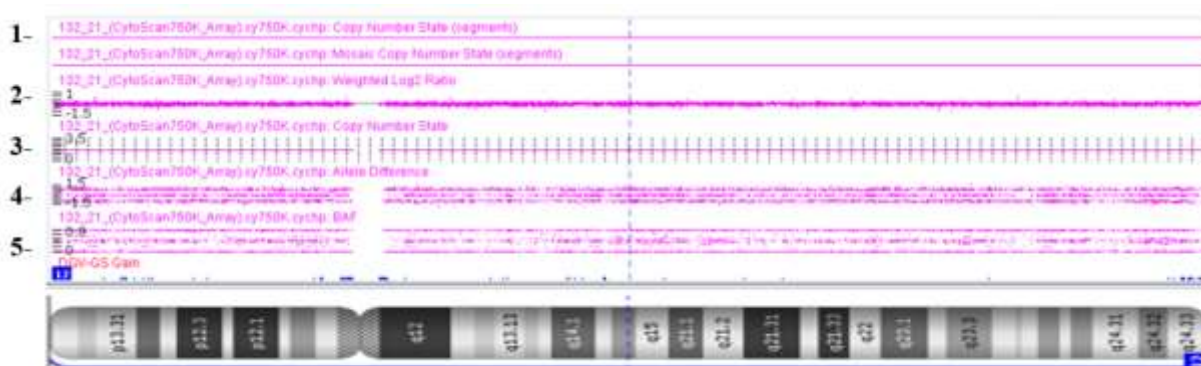


Figura 33 Resultado da análise cromossômica por microarranjo do cromossomo 12 envolvido na translocação 1- Segmento que mostra os segmentos alterados, indicando que não há alteração significativa no cromossomo analisado. 2- Segmento que mostra todas as sondas não-polimórficas presentes no cromossomo, apresentando-se sem alteração. 3- Segmento que mostra a quantidade de cópias referentes às sondas da linha anterior também não apresentando alterações. 4- Segmento que mostra regiões de perda de heterozigose quando existente, 5- Segmento que mostra o inverso da linha 4.

A região de deleção do cromossomo 13 engloba cerca de 47 genes, sendo diversos deles associados a patologias, como o *ZIC2* [OMIM 603073] que está correlacionado com desenvolvimento de holoprosencefalia, *PCCA* [OMIM 232000] que é um gene importante no metabolismo de diferentes aminoácidos e alterações em sua expressão estão envolvidas

com erros inatos no metabolismo, *NALCN* [OMIM 611549] com relação genótipo-fenótipo de hipotonia, atraso no desenvolvimento além de déficit no desenvolvimento psicomotor e distúrbios, *FGF14* [OMIM 601515] associado a ataxia espinocerebelar, *TPP2* [OMIM 190470] relacionado a problemas de imunodeficiência e atraso no desenvolvimento.

Já a deleção encontrada na região q11.1q11.21(17,034,539-20,312,661) do cromossomo 22, como consequência da translocação envolvendo esse cromossomo e o 12, engloba um grande segmento genômico, desde q11.21 até a região telomérica de 22p (q11.21→ pter).

Uma série de genes já relacionados a diferentes patologias estão localizados nessa região, entre eles o gene *IL17RA* [OMIM 605461] relacionado a imunodeficiência, *CECRI* [OMIM 607575] também relacionado com imunodeficiência, defeitos hematológicos e síndrome de Sneddon, que afeta os vasos sanguíneos e artérias de pequenos calibres, *TUBA8* [OMIM 605742] associado a macrotrombocitopenia, a região de DiGeorge síndrome, *PRODH* [OMIM 606810] relacionado com hiperprolinemia do tipo 1, *CDC45* [OMIM 603464] associado a síndrome de Meier-Gorlin, *TBX1* [OMIM 602054] associada com a síndrome de DiGeorge, tetralogia de fallot e a síndrome de Velocardiofacial e *RTN4R* [OMIM 605566] susceptibilidade a esquizofrenia.

Através do estudo de *microarray* foi possível identificar as possíveis causas dos distúrbios e condições clínicas da paciente, pois a perda desses segmentos de DNA envolve diversos genes e tem um impacto grande fenotípico, ocasionando o quadro clínico complexo.

