



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	mosaicism
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 congênicas, 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, DNMT1L, 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).

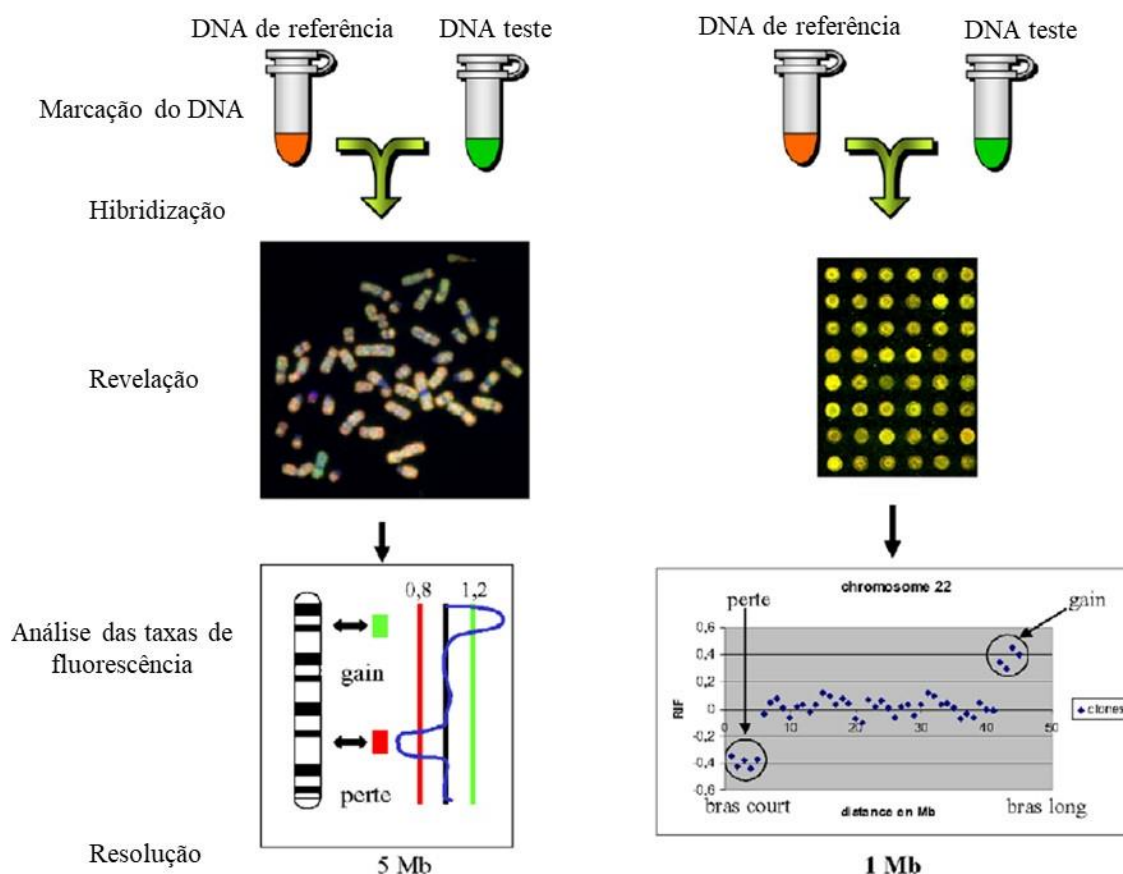


Figura 1: Comparação entre as técnicas de CGH (à esquerda) e *array*-CGH (à direita). Em ambas as técnicas o DNA de um paciente (DNA teste) é rotulado com um fluorocromo emissor de fluorescência em verde e o DNA de uma amostra normal (DNA de referência) é rotulado com um fluorocromo que emite fluorescência 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).

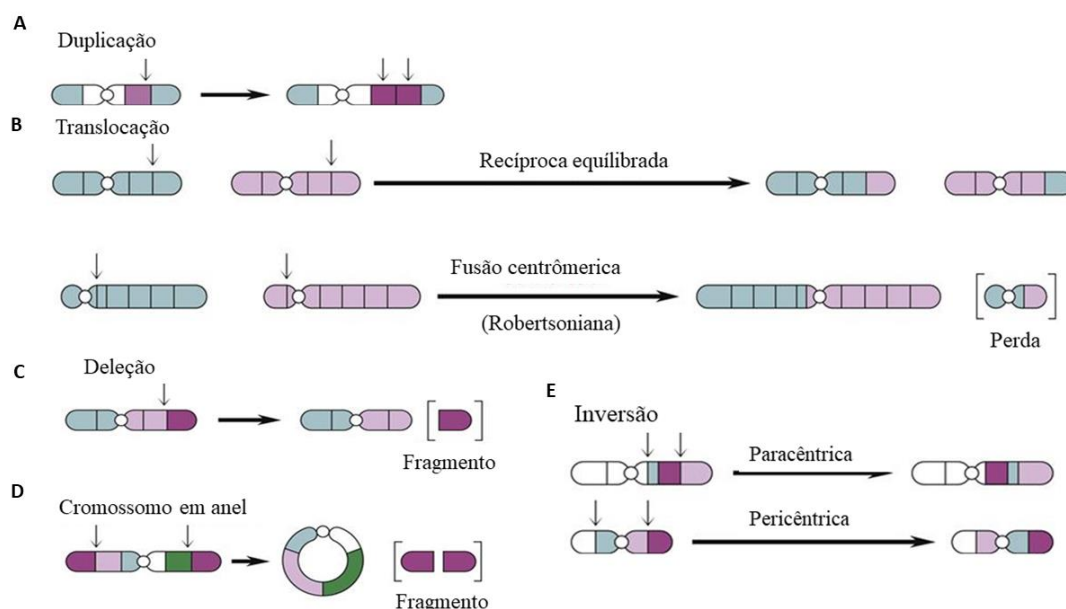


Figura 1: Ilustração geral dos tipos de rearranjos cromossômicos estruturais. A: duplicação de fragmento cromossômico. B: translocações cromossômicas, do tipo recíproca e robertsoniana. C: deleções de fragmentos cromossômicos. D: formação do cromossomo em anel, e perda de fragmentos cromossômicos. E: 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.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

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.

