

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 09/11/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM PACIENTES COM MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS

JAKELINE SANTOS OLIVEIRA

BOTUCATU-SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÔMICAS EM PACIENTES COM MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS

Mestranda: Jakeline Santos oliveira

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Co-orientadora: Dra. Deise Helena de Souza

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Câmpus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu-São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Jakeline Santos.

Determinação das alterações genômicas em pacientes com malformações congênitas / Jakeline Santos Oliveira. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira

Coorientador: Deise Helena de Souza

Capes: 20205007

1. Cromossomos humanos - Análise. 2. Anomalias humanas. 3. Incapacidade intelectual. 4. Citogenética. 5. Híbridização genética.

Palavras-chave: Alterações cromossômicas; anomalias congênitas; array-CGH; atraso do desenvolvimento ; deficiência intelectual.

“Ninguém nasce feito, é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos.”

Paulo Freire

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Unesp *campus* de Botucatu-SP, pela estrutura de ensino e todo seu corpo docente e funcionário;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES- pela bolsa concessão da bolsa de metrado;

Ao Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira pela orientação recebida;

À Dra. Deise Helena de Souza pela coorientação e o preparo do material do cariótipo e FISH.

À Dra. Sarah H. Elsea pela colaboração e apoio para a realização do trabalho.

À Dra. Lucia Regina Martelli pelo apoio e colaboração para a realização do trabalho.

À Msc. Tatiana Joaquim Mozer por me receber com todo carinho e pelo suporte para a realização da técnica de *array*-CGH.

Aos pacientes e seus familiares, por aceitarem participar deste estudo.

À Profa. Dra. Claudia Aparecida Rainho, Profa. Dra. Daisy Maria Favero Salvadori e Prof. Dr. Danillo Pinhal pelas orientações durante a qualificação desta dissertação.

À seção de Pós-Graduação e seus funcionários pela dedicação e apoio nos tramites acadêmicos e burocráticos.

À todos os colegas e funcionários do Serviço de Aconselhamento Genético do departamento de Genética-IBB/Unesp.

Aos meus familiares, especialmente meus pais Gildásio e Eliane, minha filha Maria Liz, meu companheiro Rômulo Pedro e minha prima e amiga Aline por todo carinho, dedicação e suporte para a realização do meu mestrado, sem vocês não sou nada.

Aos meus amigos de pós-graduação pelas horas de descontração e por ser minha família aqui no estado de São Paulo.

À todos que ajudaram de alguma forma este trabalho;

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
1.1. Diagnóstico de Desequilíbrio Genômicos	15
1.1.1. Citogenética clássica e molecular.....	15
1.1.2. Citogenômica (<i>array</i> -CGH).....	16
1.2.1. Desequilíbrio genômico: Anomalias cromossômicas.....	19
1.2.2. Cromossomos marcadores e mosaicismos	20
1.3. Variação Estrutural Genômica: <i>Copy number variants</i> - CNVs.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Geral.....	23
2.2. Específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Casuística	24
3.2. Ética.....	24
3.3. Avaliação clínica	24
3.4. Análise citogenética e molecular.....	25
3.4.1. Cultura temporária de linfócitos periféricos	25
3.4.2. Coloração e bandamento.....	25
3.4.3. Bandamento G (GTG).....	25
3.4.4. Técnica de Hibridização <i>in situ</i> Fluorescência (FISH).....	26
3.4.5. Extração de DNA	26
3.5. Análise citogenômica	26
3.5.1. <i>array</i> -CGH.....	26
3.6. Análise de Bioinformática.....	28
4. RESULTADOS.....	30
4.1. Artigo científico 01	30
4.2. Artigo científico 02	47
4.3. Artigo científico 03	63
5. CONCLUSÃO	86

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
7. ANEXOS.....	90
7.1. Anexo A: TCLE.....	90
7.2. Anexo B: Termo de consentimento para publicação científica	92
7.3. Anexo C: Aprovação CEP-FMB/UNESP.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACs	Aberrações cromossômicas
ADNPM	Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor
ALG10	alpha-1,2-glucosyltransferase
Alu	Elementos Repetitivos
<i>array</i> CGH	Microarray-based Comparative Genomic Hybridization
<i>array</i> -SNP	Single Nucleotide Polymorphism array
ATF7IP	activating transcription factor 7 interacting protein
BACs	Bacterial artificial chromosome
CGH	Hibridização Genômica Comparativa
CNVs	Variações no Número de Cópias
DECIPHER	Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources
del	deleção
DGV	Database Genomic Variation
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNM1L	dynamin 1 like
DSB	Double Strand Breaks
dup	duplicação
EAPP	E2F associated phosphoprotein
ECARUCA	European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
GRIN2B	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B
GTG	Bandamento de Alta Resolução
HPE	Holoprosencefalia
IMPG1	interphotoreceptor matrix proteoglycan 1
ISCN	An International System for Human Cytogenetic Nomenclature

Kb	Kilo base
LOH	Perda de heterozigosidade
mar	Marcador
Mb	Mega base
MCs	Malformações congênitas
MMEJ	Microhomology-Mediated Repair
Mos	mosaicismo
MYO6	myosin VI
NAHR	Nonallelic Homologous Recombination
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NKX2	NK2 homeobox 1
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACs	Pl-Based Artificial Chromosomes
pb	Pares de base
PGM3	phosphoglucomutase 3
PIANP	PILR alpha associated neural protein
PIK3C2G gamma	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2
PKP2	plakophilin 2
PKS	Síndrome Pallister-Killian
RNA	Ácido ribonucleico
SAG	Serviço de Aconselhamento Genético
SCNN1A	sodium channel epithelial 1 alpha subunit
SKY	Cariotipagem Spectral
SNPs	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SNVs	Variação de Nucleotídeo Único
SNX6	sorting nexin 6
SOX5	SRY-box 5
sSMCs	Pequenos Cromossomos Marcadores Supernumerários
STS	steroid sulfatase