Nesse caso, não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo mais precisa uma vez que nossos resultados identificaram alterações adicionais a translocação, que também podem estar contribuindo para o fenótipo da paciente.

8. Conclusão

Dos cinco casos estudados, foi possível estabelecer o mapeamento fenotípico e pontuar genes candidatos em quatro casos.

No caso 1 foi realizada uma análise completa, com seus pontos de quebra delimitados em a região de 1p36.3 e 8q21. A partir da técnica de *mate-pair* sugerimos a o gene *PLPP3* localizado na região 1p36.3 como o mais provável candidato a correlação genótipo-fenótipo do paciente. Além disso a identificação da quebra gênica de *SLCO5A1* em 8q21 foi importante para a pesquisa de novos genes associados a síndrome de Mesomelia Sinostose.

No caso 2 a paciente portadora de uma translocação equilibrada entre os cromossomos 1 e 18 teve o gene *GREBIL* localizado na região 18q11.1-q11.2 e sugerido como possível candidato através da delimitação de seus pontos de quebra.

No caso 3 o sequenciamento por *mate-pair* foi fundamental para a identificação da quebra gênica do gene *DMD* e o redirecionamento do diagnóstico clínico da paciente.

No caso 4 o estudo por *microarray* detectou uma deleção na região do ponto de quebra do cromossomo 18 que englobava o gene *TSHZ1* sendo este candidato ao desenvolvimento do quadro clínico do paciente.

No caso 5 não foi possível apontar uma região candidata inequívoca devido a detecção de uma alteração adicional a translocação, que provavelmente está contribuindo para o fenótipo apresentado.

Nossos achados evidenciam a importância da estratégia de mapeamento a partir de rearranjos estruturais considerados balanceados. A identificação de microaberrações nos pontos de quebras das translocações pelas técnicas mais refinadas, além da demonstração

de mecanismos genéticos como a inativação não aleatória do cromossomo X nos permite considerar uma relação causal entre translocação e o fenótipo alterado.

9. Referências Bibliográficas

1. Jacobs P, Hassold T. Chromosome Abnormalities: Origin and Etiology in Abortions and Livebirths. *Berlin Proceedings Hum Gen.* 1987;233–44.
2. Nussbaum R. THOMPSON & THOMPSON GENÉTICA MÉDICA. [Internet]. London: Elsevier Health Sciences Brazil; 2008 [citado 31 de maio de 2021]. Disponível em: http://www.123library.org/book_details/?id=46921
3. Beiguelman B. Citogenética Humana [Internet]. Vol. 1. Guanabara Koogan; 1982 [citado 31 de maio de 2021]. 340 p. Disponível em: <https://www.estantevirtual.com.br/livros/bernardo-beiguelman/citogenetica-humana/1638537818>
4. Feenstra I, Koolen DA, Van der Pas J, Hamel BCJ, Mieloo H, Smeets DFCM, et al. Cryptic duplication of the distal segment of 22q due to a translocation (21;22): three case reports and a review of the literature. *Eur J Med Genet.* outubro de 2006;49(5):384–95.
5. Aristidou C, Theodosiou A, Bak M, Mehrjouy MM, Constantinou E, Alexandrou A, et al. Position effect, cryptic complexity, and direct gene disruption as disease mechanisms in de novo apparently balanced translocation cases. *Palit Deb S, organizador. PLOS ONE.* 5 de outubro de 2018;13(10):e0205298.
6. Xu X jie, Lv F, Liu Y, Wang J yi, Song Y wen, Asan, et al. A cryptic balanced translocation involving COL1A2 gene disruption cause a rare type of osteogenesis imperfecta. *Clin Chim Acta.* setembro de 2016;460:33–9.
7. Greenstein RM, Reardon MP, Chan TS. An X/Autosome Translocation in a Girl with Duchenne Muscular Dystrophy (dmd): Evidence for Dmd Gene Localization. *Pediatr Res.* abril de 1977;11(4):457–457.
8. Canki N, Dutrillaux B, Tivadar I. Dystrophie musculaire de Duchenne chez une petite fille porteuse d'une translocation t(X;3)(p21;q13) de novo. *Dystrophie Muscul Duchenne Chez Une Petite Fille Porteuse D'une Translocat TX3p21 Q13 Novo.* 1979;22:35–29.
9. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.* 31 de julho de 1987;50(3):509–17.
10. Barker D, Wright E, Nguyen K, Cannon L, Fain P, Goldgar D, et al. Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science.* 29 de maio de 1987;236(4805):1100–2.
11. O'Connell P, Leach RJ, Ledbetter DH, Cawthon RM, Culver M, Eldridge JR, et al. Fine structure DNA mapping studies of the chromosomal region harboring the genetic defect in neurofibromatosis type I. *Am J Hum Genet.* janeiro de 1989;44(1):51–7.
12. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science.* 13 de julho de 1990;249(4965):181–6.
13. de Almeida JC, Llerena Júnior JC, Gonçalves Neto JB, Jung M, Martins RR. Another example favouring the location of BPES at 3q2. *J Med Genet.* janeiro de 1993;30(1):86.