2.2. Específicos

- Caracterizar desequilíbrios genômicos em pacientes portadores de cariótipos anormais identificados por meio de bandamento GTG;
- Compilar estudos de casos com correlação cariótipo-genótipo-fenótipo em anomalias genéticas estruturais;
- Contribuir com a literatura científica em casos raros, visando o aumento do conhecimento sobre tais alterações cromossômicas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

O estudo tem sua casuística composta por 3 pacientes com rearranjo cromossômico incomum, triados juntos ao banco de dados do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – IBB/ Unesp.

Os responsáveis pelos pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (responsável legal- paciente incapaz) e o termo de consentimento autorizando a publicação em meio científico dos casos (Anexos A e B). Ambos os termos foram assinados em duas vias, sendo que uma via ficou com o responsável legal e a outra se encontra no prontuário do paciente junto ao Serviço de Aconselhamento Genético (SAG).

3.2. Ética

Os presentes copilados de casos foram encaminhados ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP- SP e obtiveram aprovação da pesquisa (Número de parecer: 3.007.729 e 3.007.674) em 08 de Novembro de 2018, sem a necessidade de envio à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

3.3. Avaliação clínica

As avaliações clínicas dos pacientes foram realizadas pelo geneticista do SAG com base na ficha de anamnese genético-clínico e para melhor documentação do caso, todos os pacientes foram fotografados (frente, perfil, membros superiores e inferiores). Os sinais clínicos foram tabulados como presentes (+), ausentes (-) ou não relatados (NR). Foram realizadas medições antropométricas nos pacientes (peso, altura, perímetro cefálico), bem como a investigação de dados de nascimento (idade gestacional e a adequação do peso de nascimento para a idade gestacional) de acordo com os critérios de percentis da OMS. Foram também anotadas informações a respeito de exames adicionais realizados nos pacientes (raio-X, tomografia etc).

3.4. Análise citogenética e molecular

3.4.1. Cultura temporária de linfócitos periféricos

As culturas de linfócitos de sangue periférico foram desenvolvidas segundo a técnica proposta por Moorhead et al. (1960) e a obtenção de cromossomos prometafásicos pela técnica descrita por Yunis (1976), ambas modificadas.

Foram coletados cerca de 5 ml de sangue venoso periférico inseridos em tubos de heparina a vácuo (*Liquemine Roche*® 5000u/ml) e mantidos em posição vertical a temperatura ambiente, para que ocorresse a sedimentação e a suspensão da camada de linfócitos. Cerca de 1 ml de plasma sanguíneo (enriquecido por linfócitos) foram inseridos em frascos de cultura contendo 4,5 ml de RPMI (*CULTILAB*®), suplementado com 20% de soro bovino fetal (*GIBCO*®) com o acréscimo de 0,1 ml de fitohemaglutinina (*DIFCO*®) e 0,1 ml de antibióticos (*GIBCO*®).

Os frascos de cultura foram postos em estufa a 37°C por 72 horas. Para a obtenção de cromossomos metafásicos, após 71 horas de cultivo celular foi adicionado 0,1 ml de Colchicina (0.0016-SIGMA) em cada frasco de cultura, mantidos em estufa a 37°C por mais 45 minutos. Logo após, os conteúdos dos frascos foram transferidos para tubos de centrífuga (15ml) e centrifugados a 1500 rpm por cinco minutos. Após esse período foi feita a hipotonização do material, acrescentando-se 5 ml de solução hipotônica (KCL 0,075M) pré-aquecida a 37°C e realizada homogeneização retornando as culturas à estufa a 37°C por mais vinte minutos. Após esse período, realizou-se a fixação da cultura, acrescentando-se 1 ml de fixador (metanol/ácido acético 3:1) e o material foi submetido à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, repetindo o processo de fixação e centrifugação por mais duas ou três vezes. O *pellet* de linfócitos, acrescido de 1 ml de fixador, foi então armazenado em freezer (-20°C).

3.4.2. Coloração e bandamento

As metáfases e prometáfases, obtidas pela técnica de cultura temporária de linfócitos, foram submetidas às técnicas de bandamento GTG e FISH.

3.4.3. Bandamento G (GTG)

Para obtenção de banda G foi utilizada a técnica modificada de Seabright (1971). As lâminas foram imersas em solução de tripsina 0,025%, diluída em tampão fosfato

0,06M com pH 6,8 em banho-maria a 37°C por 2 a 3 segundos. Em seguida, foram lavadas com água destilada e coradas em solução de Giemsa 4% com tampão fosfato pH 6,8 por aproximadamente 2 minutos.

3.4.4. Técnica de Hibridização in situ Fluorescência (FISH)

As técnicas da FISH, para as sondas comerciais, seguiram os padrões do protocolo que acompanha cada produto. Neste estudo foram utilizadas sondas WCP da VYSIS® e sonda satélite da *CYTOCELL*® para o cromossomo 6; Sondas WCP para os cromossomos 1, 12 e 14 *CYTOCELL*®.

3.4.5. Extração de DNA

Cerca de 3 ml de sangue periférico total foi colhida em tubos com EDTA a vácuo. A extração de DNA do copilado de caso sSMC (6), foi realizada utilizando o kit de extração da Wizard® Genomic DNA Purification Kit (*PROMEGA*®), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotômetro (ND-100 *Spectrophotometer da NanoDrop*®), utilizando-se 1,0µl da amostra. Aproximadamente 20µl de DNA [<100 ng/ul], da paciente, foi enviado ao *Baylor Miraca Genetics Laboratories* (Texas, U.S.A) para a realização da técnica de hibridização genômica comparativa (aCGH).