SVAS	Estenose Aórtica Supravalvular
SWB	Síndrome de William-Beuren
SYT10	synaptotagmin 10
TULIP1	Ral GTPase activating protein catalytic alpha subunit 1
UPD	Dissomia Uniparental
VCX3A	variable charge X-linked 3A
VOUS	Variante de Significância Incerta

Determinação das alterações genômicas em pacientes com malformações congênitas

RESUMO

As ACs são alterações visíveis nos cromossomos, classificadas como numéricas e estruturais. Atualmente o grande desafio da genética clínica é classificar e associar a relevância clínica dos desequilíbrios genéticos ao fenótipo dos portadores. O trabalho tem como objetivo principal caracterizar desequilíbrio genômico sem diagnóstico sindrômico previamente descritos pelas técnicas de citogenética clássica, molecular visando apurar os pontos de quebras e genes inseridos na região cromossômica alterada por meio da citogenômica em estudos de casos. Foram feitas análises por citogenética (bandamento GTG), citogenética molecular (FISH) e citogenômica (array-CGH) em três pacientes com malformações congênitas não-sindrômicas para definição diagnóstica e maior conhecimento sobre a correlação genótipo-fenótipo. Foram redigidos estudos de casos de três pacientes portadores de MCs, atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual. O primeiro copilado de caso trata-se de paciente do sexo feminino com anomalias esqueléticas, deficiência intelectual e atraso do desenvolvimento. O cariótipo da paciente é 46,XX[11]/47,XX,+mar[9]. A análise de array-CGH revelou dois ganhos/duplicações nas bandas cromossômicas 6p11.2q12 (10.335 Mb de tamanho) e 6q14.1q14.3 (10.765 Mb de tamanho). Por meio da técnica da FISH e os resultados do array-CGH a região duplicada 6q14.1q14.3 encontra-se inserida em um cromossomo marcador, oriundo do cromossomo 6. Os sinais clínicos descritos na paciente foram semelhantes a outros pacientes com duplicação da região 6q14. Os genes PGM3, MYO6 e IMPG1 foram associados a alterações sensoriais, imunodeficiência e cardiomiopatia hipertrófica. Poucos são os casos na literatura com pacientes descritos com duplicação envolvendo as regiões 6q11-6q16. O segundo copilado de caso trata-se de paciente do sexo feminino com dimorfismo fácil, atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual. O cariótipo apresentou o resultado: 46,XX, dup(12)(p13.1-p11.2). Por meio da técnica de array-CGH foi detectado o ganho genético de aproximadamente 28 Mb na região cromossômica 12p13.31-p11.1. A alteração cromossômica observada na paciente é descrita como duplicação 12p parcial. Os genes GRIN2B, ATF7IP, ALG10, SYT10, DNM1L, PKP2, PIK3C2G, SCNN1A, PIANP e SOX5 foram sobrepostos a CNVs de ganho, classificadas como patogênicos correlacionadas aos fenótipos de face dismórfica, convulsões, disfunção cognitiva e distúrbios do neurodesenvolvimento. A alteração presente na paciente é similar aos sinais clínicos descritos em indivíduos na literatura. O terceiro copilado de caso trata-se de paciente do sexo feminino com hemiface, incisivo central único, deficiência intelectual, atraso do desenvolvimento e deficiência na fala. O cariótipo apresentou o resultado: 46,XX, t(1;14)(p36.2;q23). A translocação aparentemente equilibrada t(1;14) presente na paciente e do tipo de novo, com pouco casos recorrentes na literatura. Por meio da técnica de array-CGH foram caracterizadas duas perdas/deleções cromossômicas, nas regiões cromossômicas 14q13.1-q13.3 (2,1 Mb de tamanho) e Xp22.31 (1,7 Mb de tamanho). A deleção da região cromossômica 14q13 é descrita como menor região sobreposta (SRO) ao locus HPE8 para o espectro de holoprosencefalia (HPE). Os genes EAPP, SNX6, TULIP1 e NKX2, são descritos na literatura como potenciais genes candidatos a HPE e doenças neurológicas. A microdeleção da região cromossômica Xp22.1 apresenta os genes VCX3A e STS

descritos na literatura alterados em doenças neurológicas. Os sinais clínicos presentes em nossa paciente em similaridade com os descritos na literatura e alteração nas bandas cromossômicas 14q13.1-q13.3 permitem associação com a microforma de HPE. No geral, a técnica de array-CGH que dispõem de resoluções a nível de kb, foi fundamental para a elucidação dos achados genômicos em todos os pacientes. Este estudo contribui com a correlação genótipo-fenótipo e consequentemente com a literatura científica a respeito das alterações cromossômicas não sindrômicas descritas nos compilados de caso.