14. De Baere E, Dixon MJ, Small KW, Jabs EW, Leroy BP, Devriendt K, et al. Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype--phenotype correlation. *Hum Mol Genet.* 15 de julho de 2001;10(15):1591–600.
15. Horovitz DDG, Cardoso MHC de A, Llerena Jr. JC, Mattos RA de. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: características do atendimento e propostas para formulação de políticas públicas em genética clínica. *Cad Saúde Pública.* dezembro de 2006;22:2599–609.
16. Marqui ABT de. Anormalidades cromossômicas em abortos recorrentes por análise de cariótipo convencional. *Rev Bras Saúde Materno Infant.* junho de 2018;18:265–76.
17. Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. Introdução à Genética [Internet]. Vol. 9. Guanabara Koogan; 2009 [citado 31 de maio de 2021]. Disponível em: <https://docero.com.br/doc/e0ncx5>
18. Guerra M. Introdução à Citogenética Geral [Internet]. Guanabara Koogan; 1988 [citado 2 de junho de 2021]. 142 p. Disponível em: <https://www.docsity.com/pt/introducao-a-citogenetica-geral-marcelo-guerra-editora-guanabara-koogan/4913221/>
19. Akutsu SN, Fujita K, Tomioka K, Miyamoto T, Matsuura S. Applications of Genome Editing Technology in Research on Chromosome Aneuploidy Disorders. *Cells* [Internet]. 17 de janeiro de 2020 [citado 2 de junho de 2021];9(1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016705/>
20. Tsai AG, Lieber MR. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics.* 10 de fevereiro de 2010;11(1):S1.
21. Shaffer, Lisa G; Lupski, James R. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annual review of genetics.* 2000;34:297.
22. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet.* outubro de 2009;52(5):291–6.
23. Kiss A, Rosa RFM, Dibi RP, Zen PRG, Pfeil JN, Graziadio C, et al. Anormalidades cromossômicas em casais com história de aborto recorrente. *Rev Bras Ginecol E Obstetrícia.* fevereiro de 2009;31(2):68–74.
24. Elghezal H, Hidar S, Mougou S, Khairi H, Saâd A. Prevalence of chromosomal abnormalities in couples with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* setembro de 2007;88(3):721–3.
25. Ceroni JRM, Vieira MW, Filho JB, Rodrigueiro DA. Abortamento espontâneo de repetição em paciente portadora de translocação cromossômica balanceada. *Rev Fac Ciênc Médicas Sorocaba.* 16 de dezembro de 2013;15(4):133–5.
26. Simovich MJ, Yatsenko SA, Kang SHL, Cheung SW, Dudek ME, Pursley A, et al. Prenatal diagnosis of a 9q34.3 microdeletion by array-CGH in a fetus with an apparently balanced translocation: 9Q34.3 MICRODELETION. *Prenat Diagn.* 15 de dezembro de 2007;27(12):1112–7.
27. Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic Diagnosis for Pediatric Disorders: Revolution and Evolution. *Front Pediatr.* 8 de julho de 2020;8:373.
28. Funari MFA, Jorge AAL, Pinto EM, Arnhold IJP, Mendonca BB, Nishi MY. Cryptic intragenic deletion of the SHOX gene in a family with Léri-Weill

dyschondrosteosis detected by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Arq Bras Endocrinol Metabol.* novembro de 2008;52(8):1382–7.

29. Kleinjan DA, van Heyningen V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet.* janeiro de 2005;76(1):8–32.

30. Lima F de O, Catarino RM, Oshima CTF, Figueiredo MT de A. Regiões organizadoras nucleolares argirofílicas no sarcoma sinovial. *J Bras Patol E Med Lab.* outubro de 2005;41(5):347–52.