A extração de DNA, dos copilados de casos do cromossomo 12 e da t(1;14), foram realizadas por meio do método *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* – *Epicentre* (US), a partir de 200 µL de sangue total coletado de dois pacientes, seguindo as recomendações do fabricante. O material obtido foi quantificado em NanoDrop, utilizando-se 2µL de cada amostra.

3.5. Análise citogenômica

3.5.1. array-CGH

A técnica de array-CGH foi realizada em colaboração com o Laboratório de Citogenética Molecular Humana no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), coordenado pela Profa. Dra. Lucia Regina Martelli. Para realização da técnica foi utilizado o chip *Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K* (*Agilent*®, USA). Essa plataforma possui 420.288 sondas em regiões não variantes do

genoma, com espaçamento médio de 5,3kb, permitindo a detecção de variações de número de cópias (CNVs), bem como ganhos e perdas em todo o genoma. Nesta técnica, o DNA genômico da amostra (DNA teste) e um DNA controle (DNA referência), adquirido comercialmente, são diferentemente marcados com as cores azul e vermelha, sendo hibridizados em lâmina contendo sondas referentes a todo o genoma humano.

A técnica de *array*-CGH ocorre em três etapas. A primeira etapa após a extração e quantificação do DNA foi a de fragmentação, realizada com o kit *Genomic DNA Enzymatic Labeling* (Agilent®, USA). A solução de digestão foi preparada de acordo com as instruções do fornecedor, para os DNAs dos pacientes e seus respectivos controles, masculino e feminino, adquiridos da mesma empresa (Agilent®, USA). A reação de fragmentação foi preparada contendo, além das enzimas de restrição *Alu I* (10 U/μL) e *Rsa I* (10U/μL), água *nuclease-free*, tampão 10x e BSA acetilado (10 U/μL). Foram adicionados 5,8μL desta mistura a cada tubo de reação contendo 20,2μL de DNA genômico, completando um volume de 26μL. As amostras foram digeridas em termociclador, segundo o protocolo: 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 20 minutos para inativação enzimática, e então mantidas a 4°C até a finalização manual do programa. Para verificação do tamanho dos fragmentos gerados, utilizamos 2μL de cada amostra em gel de agarose 2%, devendo apresentar entre 200 a 800 pb. Na segunda etapa, foi realizada a marcação do DNA teste e do DNA controle com os fluoróforos, *Cyanine 3*-dUTP (Cy3) e *Cyanine 5*-dUTP (Cy5). Inicialmente, foram adicionados às amostras 5μL de *random primer* e novamente submetidas ao termociclador, programado com dois passos: o primeiro de três minutos a 95°C e o segundo a 4°C até a finalização manual do programa. O mix de marcação foi preparado contendo água *nuclease-free*, tampão de reação 5x, dNTPs 10x e *ExoKlenow*, além dos fluoróforos Cy5 e Cy3. Foram então adicionados 21μL do mix de marcação em cada um dos tubos de reação contendo o DNA genômico, totalizando um volume de 50μL cada.

As amostras foram levadas ao termociclador, utilizando-se o mesmo programa da etapa de fragmentação. A terceira etapa foi a de purificação, realizada com filtros *Amicon* 30kDa. Primeiramente, foram adicionados a cada amostra, 430μL de TE 1x (pH 8.0). Os filtros foram posicionados em tubos de microcentrífuga e carregados com DNA marcado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 17.530 x g, em temperatura ambiente. Após o descarte do filtrado, foram adicionados mais 480μL de TE 1x, repetindo a centrifugação e o descarte do filtrado. O material retido, juntamente com o filtro, foi vertido em novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL e centrifugado por um minuto em

temperatura ambiente a 358 x g, para obter a amostra purificada. O volume de cada amostra foi mensurado em pipeta e completou-se com TE 1x para um volume final de 41µL. Cada amostra foi quantificada em NanoDrop para determinação do rendimento das cianinas. Finalmente, as amostras teste e controle, devidamente marcadas com *cyanine-5* e *cyanine-3*, foram combinadas em um único mix, para análise genômica comparativa. A etapa seguinte foi a de preparação do DNA marcado para a hibridação. Nesta etapa, foi preparada uma solução de hibridação com 212,5µL de *Cot-1* DNA (1,0mg/mL), 221µL de 10x *aCGH Blocking Agent* e 1.105µL de tampão de hibridação 2x HI-RPM. Um volume de 181µL foi adicionado em cada tubo contendo o DNA marcado, totalizando 260µL. Após homogeneização por pipetagem, as amostras foram levadas ao banho seco a 95°C por 3 minutos e a 37°C por 30 minutos. Na etapa de hibridação, 245µL do mix de hibridação misturados ao DNA foram aplicados em cada um dos campos da lamínula que foi unida à lâmina de hibridação e envolvida por uma câmara de vedação. A mesma câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridação a 67°C, 20 rpm, por 40 horas. Na etapa seguinte, foram feitas as pós-lavagens. Inicialmente, lâmina e lamínula foram separadas manualmente e mergulhadas em tampão de lavagem *Oligo aCGH I* em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas, sendo a primeira lavagem feita com tampão *Oligo aCGH I*, em temperatura ambiente por cinco minutos, com agitação magnética. A segunda lavagem foi feita com o tampão *Oligo aCGH 2*, a 37°C com agitação magnética por um minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em acetonitrila, também em agitação magnética, por 10 segundos e mergulhadas em solução de estabilização e secagem, com a mesma agitação por 30 segundos. Após as lavagens, as lâminas foram posicionadas no suporte *SureScan* para serem escaneadas. Para o escaneamento das lâminas de microarray, utilizou-se o *Agilent SureScan C Scanner G2505*. O *software “The Feature Extraction” v10.5*, foi utilizado para a análise das imagens.