Palavras-Chaves: Alterações cromossômicas, *array*-CGH, anomalias congênitas, deficiência intelectual, atraso do desenvolvimento

Determination of genomic changes in patients with congenital malformations

ABSTRACT

The ACs are visible changes in the chromosomes, classified as numerical and structural. Currently the great challenge of clinical genetics is to classify and associate the clinical relevance of genetic imbalances with the phenotype of the carriers. The main objective of this work is to characterize genomic imbalance without syndromic diagnosis previously described by the classical and molecular cytogenetic techniques, in order to determine the breakpoints and genes inserted in the chromosomal region altered by cytogenetics in case studies. Cytogenetics (GTG banding), molecular cytogenetics (FISH) and cytogenetics (array-CGH) were performed in three patients with non-syndromic congenital malformations for diagnostic definition and greater knowledge on genotype-phenotype correlation. Case studies of three patients with MCs, developmental delay and intellectual disability were written. The first case file is a female patient with skeletal anomalies, intellectual disability and developmental delay. The patient's karyotype is 46, XX [11] / 47, XX, + sea [9]. The array-CGH analysis revealed two gains / doublings in the chromosomal bands 6p11.2q12 (10,335 Mb in size) and 6q14.1q14.3 (10,765 Mb in size). Through the FISH technique and the results of the array-CGH the duplicate region 6q14.1q14.3 is inserted in a chromosome marker, coming from chromosome 6. The clinical signs described in the patient were similar to other patients with duplication of the region 6q14. The genes PGM3, MYO6 and IMPG1 were associated with sensory alterations, immunodeficiency and hypertrophic cardiomyopathy. There are few cases in the literature with patients described with duplication involving the 6q11-6q16 regions. The second case file is a female patient with easy dimorphism, developmental delay and intellectual disability. The karyotype presented the result: 46, XX, dup (12) (p13.1-p11.2). Using the array-CGH technique, the genetic gain of approximately 28 Mb was detected in the chromosomal region 12p13.31-p11.1. The chromosomal abnormality observed in the patient is described as partial duplication. The genes GRIN2B, ATF7IP, ALG10, SYT10, DNM1L, PKP2, PIK3C2G, SCNN1A, PIANP and SOX5 were superimposed on gain CNVs, classified as pathogenic correlated to dysmorphic face phenotypes, convulsions, cognitive dysfunction and neurodevelopmental disorders. The present alteration in the patient is similar to the clinical signs described in individuals in the literature. The third case file is a female patient with hemiface, single central incisor, intellectual disability, developmental delay and speech deficiency. The karyotype presented the result: 46, XX, t (1; 14) (p36.2; q23). The apparently balanced translocation t (1; 14) present in the patient is of the new type, with few recurrent cases in the literature. By means of the array-CGH technique, two losses / chromosomal deletions were characterized, in the chromosomal regions 14q13.1-q13.3 (2.1 Mb in size) and Xp22.31 (1,7 Mb in size). The deletion of the 14q13 chromosomal region is described as a reduced overlap region (ORS) at the HPE8 locus for the holoprosencephaly (HPE) spectrum. EAPP, SNX6, TULIP1 and NKX2 genes are described in the literature as potential candidate genes for HPEs and neurological diseases. The microdeletion of chromosomal region Xp22.1 presents the genes VCX3A and STS described in the literature altered in neurological diseases. The clinical signs present in our patient in similarity to those described in the literature and alteration in the

14q13.1-q13.3 chromosomal bands allow association with the microform of HPE. In general, the array-CGH technique that has resolutions at kb level was fundamental for the elucidation of genomic findings in all patients. This study contributes to the genotype-phenotype correlation and consequently to the scientific literature regarding the non-syndromic chromosomal changes described in the case files.

Keywords: Chromosomal alterations, array-CGH, congenital anomalies, intellectual deficiency, developmental delay

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Diagnóstico de Desequilíbrio Genômicos

1.1.1. Citogenética clássica e molecular

Desde as primeiras observações microscópicas de cromossomos mitóticos em humanos - no final dos anos 1800 - a citogenética passou por grandes desenvolvimentos na análise e classificação dos cromossomos (MARTIN; WARBURTON, 2015). Dentre os principais marcos na citogenética, destaca-se o uso da colchicina, solução hipotônica e a cultura celular por meio de sangue periférico (SEABRIGHT, 1971; YUNIS, 1976). Além do desenvolvimento de métodos para a visualização dos padrões de bandas nos cromossomos, a exemplo o bandamento G, técnica baseada na aplicação de tripsina utilizando a coloração com giemsa e o método de bandamento por alta resolução (GTG), o qual utiliza cromossomos em prometáfase, permitindo a fácil identificação de anomalias citogenéticas. Ambas as técnicas são utilizadas até hoje na rotina de laboratórios de citogenética (RIEGEL, 2014; SEABRIGHT, 1971; YUNIS, 1976).

No entanto, o padrão de bandamento dessas diferentes técnicas, limita-se a resolução de 400-550-850 bandas, que permitem a identificação de rearranjos cromossômicos estruturais de 3 até 10 Mb, além das limitações quanto a qualidade das metáfases preparadas, as características ópticas do microscópio e a experiência do profissional na execução das técnicas (RIEGEL, 2014).

A citogenética molecular, foi estabelecida no final da década de 1980 pela técnica da Hibridização *in situ* por Fluorescência (do inglês *Fluorescence in situ Hybridization-FISH*), permitindo a identificação e a elucidação de rearranjos cromossômicos em resoluções de 100 Kb a 5 Mb (CUI; SHU; LI, 2016). O princípio da técnica da FISH se baseia na hibridização do DNA alvo (cromossomos metafásicos e/ou núcleos interfásicos) com sondas de DNA ou RNA específicas para certas regiões cromossômicas marcadas com fluorocromo (DUARTE, 2013).