31. Schmidt MA, Michels VV, Dewald GW, Opitz JM, Reynolds JF. Cases of neurofibromatosis with rearrangements of chromosome 17 involving band 17q11.2. *Am J Med Genet.* 1987;28(3):771–7.

32. Crolla JA, van Heyningen V. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *Am J Hum Genet.* novembro de 2002;71(5):1138–49.

33. Llerena Junior JC, Cabral de Almeida JC, Bastos E, Crolla JA. FISH studies in a girl with sporadic aniridia and an apparently balanced de novo t(11; 13)(p13; q33) translocation detect a microdeletion involving the WAGR region. 2000 [citado 31 de maio de 2021]; Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/306>

34. Talkowski ME, Ernst C, Heilbut A, Chiang C, Hanscom C, Lindgren A, et al. Next-Generation Sequencing Strategies Enable Routine Detection of Balanced Chromosome Rearrangements for Clinical Diagnostics and Genetic Research. *Am J Hum Genet.* abril de 2011;88(4):469–81.

35. González-González C, García-Hoyos M, Hernaez Calzón R, Arroyo Díaz C, González Fanego C, Lorda Sánchez I, et al. Microdeletion found by array-CGH in girl with blepharophimosis syndrome and apparently balanced translocation t(3;15)(q23;q25). *Ophthalmic Genet.* junho de 2012;33(2):107–10.

36. Linhares ND, Svartman M, Valadares ER. Diagnóstico citogenético de pacientes com retardo mental idiopático. *J Bras Patol E Med Lab.* fevereiro de 2012;48:33–9.

37. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, organizadores. *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016): An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016) ... and Genome Research 2016, Vol. 149, No. 1-2.* Basel ; New York: S Karger Ag; 2016.

38. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science.* 26 de março de 1976;191(4233):1268–70.

39. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* maio de 1986;83(9):2934–8.

40. Sugayama SMM, Moisés RL, Wagênfur J, Ikari NM, Abe KT, Leone C. Síndrome de Williams-Beuren. Anomalias Cardiovasculares em 20 Pacientes Diagnosticados pela Hibridização In Situ por Fluorescência. *Arq Bras Cardiol.* :6.

41. Slavotinek A. Microdeletion Syndromes. Em: eLS [Internet]. American Cancer Society; 2012 [citado 31 de maio de 2021]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0005549.pub2>

42. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 15 de novembro de 2007;145C(4):335–45.

43. Shaffer LG, Agan N, Goldberg JD, Ledbetter DH, Longshore JW, Cassidy SB. American College of Medical Genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* junho de 2001;3(3):206–11.
44. Weise A, Mrasek K, Fickelscher I, Claussen U, Cheung SW, Cai WW, et al. Molecular Definition of High-resolution Multicolor Banding Probes: First Within the Human DNA Sequence Anchored FISH Banding Probe Set. *J Histochem Cytochem.* maio de 2008;56(5):487–93.
45. Neves SMN, Guedes RMC. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arq Inst Biológico.* dezembro de 2012;79:627–32.
46. Emy Dorfman L, Leite JCL, Giugliani R, Riegel M. Microarray- based comparative genomic hybridization analysis in neonates with congenital anomalies: detection of chromosomal imbalances. *J Pediatr Versão Em Port.* janeiro de 2015;91(1):59–67.
47. Almeida PBL, Duarte Filho OB, Soares JB. Perspectivas de uso da hibridização genômica comparativa como rastreamento pré-implantacional em biópsias de embrião humano no estágio de blastocisto. *Reprodução Clim.* maio de 2013;28(2):74–9.
48. Pratte-Santos R, Ribeiro KH, Santos TA, Cintra TS. Analysis of chromosomal abnormalities by CGH-array in patients with dysmorphic and intellectual disability with normal karyotype. *Einstein São Paulo.* março de 2016;14(1):30–4.
49. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A.* 15 de dezembro de 2006;140(24):2757–67.
50. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* julho de 2007;39(7 Suppl):S48-54.
51. Pasquier L, Fradin M, Chérot E, Martin-Coignard D, Colin E, Journal H, et al. Karyotype is not dead (yet)! *Eur J Med Genet.* janeiro de 2016;59(1):11–5.
52. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 1º de janeiro de 2016;107(1):1–8.
53. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* junho de 2016;17(6):333–51.
54. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* dezembro de 1977;74(12):5463–7.
55. Shyr D, Liu Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. *Biol Proced Online.* dezembro de 2013;15(1):4.
56. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* abril de 2018;24(4):335–41.
57. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child - Educ Pract Ed.* dezembro de 2013;98(6):236–8.
58. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1–11.
59. Gao G, Smith DI. How can mate-pair sequencing be utilized for cancer patients? *Expert Rev Mol Diagn.* 2 de janeiro de 2017;17(1):1–3.
60. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* setembro de 2008;9(1):387–402.