3.6. Análise de Bioinformática

A interpretação dos resultados ocorreu por meio do *software Nexus Copy Number*, versão 8.0 desenvolvido pela *Biodiscovery*® (<http://www.biodiscovery.com/nexus-copy-number/>), considerando o genoma de referência GRCh37/hg19. Os segmentos de deleções e duplicações que foram detectados foram comparados com perdas/deleção e ganhos/duplicações relatados em recursos *on-line* publicamente disponíveis e em bancos

de dados de anormalidades e variantes cromossômicas. Como referência, usamos dados públicos de bancos de dados compilados e colaborativos, incluindo o *Clinical Genomic Resource* (ClinGen) (<http://clinicalgenome.org/>); o Banco de Dados de Desequilíbrio Cromossômico e Fenótipo em Seres Humanos usando Ensembl Resources (Decipher) (<http://decipher.sanger.ac.uk/>); o *Database of Genomic Variants* (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>); o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); e o Navegador de Genoma da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/>). Uma revisão de genes e outros *loci* mapeados para as regiões deletadas e duplicadas foi realizada, usando bancos de dados do genoma humano, como o GeneCards®: *Human Gene Database* (<https://www.genecards.org/>); o *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM®) (<http://omim.org/>); e o PubMed (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

4. RESULTADOS

Com as informações obtidas por meio da avaliação clínica, citogenética, molecular e citogenômica (*array*-CGH) foram redigidos 03 relatos de casos (*Case Report* e *Short Communication*), descritos no formato das respectivas revistas.

4.1. Artigo científico 01

Revista Científica: *Molecular Cytogenetics*

Formato da publicação: *Case report*

Fator de impacto (2017/2018): 1.167

Status: Sob revisão da Dra Sarah H. Elsea (co-autora do artigo)

Case Report

Small supernumerary marker chromosome (sSMC) (6) and partial 6q dup in a child with skeletal dysplasia, developmental delay and intellectual disability

Jakeline Santos Oliveira¹; Cátia Regina Branco da Fonseca ³; Deise Helena de Souza¹; (outhor co-autor?) ; Sarah Elsea ²; Danilo Moretti-Ferreira¹

¹ Genetic Counseling Service – Bioscience Institute of Botucatu – São Paulo State University - IBB/Unesp-São Paulo/Brazil

² Dept. of Molecular and Human Genetics/ Baylor College of Medicine. One Baylor Plaza, NAB 2015. Houston, TX 77030, U.S.A.

³ Dept. of Pediatrics, School of Medicine of Botucatu – FMB/Unesp-São Paulo/Brasil

Corresponding author:

Abstract

Background: Partial trisomies involving chromosome 6 are considered rare chromosomal abnormalities. The marker chromosomes (sSMC) are defined as structurally abnormal chromosomes.

Case presentation: We describe a patient with two duplication 10,335 Mb and 10,765 Mb size approximately in regions 6p11.2q12 of and 6q14.1q14.3, characterized by Chromosome microarray analysis (array-CGH), presenting the clinical signs skeletal dysplasia (form), developmental delay, intellectual disability, and language delay.

Conclusion: The clinical signs described in the patient were similar to other patients with duplication of the 6q14 region. Of the marker chromosome present in patient was confirmed by the FISH technique, as coming from chromosome 6 and with the presence of centromere. The genes *PGM3*, *MYO6* and *IMPG1* were associated with sensory changes, immune deficiency and hypertrophy cardiomyopathy. Few are the cases in the literature with patients described with duplication involving the 6q11-6q16 regions. The patient described refine the potential genes correlated with the phenotype correlated with the 6q14 region.

Keywords: partial trisomy; small supernumerary marker chromosome (sSMC); array-CGH; developmental delay

Background

Marker chromosomes, also known as small supernumerary marker chromosomes (sSMC), are defined as structurally abnormal chromosomes characterized only by molecular cytogenetic techniques [1]. Many sSMCs originate from a single chromosome and, in rare cases, arise from two different chromosomes, thus forming complex rearrangements. The frequency of sSMCs in the general population is ~7.9/10,000 live births [2].

Due to the heterogeneous phenotype of the sSMCs, the interpretation of clinical significance is extremely problematic, since it depends on the origin, size, content and structure of the sSMCs, as well as on the degree of mosaicism, varying amounts of eucomatin, and parental origin [3]. About 30% of patients with sSMC have clinical signs, such as growth retardation and learning problems. There are few sSMCs that result in syndromes, such as Pallister-Killian syndrome (OMIM: 601803) and cat eye syndrome (OMIM: 115470) [4].

Partial trisomies of chromosome 6 are rare, and the regions frequently involved in the literature are 6p11 → p25 and 6q14 → q22[5,6]. Partial trisomy of the short arm of chromosome 6 was first described by Therkelsen et al. [1971] and is still considered rare today. Despite the different sizes of duplications involved in 6p trisomies, phenotypic characteristics were established as a phenotype, which includes: low birth weight, developmental delay, growth retardation, craniofacial anomalies and congenital heart diseases [5]. Reported craniofacial features include frontal bossa, blepharophimosis, blepharoptosis, low-set or malformed ears, small pointed chin and bulbous nose [7,8]. The 6p trisomies may be a consequence of translocation, interstitial duplication, inversion, or complex chromosomal rearrangements, such as sSCMs [9].

Duplications of the long arm of chromosome 6 are rare, and few cases are described in the literature [10]. The most frequent phenotypic characteristics include: severe intellectual disability (ID), short stature, eating difficulties, microcephaly, dysmorphic features such as frontal bossing, lower eyelid fissures, depressed nasal bridge, tented upper lip, micrognathia, and joint contractures [6].

Skeletal dysplasias are congenital alterations of bone and cartilaginous development, with incidence of 1.3-3.2/10,000 live births. They are variable in severity, and the phenotype is classified according to the clinical and radiological standard. Currently, the diagnosis also encompasses genetic testing which allows the correlation of genes to specific phenotypes, expanding the understanding of these dysplasias and the establishment of new phenotypic associations [11].

Here, we describe a patient with skeletal dysplasia, developmental delay, intellectual disability, and language delay, with a mosaic sSMC causing a partial trisomy 6p11.2→q12 and an interstitial trisomy 6q14.1→q14.3.