A sonda DNA/RNA deve ser marcada com um nucleotídeo conjugada ao fluorocromo (marcação direta) e/ou a inclusão de um nucleotídeo a um hapteno não fluorescente (marcação indireta). Preferencialmente, antes da hibridização, a suspensão contendo os cromossomos em metáfase ou núcleos interfásicos são enzimaticamente pré-tratados, para aumentar o suporte à acessibilidade da sonda e a redução da quantidade de

citoplasma, sendo então realizada a desnaturação e hibridização da sonda com a sequência alvo (RIEGEL, 2014; MARTIN; WARBURTON, 2015).

Diversos tipos de sondas da FISH, como sondas de sequências únicas (*locus*-específicas), sondas centroméricas (α -Satélites), sondas satélites (β -Satélites), sondas subteloméricas, sondas de “pintura” cromossômica e sondas que marcam todo o cromossomo são utilizadas nas análises cromossômicas para a detecção de microdeleções e microduplicações, diagnóstico pré-natal rápido, rearranjos crípticos complexos e para a identificação de material cromossômico de origem desconhecida (MCNEIL; RIED, 2008).

Por meio da técnica da FISH foram possíveis os diagnósticos pré-natal e pós-natal de alterações cromossômicas submicroscópicas, identificação de CNVs, identificação e monitoramento de anomalias cromossômicas em câncer e identificação de doenças ocasionadas por infecção microbiana e parasita (CUI; SHU; LI, 2016).

Novos avanços da técnica da FISH foram propostos, a exemplo da Cariotipagem Spectral (do inglês *Spectral Karyotyping*- SKY), possibilitando em apenas uma análise a marcação de cada par cromossômico com espectro de cor diferente, utilizando diversas combinações e proporções de fluorocromos (MCNEIL & RIED, 2008).

1.1.2. Citogenômica (*array*-CGH)

A nova percepção da citogenética é a varredura de todo o genoma humano para a investigação de perdas e ganhos de material genômico devido ao desenvolvimento da técnica de Hibridização Genômica Comparativa (do inglês *Comparative Genomic Hybridization* - CGH) pelos pesquisadores Kallioniemi et al. (1992), que inicialmente desenvolveram a técnica direcionada à comparação entre as células cancerígenas de tumores sólidos e células normais, mediante a investigação de alterações genômica e estrutural (do inglês *Copy number variants* – CNVs) (KALLIONIEMI et al., 1992; TRASK; CANCER, 2002).

No entanto, a abordagem da técnica de CGH também pode detectar inequivocamente ganho/duplicação e perda/deleção em alterações cromossômicas desequilibradas por meio do DNA das amostras ao invés de preparação de metáfases cromossômicas, permitindo a aplicação em laboratórios de genética clínica (BRYNDORF et al., 1995).

No ano de 1997 foram desenvolvidas abordagens de micro-arranjos (do inglês *Chromosomal Microarray Analysis* - CMA) ou *array*-CGH (*aCGH*), baseando em matriz

por chips que substituem os cromossomos em metáfases por sequências de DNA, construídas a partir de milhares de clones de *Bacterial artificial chromosome* (BACs), *Pl- Based Artificial Chromosomes* (PACs) ou oligonucleotídeos que cobrem todo o genoma humano, aderidas em lâminas de vidro, permitindo o aumento da resolução para a detecção de alterações de CNVs e a viabilização de informações mais detalhadas sobre ganhos/duplicações e perdas/deleções genômicas (Figura 1) (SOLINAS-TOLDO et al., 1997). As primícias do *array*-CGH são essencialmente as mesmas do CGH, contudo houve a melhoria do aumento da resolução capaz de alcançar alterações genômicas de até 75 kb em comparação ao CGH, que alcançava resolução de aproximadamente 3-5 Mb (RIEGEL, 2014; SOLINAS-TOLDO et al., 1997).

A partir de então, diversas empresas comercializam a técnica de *array*-CGH em diferentes plataformas e lâminas/*Chips* que dispõem de maiores resoluções (a nível de kb), possibilitando elevada taxa de detecção de alterações genômicas (a depender da distância das sondas inseridas na lâmina) (SIGGBERG et al., 2012).

Dentre as diferentes plataformas, o *array*-SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism array*) foi submetida a grandes avanços nos últimos anos. Atualmente, houve um aumento na resolução da informação gerada devido a incorporação de milhares de SNPs (sondas de oligonucleotídeos), por meio de estudos de grandes escalas como o Projeto HapMap (*The International HapMap Consortium*, 2003) e o Projeto 1000 Genomes (LE SCOUARNEC; GRIBBLE, 2012). O *array*-SNP começou a ser usado progressivamente em estudos de genotipagem e na detecção de rearranjos genômicos de deleção/duplicação, além da indicação de mosaicismos, regiões extensas de perda de heterozigotidade (LOH), dissomia uniparental (UPD), informações sobre CNVs e determinação da origem parental de novas CNVs em trio amostral (CONLIN et al., 2010).

A limitação do *array*-CGH e *array*-SNP é a incapacidade de identificar alterações cromossômicas equilibradas, como translocações e inversões, além de serem técnicas de custo financeiro relativamente alto e laborioso (RIEGEL, 2014).

A interpretação dos resultados do *array*-CGH representa grandes desafios para o diagnóstico, devido a elevada quantidade de informação genômica gerada e a necessidade de plataformas de bioinformática no processamento dessas informações (SANLAVILLE et al., 2005; WRIGHT et al., 2016).