61. Jighly A. Mate-pair editing: a perspective to double mate-pair sequencing coverage. *3 Biotech.* 31 de outubro de 2016;6(2):234.
62. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet.* janeiro de 2010;11(1):31–46.
63. Aristidou C, Koufaris C, Theodosiou A, Bak M, Mehrjouy MM, Behjati F, et al. Accurate Breakpoint Mapping in Apparently Balanced Translocation Families with Discordant Phenotypes Using Whole Genome Mate-Pair Sequencing. Lo AWI, organizador. *PLOS ONE.* 10 de janeiro de 2017;12(1):e0169935.
64. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1º de setembro de 1960;20(3):613–6.
65. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet Lond Engl.* 30 de outubro de 1971;2(7731):971–2.
66. Murer-Orlando M, Llerena J, McGuire M, Zahed L, Crolla J, Bobrow M, et al. Chromosome banding in direct preparations of chorionic villi. *Prenat Diagn.* julho de 1988;8(6):461–9.
67. Salamanca F, Armendares S. C bands in human metaphase chromosomes treated by barium hydroxide. *Ann Genet.* junho de 1974;17(2):135–6.
68. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 11 de fevereiro de 1988;16(3):1215.
69. Verloes A, David A. Dominant mesomelic shortness of stature with acral synostoses, umbilical anomalies, and soft palate agenesis. *Am J Med Genet.* 16 de janeiro de 1995;55(2):205–12.
70. Pfeiffer RA, Hirschfelder H, Rott HD. Specific acromesomelia with facial and renal anomalies: a new syndrome. *Clin Dysmorphol.* janeiro de 1995;4(1):38–43.
71. Isidor B, Pichon O, Redon R, Day-Salvatore D, Hamel A, Siwicka KA, et al. Mesomelia-Synostoses Syndrome Results from Deletion of *SULF1* and *SLCO5A1* Genes at 8q13. *Am J Hum Genet.* 9 de julho de 2010;87(1):95–100.
72. Dardis A, Pianta A, Zampieri S, Zanin I, Bertoli M, Cazzagon M, et al. Mesomelia-synostoses syndrome: Description of a patient presenting a monoallelic expression of *SULF1* without alterations in the *SLCOA1* gene. *Clin Genet.* fevereiro de 2019;95(2):336–8.
73. Kohmoto T, Naruto T, Watanabe M, Fujita Y, Ujiro S, Okamoto N, et al. A 590 kb deletion caused by non-allelic homologous recombination between two LINE-1 elements in a patient with mesomelia-synostosis syndrome. *Am J Med Genet A.* abril de 2017;173(4):1082–6.
74. Day-Salvatore D, McLean D. Blepharophimosis, hypoplastic radius, hypoplastic left heart, telecanthus, hydronephrosis, fused metacarpals, and “prehensile” halluces: a new syndrome? *Am J Med Genet.* 4 de dezembro de 1998;80(4):309–13.
75. Leroy JG, Claus L, Lee B, Mortier GR. Mesomelic dysplasia with specific autopodal synostoses: a third observation and further delineation of the multiple congenital anomaly syndrome. *Pediatr Pathol Mol Med.* fevereiro de 2003;22(1):23–35.
76. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A *WNT4* Mutation Associated with Müllerian-Duct Regression and Virilization in a 46,XX Woman. *N Engl J Med.* 19 de agosto de 2004;351(8):792–8.