Case presentation

We present a 2 year old female patient, born by Caesarean section delivery in hospital. She is the only daughter of a non-consanguineous couple, young and healthy. The mother was followed prenatally, and the first fetal movements began at 3 months of gestation. Gestation lasted 37 weeks, and birth weight was 1.950 kg (<10th percentile) and 43 cm (<10th percentile). The patient presented cyanosis and jaundice, remaining for 22 days in phototherapy treatment.

In the 2-year-old clinical examination, height was 74 cm (percentile <3.95), weight of 7.570 kg (percentile <3.58) and OFC 43 cm (percentile <2). The clinical evaluation revealed microcephaly, brachycephaly, prominent forehead, strabismus, dental anomalies, micrognathism, short nose, forward nostrils, smooth nasolabial filter, thin lip,

tented upper lip, low-set ears, nail malformation, sharp fingers, digitized thumb, bilateral flat feet, (Fig. 1), cardiac murmur, skeletal dysplasias, hypotonia, language disorder, hyperarousalism, severe developmental delay, and intellectual disability.

Methods

Standard peripheral blood lymphocyte cultures were performed according to the technique of Moorhead et al. [1960], with minor modifications for both patient and parents. GTG Karyotyping (300-550 bands) followed the technique of Seabright [1971] and the high resolution Yunis [1976], both modified. FISH technique was performed according to the manufacturer's protocol, using ONCOR® coatasome probe for chromosome 6 and CYTOCELL® satellite probe for chromosome 6. About 3 ml of blood was collected in tubes containing the patient's EDTA for DNA extraction, following the protocol of the Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA®) extraction kit. The extracted DNA was quantified by NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer and software; NanoDrop Technologies, Berlin, Germany). Comparative genomic hybridization (aCGH) technique was performed according to the Agilent® platform using the Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K. Results were interpreted through repositories of online databases, including UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19) (<https://genome.ucsc.edu/>), DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>), OMIM (<http://omim.org/>) and PUBMED (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Results

Karyotype by GTG banding of the patient revealed mos 47,XX,+mar [9]/46,XX[11] (Fig. 2A). Parental karyotypes were normal. Chromosome microarray analysis (CMA) revealed a gain of the chromosomal band 6p11.2→q12 [hg19:57329882-67664557]x3 of approximately 10,335 Mb in size, and a gain in the number of copies of the chromosome

band 6q14.1→q14.3 [hg19:76628463-87393924]x3 of approximately 10,765 Mb in size. CMA results were validated with FISH, illustrating the marker chromosome (sSMC) originated from chromosome 6 and contained the chromosomal region 6p11.2→q12, including the centromeric region (Fig. 2C). The genes contained in the 6p11.2→q12 region include *PRIM2*, *GUSBP4*, *MTRNR2L9*, *KHDRBS2*, *LGSN*, *PTP4A1*, *PHF3*, *EYS* and *MCART3P*.

The chromosome region 6q14.1→q14.3 contains the following genes: *MYO6*, *IMPG1*, *HTR1B*, *IRAK1BP1*, *PHIP*, *HMG3*, *LCA5*, *SH3BGRL2*, *RNY4*, *ELOVL4*, *TTK*, *BCKDHB*, *FAM46A*, *IBTK*, *TPBG*, *UBE3D*, *DOPEY1*, *PGM3*, *RWDD2A*, *ME1*, *PRSS35*, *SNAP91*, *RIPPLY2*, *CYB5R4*, *MRAP2*, *KIAA1009*, *TBX18*, *AK024998*, *NT5E*, *SNX14*, *SYNCRIP*, *SNHG5*, and *SNORD50A*, *SNORD50B*.

Discussion

The presence of a sSMC in a patient with congenital malformations immediately leads the cytogeneticist to assume that the presence of this extra chromosomal material would be associated with the changes presented by the patient. However, the detection of a sSMC poses great challenges to diagnosis through classical cytogenetics, since it is possible to only find the presence of sSMC, limiting the characterization of its origin, and it is fundamental to apply other methods such as FISH and aCGH [4].

In the present case, after analysis of classical cytogenetics (mos 47,XX,+mar[9]/46,XX[11]), the analysis using the aCGH technique indicated gains in the chromosomal regions 6p11.2→q12 and 6q14.1→q14.3 with sizes of 10,335 Mb and 10,765 Mb, respectively, and indicating that the material contained in the SSMC was derived from chromosome 6. Generally, sSMCs exhibit a significant proportion of heterochromatin, it is possible to identify them by analysis of fluorescence in situ hybridization techniques (FISH), using centromeric probes specific [12]. In this way, it

was validated by FISH that the sSMC present in the patient, contains the duplicated centromeric chromosomal region 6p11.2→q12.

There are few cases in the literature of alterations in this chromosomal region. The studies carried out by Huang et al. (2012), Liehr et al. (2006), Leite et al. (2006) and Bartsch et al. (2005) reported cases of individuals with inserted chromosomal abnormalities in a similar sSMC chromosomal region 6p11.2→q12, these patients did not show any phenotypical alterations. Thus, we assume that the clinical signs of this case are due to duplication of the chromosomal region 6q14.1→q14.3 (Table I).

The present case shares clinical signs as microcephaly, long broad nasal bridge, small, low set ears, abnormal gait, Intellectual disability, delayed motor skills and delayed development similares to the cases described by Roland et al. (1993), Giardino et al. (1994), Wentzel et al. (2014), Sanmann et al. (2016), who described patients with duplications involving the 6q14 region, with different size and chromosome break points. The patients described by Giardino et al. (1994) and Sanmann et al. (2016) present large duplications involving the 6q11 and 6q16 regions, followed by the doubling described in the present case, but only in our patient was the duplication of the chromosomal region 6q14.1 → q14.3 (Table II). These patients also present sensory alterations, such as hearing loss, and immunological deficiency.