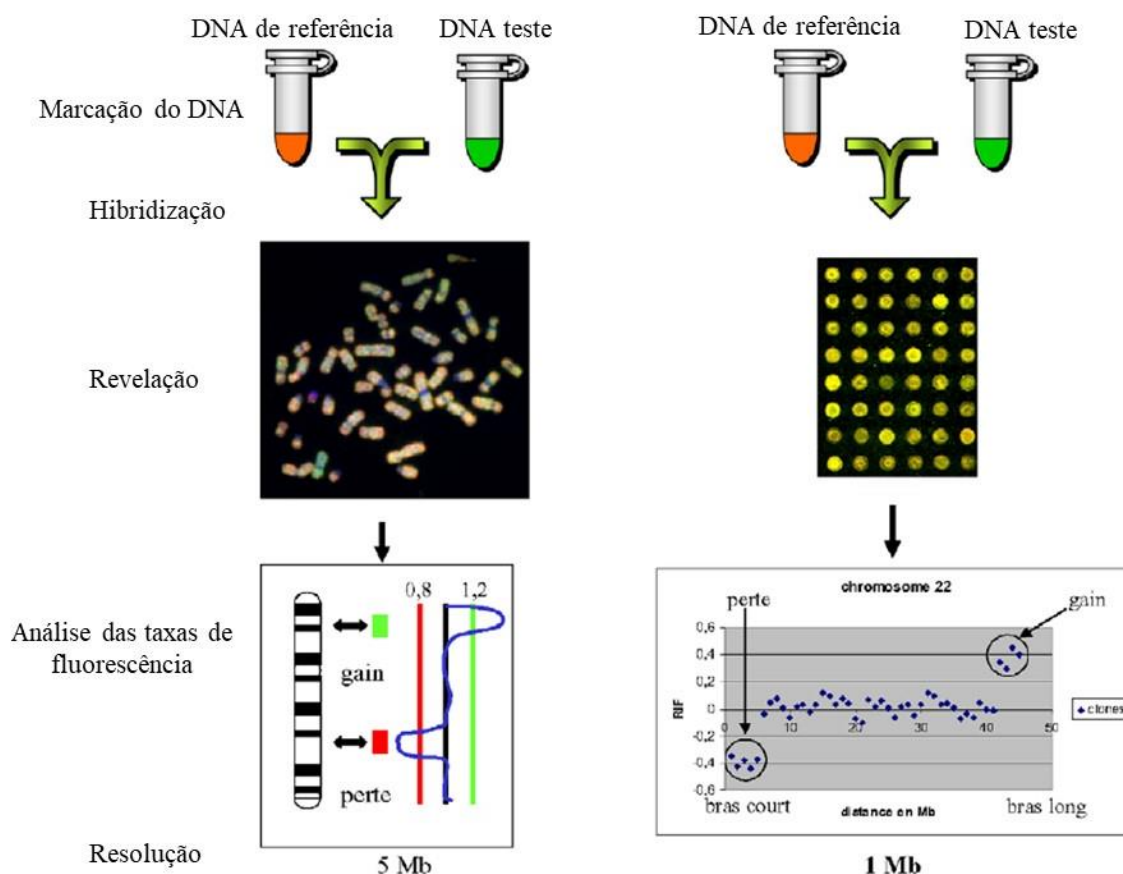


Figura 1: Comparação entre as técnicas de CGH (à esquerda) e *array*-CGH (à direita). Em ambas as técnicas o DNA de um paciente (DNA teste) é rotulado com um fluorocromo emissor de fluorescência em verde e o DNA de uma amostra normal (DNA de referência) é rotulado com um fluorocromo que emite fluorescência em vermelho. Esses dois DNAs serão convertidos em cromossomos em CGH e em uma matriz de fragmentos de DNA (sondas) em *array*-CGH. A fluorescência é capturada usando uma câmera de captura de imagens em CGH e em *array*-CGH por meio de uma scanner e *software* específico para o cálculo da quantidade do índice de fluorescência emitida entre os dois DNAs, representando os resultados de forma gráfica. Em CGH a intensidade de fluorescência vermelha e verde são medidas ao longo do cromossomo, calculando a razão com base no coeficiente de intensidade verde/vermelho, obtendo-se assim um perfil para cada cromossomo a partir da comparação de um ideograma que permite a localização citogenética da alteração cromossômica. No *array*-CGH cada ponto corresponde a uma sonda de fragmento de DNA fixado em uma matriz no chip conforme a posição cromossômica no genoma. A razão de fluorescência é representada por coordenadas, normalmente a razão para tanto o DNA marcado em verde quanto o DNA marcado em vermelho é próxima de 1. A representação gráfica utiliza-se de log de 2 igual a 0. Se essa razão for inferior a -0,3 houve uma perda/deleção, se a razão for maior que +0,3 houve um ganho/duplicação. Aqui é representado um perfil obtido em um paciente com perda proximal de 22q e um ganho distal 22q (adaptado de acordo SANLAVILLE et al., 2005).

1.2. Desequilíbrio genômico na etiologia das malformações Congênitas

Malformações congênitas (MCs), anomalias congênitas ou defeitos congênitos são defeitos de morfogênese de órgãos ou distritos corporais, identificados no nascimento (CORSELLO; GIUFFRÈ, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (do inglês *World Health Organization*- WHO), estima-se que cerca de 303.000 recém-nascidos morram dentro de 4 semanas de vida a cada ano em todo o mundo devido à MCs. No Brasil em 2010 foram registrados como portadores de MCs 0,8% dos nascidos vivos, sendo que as MCs mais frequentes são as relacionadas ao aparelho osteomuscular, do sistema nervoso e dos órgãos genitais (BRASIL, 2010).