77. Herlin MK, Petersen MB, Brännström M. Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: a comprehensive update. *Orphanet J Rare Dis.* 20 de agosto de 2020;15(1):214.
78. Biason-Lauber A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. WNT4 deficiency--a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Hum Reprod Oxf Engl.* janeiro de 2007;22(1):224–9.
79. Drummond JB, Reis FM, Boson WLM, Silveira LFG, Bicalho MAC, De Marco L. Molecular analysis of the WNT4 gene in 6 patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Fertil Steril.* setembro de 2008;90(3):857–9.
80. Jacquinet A, Boujemla B, Fasquelle C, Thiry J, Josse C, Lumaka A, et al. GREB1L variants in familial and sporadic hereditary urogenital adysplasia and Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Clin Genet.* 2020;98(2):126–37.
81. De Tomasi L, David P, Humbert C, Silbermann F, Arrondel C, Tores F, et al. Mutations in GREB1L Cause Bilateral Kidney Agenesis in Humans and Mice. *Am J Hum Genet.* 2 de novembro de 2017;101(5):803–14.
82. Szűcs Z, Pinti É, Haltrich I, Szén OP, Nagy T, Barta E, et al. An Ultra-Rare Manifestation of an X-Linked Recessive Disorder: Duchenne Muscular Dystrophy in a Female Patient. *Int J Mol Sci.* 28 de outubro de 2022;23(21):13076.
83. Cotton AM, Chen CY, Lam LL, Wasserman WW, Kobor MS, Brown CJ. Spread of X-chromosome inactivation into autosomal sequences: role for DNA elements, chromatin features and chromosomal domains. *Hum Mol Genet.* 1º de março de 2014;23(5):1211–23.
84. Gao QQ, McNally EM. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol.* 1º de julho de 2015;5(3):1223–39.
85. Feenstra I, Vissers LELM, Pennings RJE, Nillessen W, Pfundt R, Kunst HP, et al. Disruption of Teashirt Zinc Finger Homeobox 1 Is Associated with Congenital Aural Atresia in Humans. *Am J Hum Genet.* 9 de dezembro de 2011;89(6):813–9.

Referências eletrônicas:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man

<http://genome.ucsc.edu> – UCSC Genome Browser

<http://Genecards.org> – GeneCards: The Human Gene Database

ANEXO 1 – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Identificação de regiões candidatas ao mapeamento fenotípico anormal a partir de rearranjos cromossômicos estruturais considerados balanceados.

Pesquisador(es) responsável(eis) e contato:

Ingrid Bendas Feres Lima: 21 999654416 - E-mail: bendasingrid@gmail.com

Dra. Elenice Ferreira Bastos: 21 25541709 - E-mail: elenice.bastos@iff.fiocruz.br

Dr. Juan Clinton Llerena Jr. 21 25541709 - E-mail: juan.llerena@iff.fiocruz.br

Instituto Fernandes Figueira /FIOCRUZ

Avenida Rui Barbosa, 716 – Bloco C – Segundo Andar

CEP: 22250-020

Tel: (21)2554-1700

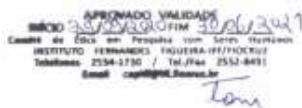
Paciente/responsável: _____

Prontuário: _____

Você está convidado(a) a participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulado “Identificação de regiões candidatas ao mapeamento fenotípico anormal a partir de rearranjos cromossômicos estruturais considerados balanceados.”, pois seu filho(a) apresenta uma translocação cromossômica balanceada “*de novo*”, isto é uma alteração (troca de pedaços) envolvendo dois cromossomos de pares diferentes sem perda aparente de material genético. Além disso, essa alteração não foi herdada. Assim, ele se enquadra nos critérios estabelecidos para participar desse projeto.

Rubrica voluntário

Rubrica pesquisador



De modo geral, esse tipo de alteração não está relacionada às condições clínicas no paciente, mas, neste caso, como seu filho(a) também apresenta alterações clínicas, essa troca entre os cromossomos pode ser a causa.

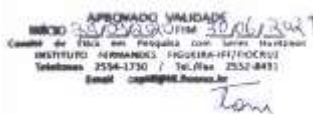
O objetivo desta pesquisa é tentar identificar novos genes ou pequenas regiões que sejam responsáveis por características clínicas como malformações e/ou dificuldade de aprendizado, visando a possibilidade de um melhor diagnóstico para o paciente.