Genes involved in these processes that are duplicates in both our patient and those previously published, include *PGM3*, *MYO3*, and *IMPG1*. In addition, copy number variants (CNVs) classified as pathogenic have been described overlapping with the *MYO6* and *IMPG1* genes in the DECIPHER repository, in four individuals (IDs: 4070, 283786, 291621 and 338250) with clinical signs such as microcephaly, hypotonia and language delay. These clinical signs are also present in our patient.

PGM3 encodes a member of the phosphohexose mutase family. The encoded protein mediates both glycogen formation and utilization by catalyzing the interconversion of glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate. Pathogenic variants in *PGM3* identified by exome sequencing were associated with immunodeficiency (OMIM: 615816), autoimmunity, neurocognitive impairment and skeletal dysplasia [13].

MYO6 encodes myosin 6, a reverse-directed motor protein that moves toward the lower end of the actin filaments. It functions in a variety of intracellular processes, such as vesicular membrane trafficking and cell migration, as well as the structural integrity of inner ear (similarity) hair cells. Mutations in this gene are responsible for hereditary hearing loss and hypertrophic cardiomyopathy (OMIM: 606346); however, additional studies are needed to elucidate the molecular basis governing interactions of this gene [14]. In the present patient, a surgical procedure was performed for the correction of cardiopathy associated with atrial and interventricular communication (CIA + CIV).

IMPG1 encodes a proteoglycan protein, the main component of the retinal interphotoreceptor matrix, which plays an important role in maintaining the viability of photoreceptor cells and in the adhesion of the neural retina to the retinal pigment epithelium. Mutations in this gene cause hereditary dystrophies of the retina (OMIM: 616842), characterized by yellow deposits visible in the ocular fundus [15].

Thus, *PGM3*, *MYO3* and *IMPG1* are strong candidates for the clinical features present in patients, but studies using exome sequencing to identify additional pathogenic variants are necessary to confirm such changes.

Among the cases of proximal 6q duplications involving the 6q11-q16 regions, four patients were described with parental duplications of parental translocations [16,17] and two cases were described as *de novo* duplications [10,18]. In the present case, we

hypothesized that the duplications described in the patient were *de novo*, since the parental karyotype were normal.

Conclusions

The cases described with 6q14.1 duplications in the literature are rare, so a 6q duplication genotype/phenotype correlation in our patient provides a better understanding of the clinical signs, as well as the ability to associate such imbalances with the genes characterized in the region, making possible the association with similar cases in the literature and genetic counseling to the patient and family members.

Acknowledgment

We thank the patient and parents responsible for the child. The postgraduate program in biological sciences (Genetics) of IBB/Unesp. The present work was carried out with the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

References

1. Jang. W, Chae. H, Kim. J, Son. J-O, Kim. C. S, Koo. K. B, Kim. M, Kim. Y, Park. Y. I, Sung. K. I.. Identification of small marker chromosomes using microarray comparative genomic hybridization and multicolor fluorescent in situ hybridization. Mol Cytogenet [Internet]. Molecular Cytogenetics; 2016;9:no pagination.
2. Villa O, Del Campo M, Salido M, Gener B, Astier L, Del Valle J, et al. Small supernumerary marker chromosome causing partial trisomy 6p in a child with craniosynostosis. Am J Med Genet Part A. 2007;143:1108–13.
3. Guediche N, Tosca L, Nouchy M, Lecerf L, Cornet D, Brisset S, et al. Small supernumerary marker chromosomes derived from chromosomes 6 and 20 in a woman with recurrent spontaneous abortions. Eur J Med Genet [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2012;55:737–42.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.09.002>

4. Ou J, Wang W, Liehr T, Klein E, Hamid AB, Wang F, et al. Characterization of three small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *J Matern Neonatal Med J J Matern Neonatal Med J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2013;26:1476–7058. Available from: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ijmf20%5Cnhttp://www.tandfonline.com/loi/ijmf20%5Cnhttp://dx.doi.org/10.3109/14767058.2012.732129>
5. Villa A, Gomez EG, Rodríguez L, Rastrollo RH, Tallo MEM, Martínez-Frías ML. Interstitial tandem duplication of 6p: A case with partial trisomy (6)(p12p21.3). *Am J Med Genet*. 2000;90:369–75.
6. Srebniak MI, van Zutven LJCM, Petit F, Bouquillon S, van Heel IPJ, Knapen MFCM, et al. Interstitial 6q21q23 duplication - variant of variable phenotype and incomplete penetrance or benign duplication? *Mol Cytogenet* [Internet]. *Molecular Cytogenetics*; 2016;9:43. Available from: <http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-016-0253-9>
7. Giardino D, Finelli P, Caufin D, Gottardi G, Lo Vasco R, Turolla L, et al. Pure 6p22-pter trisomic patient: Refined FISH characterization and genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet*. 2002;108:36–40.
8. Stohler R, Kucharski E, Farrow E, Torres-Martinez W, Delk P, Thurston VC, et al. A case of de novo partial tetrasomy of distal 6p and review of the literature. *Am J Med Genet Part A*. 2007;143:1978–83.
9. Sivasankaran A, Murthy K, Oruganti VP, Deenadayalu A, Samuel CR, Kandukuri LR. De-novo pure partial trisomy (6)(p22.3→pter): A case report and review of the literature. *Clin Dysmorphol*. 2017;26:26–32.
10. Sanmann JN, Casas KA, Bevilacqua J, Bishay DL, Clark T, Van Dyke AZ, et al. The first patient with tandem duplication of 6q14q16: Molecular and phenotypic characterization. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2016;170:2416–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.37797>
11. Maddirevula S, Alsahli S, Alhabeeb L, Patel N, Alzahrani F, Shamseldin HE, et al. Expanding the phenome and variome of skeletal dysplasia. *Genet Med* [Internet]. *Nature*

Publishing Group; 2018;00:1–8. Available from:

<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/gim.2018.50>

12. Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res.* 2004;107:55–67.
13. Pacheco-Cuellar G, Gauthier J, Désilets V, Lachance C, Lemire-Girard M, Rypens F, et al. A Novel PGM3 Mutation Is Associated With a Severe Phenotype of Bone Marrow Failure, Severe Combined Immunodeficiency, Skeletal Dysplasia, and Congenital Malformations. *J Bone Miner Res.* 2017;32:1853–9.
14. Liu H, Li J, Raval MH, Yao N, Deng X, Lu Q, et al. Myosin III-mediated cross-linking and stimulation of actin bundling activity of Espin. *Elife.* 2016;5:1–20.
15. Manes G, Meunier I, Avila-Fernández A, Banfi S, Le Meur G, Zanlonghi X, et al. Mutations in IMPG1 cause vitelliform macular dystrophies. *Am J Hum Genet.* 2013;93:571–8.
16. Roland B, Lowry RB, Cox DM, Ferreira P, Lin CC. Familial complex chromosomal rearrangement resulting in duplication/deletion of 6q14 to 6q16. *Clin Genet.* 1993;43(3):117–
17. Wentzel C, Annerén G, Thuresson AC. A maternal de novo non-reciprocal translocation results in a 6q13-q16 deletion in one offspring and a 6q13-q16 duplication in another. *Eur J Med Genet [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2014;57:259–63.* Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.02.016>
18. Giardino D, Rizzi N, Briscioli V, Bettio D. A de novo 6q11-q15 duplication investigated by chromosome painting. *Clin Genet.* 1994;46:377–9.

Internet Resources Section

UCSC genome Browser , <https://genome.ucsc.edu/> (April 02, 2018).

Database of Genomic Variants (DGV), <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (April 06, 2018).

Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER), <https://decipher.sanger.ac.uk/> (April 14, 2018).

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://omim.org/> (April 23, 2018).

US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (June 01, 2018).

Table I. Description of cases diagnosed with sSMC derived from chromosome 6.

Cases	Reference	% Abnormal cells (peripheral blood)	Inheritance	Chromosome region	Phenotype
1	Present case	45%	<i>De novo</i>	6p11.2→q12	Developmental delay, intellectual deficiency, language delay, dysmorphic faces, skeletal dysplasia
2	Huang et al. [2012] case 1	75%	<i>De novo</i>	6p21.2→q11.2	Small for gestational age, developmental delay, epilepsy, mild dysmorphic face
3	Liehr et al. [2006] case 6	84%	<i>De novo</i>	6p11.1→q11.1	Normal child
4	Leite et al. [2006] case 2	NR	<i>De novo</i>	6p12→q11.1	Normal child at 4 years
5	Bartsch et al. [2005] case 38	83%	<i>De novo</i>	r(6)(p11q11)	No congenital anomalies, normal development at 7 months

* assembly GRCh37/hg19; NR-not reported/not determined.

Table II. Description of clinical signs in patients with partial duplication.

Phenotype	Roland et al. [1993] dup 6q14→q16 case 2	Giardino et al. [1994] dup 6q11→q15	Wentzel et al. [2014] dup 6q13→q14.1 & dup 6q14.2→q16.1 case 1	Sanmann et al. [2016] dup 6q14.1→q16.1	Present case [2018] dup 6q14.1→q14.3
Intellectual disability	+	+	+	+	+
Delayed motor skills	+	+	+	+	+
Delayed development	+	+	+	+	+
Microcephaly	+	+	+	-	+
Long broad nasal bridge	+	+	+	+	+
Short/smooth philtrum	+/-	+/-	-	+	+
Abnormal eyebrows	+	NR	NR	+	-
High-arched palate	NR	+	+	-	-
Small, low set ears	NR	+	+	+	+
Syndactyly	-	+	+	-	+/-
Pes planus	+	+	+	-	+
Abnormal gait	NR	NR	+	+	+
Hypotonia	+	+	+	-	+
Seizures	-	NR	-	+	-

+, positive feature; -, negative feature; NR, not reported/not determined; +/-, uncertain.

Fig. 1: Patient at 5 years, 2 months of age. **A-B:** presenting frontal bossing, low-set ears, microretrognathism, and valgus knees. **C:** hands showing polysyllacylia of the thumb, camptodactyly of the 4th digit, and clinodactyly of the 5th digit.

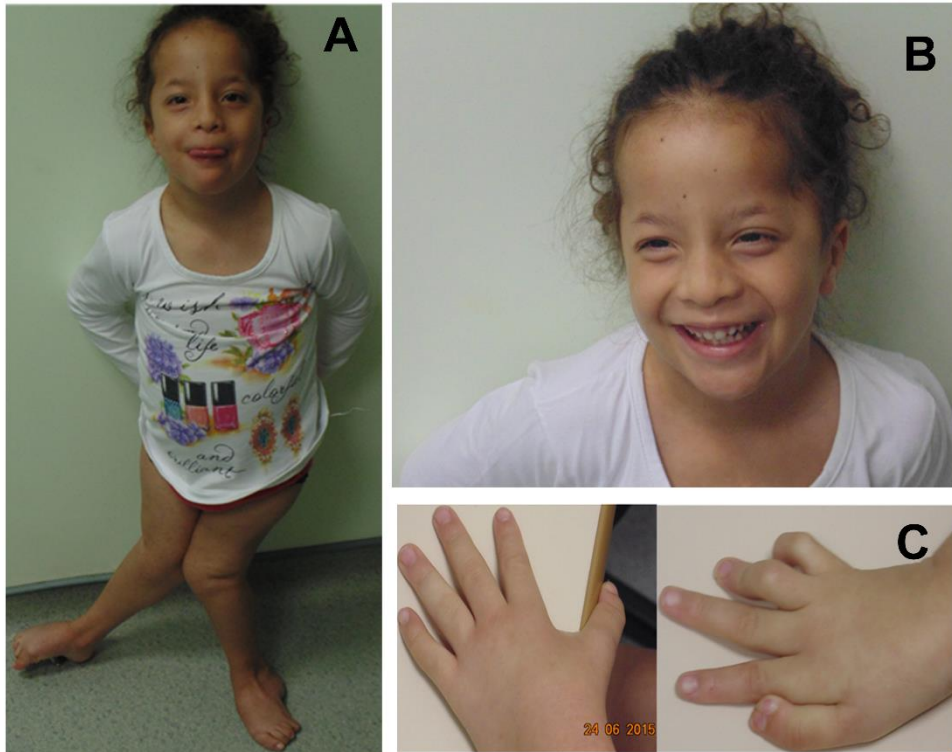


Fig. 2: X-ray image of the patient. **A:** hands showing polysyllacylia of the thumb, camptodactyly of the 4th digit, and clinodactyly of the 5th digit. **B-C:** valgus knees and scoliosis.