As MCs constituem biologicamente um grupo heterogêneo de distúrbios do desenvolvimento embrio-fetal. Aproximadamente 0,06% das MCs envolvem anomalias cromossômicas, sendo estas as principais causas de deficiência intelectual e/ou atraso do desenvolvimento (KUMAR et al., 2010; NICOLA et al., 2010; QUEIROZ et al., 2015).

1.2.1. Desequilíbrio genômico: Anomalias cromossômicas

As anomalias cromossômicas ou alterações cromossômicas (ACs) compreendem a categoria de doenças genéticas em que há alterações numérica e estrutural dos cromossomos em relação ao cariótipo normal da espécie humana (KUMAR, 2008; MOORE; BEST, 2001). A incidência global das ACs é de aproximadamente 1 em 154 nascidos vivos, e o impacto na medicina clínica e para a sociedade é dito como substancial (THOMPSON & THOMPSON, 2018).

ACs estruturais (rearranjos envolvendo um ou mais cromossomos) são relativamente comuns. Dependendo do rearranjo cromossômico estrutural poderá levar ou não a desequilíbrio genômico e consequentemente podem ter ou não ter efeito fenotípico (MOORE; BEST, 2001). Os rearranjos estruturais são classificados como balanceados (translocações e inversões), se o genoma tiver o complemento normal de material cromossômico ou desbalanceados (deleções e duplicações), se houver material ausente ou adicional (Figura 2) (THOMPSON & THOMPSON, 2018).

Geralmente, as ACs são identificadas em crianças que apresentam sinais clínicos como MCs e/ou atraso do desenvolvimento e/ou deficiência mental e em casais com recorrentes abortos espontâneos (SHAFFER; LUPSKI, 2000).

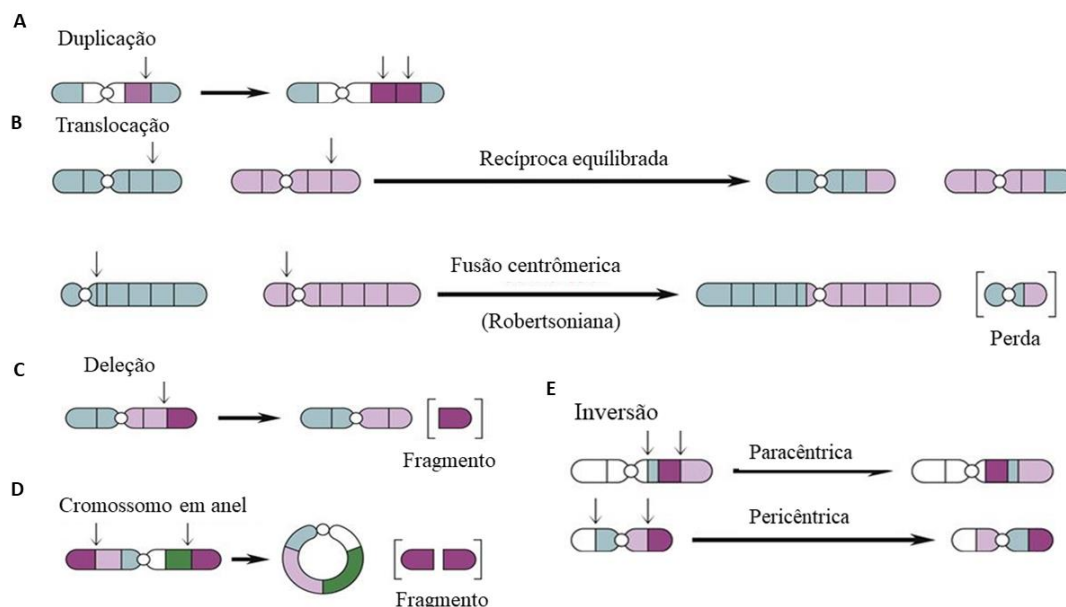


Figura 1: Ilustração geral dos tipos de rearranjos cromossômicos estruturais. A: duplicação de fragmento cromossômico. B: translocações cromossômicas, do tipo recíproca e robertsoniana. C: deleções de fragmentos cromossômicos. D: formação do cromossomo em anel, e perda de fragmentos cromossômicos. E: Inversões cromossômicas. Paracêntricas quando não envolve o centrômero. Pericêntrica quando a inversão envolve o centrômero (adaptado por Kumar et al., 2010).

1.2.2. Cromossomos marcadores e mosaïcismo

Os cromossomos marcadores, também conhecidos como pequenos cromossomos marcadores supernumerários (sSMCs), são cromossomos estruturalmente anormais que não podem ser identificados ou caracterizados pela citogenética convencional, sendo então necessário a sua caracterização por técnicas citogenéticas moleculares (LIEHR; CLAUSSEN; STARKE, 2004; JANG et al., 2016).

São classificados morfológicamente como cromossomos diminutos, com anel, isômero ou duplicação-invertida de cromossomos derivados. Muitos sSMCs são oriundos de um único cromossomo, sendo os mais comuns derivados dos cromossomos X, 15 e 22 (BARTSCH et al., 2005).