Este estudo contribuirá para uma aplicação prática no refinamento do diagnóstico citogenético de todos os pacientes assistidos no Centro de Genética Médica do Instituto Fernandes Figueira. Uma análise mais aprofundada e direcionada, pode trazer valiosos resultados para um maior entendimento dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos nas malformações congênitas e/ou na dificuldade de aprendizado, colaborando tanto para a pesquisa acadêmica, quanto para a qualidade do atendimento e acompanhamento do paciente.

Será coletada uma amostra de sangue para obtenção de material e realização de diferentes exames: Cariótipo, FISH (Hibridização in situ por Fluorescência), CHG-array e Sequenciamento de Nova Geração. A coleta de sangue poderá gerar desconforto devido à utilização de uma seringa com agulha que será inserida em uma veia do braço, podendo causar um hematoma após a coleta, mas tomaremos todas as medidas para minimizar este risco. Também será necessário fazer uma revisão de prontuários, mas os pacientes serão identificados por um número, para evitar quebra de confidencialidade. O material biológico obtido nesse projeto será armazenado em um banco de material biológico mantido na própria instituição (biorepositório). O paciente ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar o consentimento de guarda e utilização do material armazenado.

Rubrica voluntário

Rubrica pesquisador



É importante esclarecer que, caso você decida não participar, não usaremos os dados do prontuário. Você tem garantido o direito de não participação, ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo. Você tem o direito de sanar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, entrando em contato com algum dos pesquisadores por telefone ou e-mail.

As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo total sobre sua participação.

Em caso de achados não esperados que possam ter impacto na saúde ou no prognóstico (chances de futuras complicações e/ou melhorias do quadro clínico) de seu filho, a família será imediatamente contatada e agendada uma consulta genética para esclarecimentos e eventuais procedimentos necessários, como aconselhamento genético familiar e/ou indicação de exames complementares, seguindo as recomendações do Colégio Americano de Genética e Genômica Médica.

Seu filho(a) e você não terão qualquer despesa com a realização dos procedimentos previstos no estudo. Entretanto, caso sua participação ou de seu filho venha a implicar em custos adicionais, vocês terão direito a ressarcimento de gastos decorrentes da pesquisa, que serão oriundos do financiamento previsto para o estudo. É garantido o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Você receberá uma via idêntica deste termo de consentimento assinada pelo pesquisador deste estudo.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) encontra-se à disposição para eventuais esclarecimentos éticos e outras providências que se façam necessárias. (E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br; Telefone: 2554-1730; Fax: 2552- 8491).

Rubrica voluntário

Rubrica pesquisador



Eu, _____, portador do CPF número _____, pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coação, sobre os objetivos da pesquisa. Declaro que li e entendi todo o conteúdo deste documento.

Assinatura: _____

Data: _____

Telefone: _____

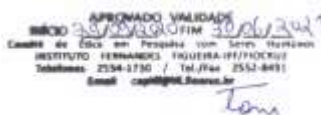
Investigador que obteve o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome: _____

Assinatura: _____

Rubrica voluntário

Rubrica pesquisador



ANEXO II



Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review.
They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice,
or referenced by the media as validated information.

Disruption in SLC05A1 gene by a balanced chromosomal translocation t(1;8)(p32.2;q13). Another evidence of the need for combined haploinsufficiency of genes SLC05A1 and SULF1 genes as a cause of mesomelia-synostosis syndrome. Clinical and cytogenetic considerations.

Ingrid Bendas Feres Lima

Clinical Cytogenetics Laboratory; Center for Medical Genetics / IFF / Fiocruz

Lúcia de Fátima Marques de Moraes

Clinical Cytogenetics Laboratory; Center for Medical Genetics / IFF / Fiocruz

Carlos Roberto da Fonseca

Clinical Cytogenetics Laboratory; Center for Medical Genetics / IFF / Fiocruz

Juan Juan Clinton Llerena Jr

Clinical Cytogenetics Laboratory; Center for Medical Genetics / IFF / Fiocruz

Niels Tommerup

Department of Cellular and Molecular Medicine; University of Copenhagen

Elenice Ferreira Bastos (✉ Elenice.bastos@iff.fiocruz.br)

Clinical Cytogenetics Laboratory; Center for Medical Genetics / IFF / Fiocruz

Case Report

Keywords: Balanced translocations, Mesomelia-synostosis syndrome, SLC05A1 gene, Chromosomal microarray analysis, Mate-pair sequencing

Posted Date: November 22nd, 2022

DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2288275/v1>

License: © ⓘ This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

[Read Full License](#)

ANEXO III

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de regiões candidatas a mapeamento fenotípico anormal a partir de rearranjos cromossômicos estruturais considerados balanceados

Pesquisador: Elenice Ferreira Bastos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 35766720.7.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.307.661

Apresentação do Projeto:

Resposta à pendência ao parecer 4.197.783 de 06/08/2020 e 4.303.455 de 28/09/2020

As informações referentes à "Apresentação do Projeto", foram obtidas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1588039 de 29/07/2020 data).