Os sSMCs podem ser derivados de qualquer cromossomo humano, cerca de aproximadamente 70% dos pacientes apresentam fenótipo clínico normal, sem o desenvolvimento de qualquer doença genética decorrente da presença do sSMCs, enquanto que aproximadamente 30% dos casos com sSMCs apresentam características

clínicas como alteração no padrão de crescimento e desenvolvimento, assim como problemas intelectuais (OU et al., 2013).

Os sSMCs podem apresentar um padrão com mosaïcismo somático. Em indivíduos portadores de cariótipo 47,+mar, o mosaïcismo 47,+mar/46 está presente em 52% dos casos, excluindo síndromes relacionadas com o sSMCs (síndrome Pallister-Killian - PKS (OMIM: 601803)) (CUI; SHU; LI, 2016; OU et al., 2013). Os sSMCs podem estar presentes em diferentes taxas de mosaïcismo e, dependendo do tecido analisado, poderá apresentar frequência em 5% das células. O mosaïcismo somático e sSMC não possuem impacto clínico direto nos indivíduos portadores, no entanto poderá ser importante e informativo para o aconselhamento genético pré-natal (CUI; SHU; LI, 2016).

1.3. Variação Estrutural Genômica: *Copy number variants* - CNVs

As variantes estruturais são definidas como alterações genômicas maiores que 10.000 pb de comprimento. São classificadas como a Variação do Número de Cópias (do inglês *Copy number variants* - CNVs) e a Variação de Nucleotídeo Único (do inglês *Single Nucleotide Variation*-SNVs) (CARVALHO; LUPSKI, 2016; WEISCHENFELDT et al., 2013).

As CNVs são alterações no número de cópias de um *locus* diferenciado do estado diplóide normal, advindo da perda/deleções ou de ganhos/duplicações. Cerca de 240 Mb do genoma humano refere-se às CNVs (CHOY et al., 2010). As CNVs foram descobertas por Iafrate et al. (2004) e Sebat et al. (2004), usando abordagens independentes, após a conclusão do projeto de mapeamento do Genoma Humano. A variabilidade em humanos contribuída pelas CNVs está entre 0,12% a 7,3%, as quais desempenham papéis cruciais na expressão de genes e, cerca de, 41% delas sobrepõem a genes conhecidos (CHOY et al., 2010).

A interpretação e classificação das CNVs são baseadas na distinção de ganhos/duplicação e perdas/deleção de variações genômicas, uma vez que as consequências clínicas potenciais diferem significativamente (DE LEEUW et al., 2012). São consideradas benignas CNVs que apresentam variação genômica normal. Já CNVs de relevância clínica incertas são classificadas como VOUS (Variante de significância incerta) (DE LEEUW et al., 2012). As CNVs clinicamente relevantes são classificadas como variantes patogênicas, devido a produtos de rearranjos genômicos preferenciais em

loci de genes sensíveis a alterações na dosagem gênica (CARVALHO & LUPSKI, 2016). O atual cenário é elevar o conhecimento sobre as CNVs a medida que novos estudos surgem esclarecendo os efeitos causais no fenótipo de determinados indivíduos por meio de cadastro dessas variantes em repositório de banco de dados *onlines*, auxiliando na interpretação e classificação das CNVs (KU et al., 2010).

Os repositórios de bancos de dados públicos *onlines* oferecem fontes valiosas para a orientação do genoma são: navegadores do genoma humano como UCSC *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>); Ensembl *Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>); Bancos de dados específicos de coletas de casos individuais e de informações de controle sobre a correlação genótipo-fenótipo, como o banco de dados de Variação Genômica (do inglês *Database Genomic Variation* – DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), o DECIPHER (do inglês *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources*) (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) e *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations*- ECARUCA (<http://ecaruca.radboudumc.nl:8080/ecaruca/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e *Online Mendelian Inheritance in Man* - OMIM (<http://omim.org/>) (DE LEEUW et al., 2012).

Por meio da associação da técnica de *array*-CGH com os repositórios de bancos de dados *onlines*, além do uso das técnicas de citogenéticas e FISH, é possível a caracterização do desequilíbrio genômico, em pacientes portadores de malformações congênitas, atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual, possibilitando a correlação genética-clínica e consequentemente a elucidação do diagnóstico (WRIGHT et al., 2016).

Desta forma, o presente estudo visa caracterizar desequilíbrio genômico não sindrômicas, poucos incidentes na literatura científica, por técnicas de citogenética clássica (bandamento GTG), citogenética molecular (FISH) e citogenômica (*array*-CGH), na tentativa de estabelecer a correlação genótipo-fenótipo e o diagnóstico desses achados, além de direcionar o aconselhamento genético para o risco de recorrência destas alterações cromossômicas às famílias.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, em revisão ou enviados para publicação concluímos que:

- A implementação do *array*-CGH como teste genético em pacientes portadores de MCs, deficiência intelectual, atraso do desenvolvimento e características dismórficas tem possibilitado o diagnóstico com maior precisão do que as demais técnicas citogenéticas, bem como a identificação de novas síndromes de microduplicações e microdeleções.
- A caracterização de genes inseridos nas regiões alteradas possibilitou a correlação genótipo-fenótipo dos três copilados de casos com genes inseridos em diferentes regiões cromossômicas, envolvidos em doenças do neurodesenvolvimento, imunodeficiência, dismorfismo facial e doenças cardíacas. Assim como as informações geradas pelas técnicas e interpretações dos resultados comparados com pacientes similares disponíveis em repositórios de bancos de dados *onlines*, permitiram correlacionar com CNVs classificadas como patogênicas sobrepostas a tais genes;
- As alterações cromossômicas descritas nos três copilados de caso são poucos incidentes na literatura científica, uma vez que a duplicação 6q apresenta pouco mais de 6 casos descritos, a trissomia 12p cerca de 40 casos descritos e a deleção na região 14q13 pouco mais de 10 casos na literatura. Assim, o trabalho contribui para o conhecimento científico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTSCH, O. et al. Forty-two supernumerary marker chromosomes (SMCs) in 43 273 prenatal samples: Chromosomal distribution, clinical findings, and UPD studies. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, n. 11, p. 1192–1204, 2005.