"A investigação detalhada das regiões dos sítios de quebra e dos rearranjos estruturais aparentemente balanceados, tem sido utilizado como uma estratégia na busca de novos genes candidatos a fenótipos clínicos anormais, tais como defeitos congênitos, deficiência intelectual e/ou câncer infantil. Este projeto visa caracterizar casos de anomalias cromossômicas estruturais, especialmente os casos de translocações aparentemente balanceadas, em nível da citogenética clássica, citogenética molecular e técnicas de sequenciamento de DNA na identificação de genes associados ao fenótipo clínico anormal.

Será realizado um estudo observacional retrospectivo e prospectivo. Este envolverá a revisão de prontuários, livros de cadastros de citogenética e a realização de técnicas de citogenética e de citogenética molecular para complementação do estudo e caracterização de casos novos. Os pacientes são indicados para a avaliação citogenética por médicos geneticistas do IFF e/ou de instituições parceiras via SUS. A partir da identificação citogenética de uma alteração

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 4.307.661

cromossômica estrutural, o paciente é devidamente esclarecido pelo corpo clínico e, consentindo com o estudo pelo TCLE, a amostra é selecionada para a caracterização dos pontos de quebra a partir da utilização de diferentes metodologias."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

- Identificar possíveis genes ou regiões candidatas associadas a alterações cromossômicas estruturais aparentemente balanceadas e a fenótipos clínicos anormais

Objetivos específicos:

- Identificar e caracterizar alterações cromossômicas estruturais balanceadas;
- Delimitar os pontos de quebra envolvidos em tais alterações por métodos de citogenética convencional e molecular;
- Investigar as anomalias cromossômicas selecionadas pela técnica de CGH-array;
- Sequenciar as regiões flangeadoras dos pontos de quebra pela metodologia do "mate-pair sequencing";
- Realizar a correlação cariótipo-genótipo-fenótipo dos casos em questão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quebra de confidencialidade, para diminuir esse risco, alguns cuidados serão tomados: Todas as amostras utilizadas nessa pesquisa serão codificadas, preservando assim, o sigilo e privacidade dos voluntários, cujo os dados serão estudados (informações de prontuários, fichas, etc e/ou materiais biológicos), sendo as informações utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão. Além disso, será assegurado que os resultados da pesquisa somente sejam divulgados de forma anônima, não usando iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o voluntário da pesquisa. Risco de pequeno hematoma pela coleta de sangue que será realizada, mas todas as medidas serão tomadas para minimizar este risco

Benefícios:

Aprimoramento do diagnóstico genético de condições clínicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem estruturada e sem problema ético

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 4.307.661

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisadores anexaram todos os documentos de apresentação obrigatória a plataforma Brasil

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências e recomendações foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1588039.pdf	29/09/2020 10:54:41		Aceito
Outros	Nova_respostaparecer.pdf	23/09/2020 15:09:07	Elenice Ferreira Bastos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Modificado2.pdf	23/09/2020 15:08:21	Elenice Ferreira Bastos	Aceito
Outros	Carta_DepPesquisa.pdf	09/09/2020 12:33:35	INGRID BENDAS FERES LIMA	Aceito
Outros	Carta_Chefia.pdf	09/09/2020 12:33:16	INGRID BENDAS FERES LIMA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_ingrid.pdf	29/07/2020 14:27:40	Elenice Ferreira Bastos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_plataformabrasil.pdf	28/07/2020 15:35:34	INGRID BENDAS FERES LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: RUI BARBOSA, 716
 Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2554-1730 Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 4.307.661

RIO DE JANEIRO, 29 de Setembro de 2020

Assinado por:
Saint Clair Gomes Junior
(Coordenador(a))

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br