BRASIL. DATASUS. Sistema de informação sobre nascidos vivos (Sinasc). Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php?area=0205&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nv>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

BRYNDORF, T. et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. **American journal of human genetics**, v. 57, n. 5, p. 1211–20, 1995.

CARVALHO, C. M. B.; LUPSKI, J. R. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. **Nature Publishing Group**, 2016.

CHOY, K. W. et al. The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 117, n. 4, p. 391–398, 2010.

CONLIN, L. K. et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 7, p. 1263–1275, 2010.

CORSELLO, G.; GIUFFRÈ, M. Congenital malformations. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 25–29, 2012.

CUI, C.; SHU, W.; LI, P. Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. September, p. 1–11, 2016.

DE LEEUW, N. et al. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. **Human Mutation**, v. 33, n. 6, p. 930–940, 2012.

DUARTE, S. J. A. Citogenômica Aplicada à Prática Médica. **Editora: Leslie Domenici Kulikowski**. Ano: 2013.

KALLIONIEMI, A. et al. Cytogenetic Analysis. **Science**, v. 258, n. 5083, p. 818–820, 1992.

KU, C. S. et al. The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future. **Journal of human genetics**, v. 55, n. 7, p. 403–15, 2010.

KUMAR, D. Disorders of the genome architecture: a review. **Genomic medicine**, v. 2, n. 3–4, p. 69–76, 2008.

KUMAR V et al: **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**, ed 8, Philadelphia: Saunders, 2010.

JANG, W., et al. Identification of small marker chromosomes using microarray comparative genomic hybridization and multicolor fluorescent in situ hybridization. **Molecular Cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. no pagination, 2016.

- LE SCOUARNEC, S.; GRIBBLE, S. M. Characterising chromosome rearrangements: Recent technical advances in molecular cytogenetics. **Heredity**, v. 108, n. 1, p. 75–85, 2012.
- LIEHR, T.; CLAUSSEN, U.; STARKE, H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 107, n. 1–2, p. 55–67, 2004.
- MARTIN, C. L.; WARBURTON, D. Detection of Chromosomal Aberrations in Clinical Practice: From Karyotype to Genome Sequence. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 16, n. 1, p. 309–326, 2015.
- MCNEIL, N.; RIED, T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements : technology and applications in molecular medicine. n. September 2000, p. 1–14, 2008.
- MOORE, C. M.; BEST, R. G. Chromosomal Genetic Disease: Structural Aberrations. **Encyclopedia of Life Sciences**, v. 1, p. 1–8, 2001.
- NICOLA, P. D. R. DE et al. A utilização da Internet na notificacao dos defeitos congenitos na Declaracao de Nascido Vivo em quatro maternidades publicas do municipio de Sao Paulo, Brasil. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 7, p. 1383–1390, 2010.
- OU, J. et al. Characterization of three small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal MedicineOnline) Journal The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 26, n. 261, p. 1476–7058, 2013.
- QUEIROZ, C. et al. Prevalência de nascidos vivos com anomalias congênitas no município de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Enferm. Ped.**, p. 7–12, 2015.
- RIEGEL, M. Human molecular cytogenetics : From cells to nucleotides. v. 1, p. 194–209, 2014.
- SANLAVILLE, D. et al. La CGH microarray : principe et applications en pathologie constitutionnelle Microarray CGH : principle and use for constitutional disorders. v. 12, p. 1515–1520, 2005.
- SEABRIGHT, M. a Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. **The Lancet**, v. 298, n. 7731, p. 971–972, 1971.
- SHAFFER, L. G.; LUPSKI, J. R. Chromosomal Rearrangements in H Umans. **Annual review of genetics**, v. 34, p. 297–329, 2000.
- SIGGBERG, L. et al. High-resolution SNP array analysis of patients with developmental disorder and normal array CGH results. **BMC Medical Genetics**, v. 13, 2012.
- SOLINAS-TOLDO, S. et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 20, n. 4, p. 399–407, 1997.
- TRASK, B. J.; CANCER, F. H. HUMAN CYTOGENETICS : AND COUNTING. v. 3, n. October, 2002.
- THOMPSON&THOMPSON. Genetics in Medicine: Chapter 05: Principles of Clinical Cytogenetics and Genome Analysis. **EIGHTH EDITION**ISBN: 978-1-4377-0696-3.

2018.

WEISCHENFELDT, J. et al. Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 2, p. 125–138, 2013.

WRIGHT, D. et al. Validation of a Chromosomal Microarray for Prenatal Diagnosis Using a Prospective Cohort of Pregnancies with Increased Risk for Chromosome Abnormalities. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 00, n. 00, p. gtmb.2016.0117, 2016.

YUNIS, J. J. High resolution of human chromosomes. **Science**, v. 191, n. 4233, p. 1268 LP-1270, 1976.