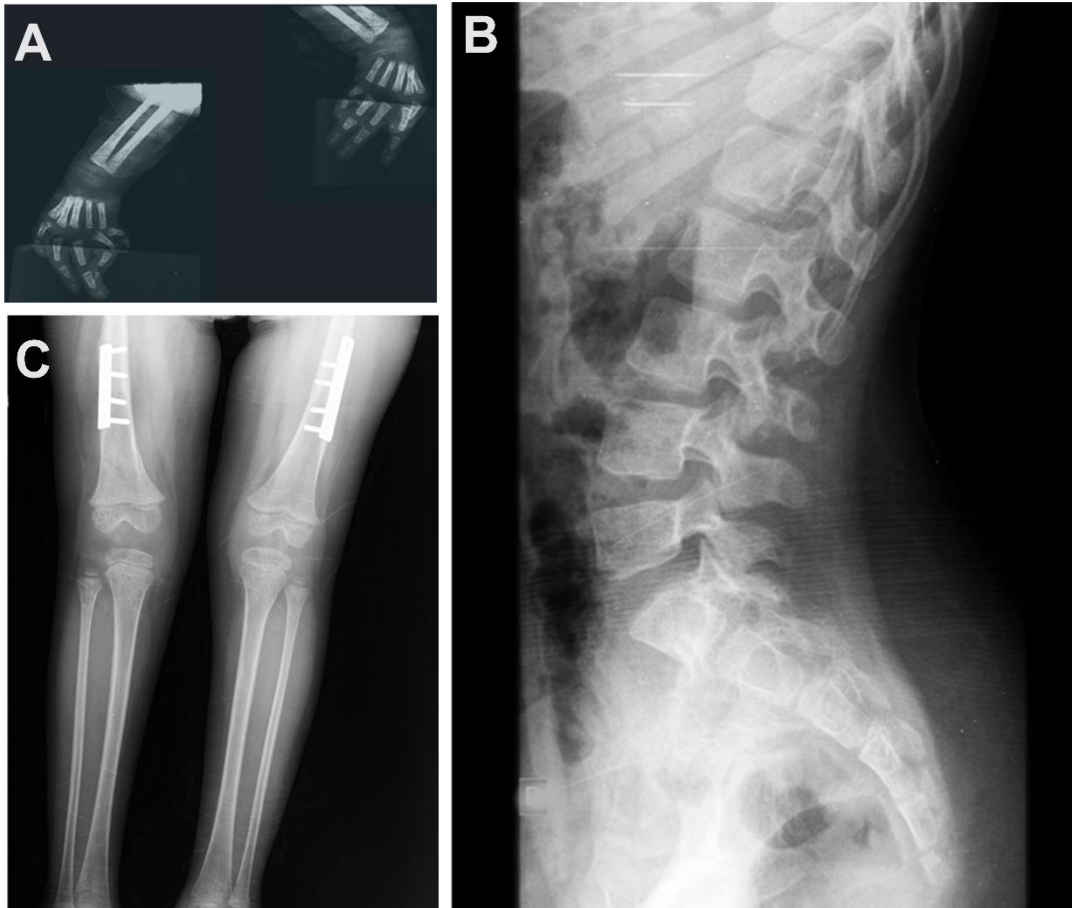


Fig. 3: **A:** GTG banding metaphase showing supernumerary marker chromosome (red arrow). **B:** FISH metaphase using the ONCOR® Coatasome 6 probe showing two chromosomes 6 and the marker chromosome (red arrow). **C:** FISH metaphase using the CYTOCELL® chromosome 6 satellite probe, showing the 2 centromeres of chromosome 6 and the centromere of the marker chromosome indicated by the red arrow.

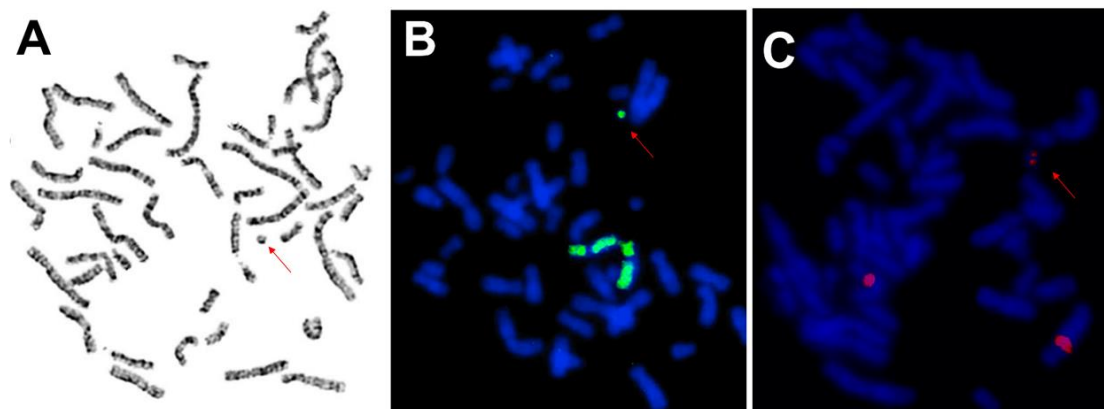
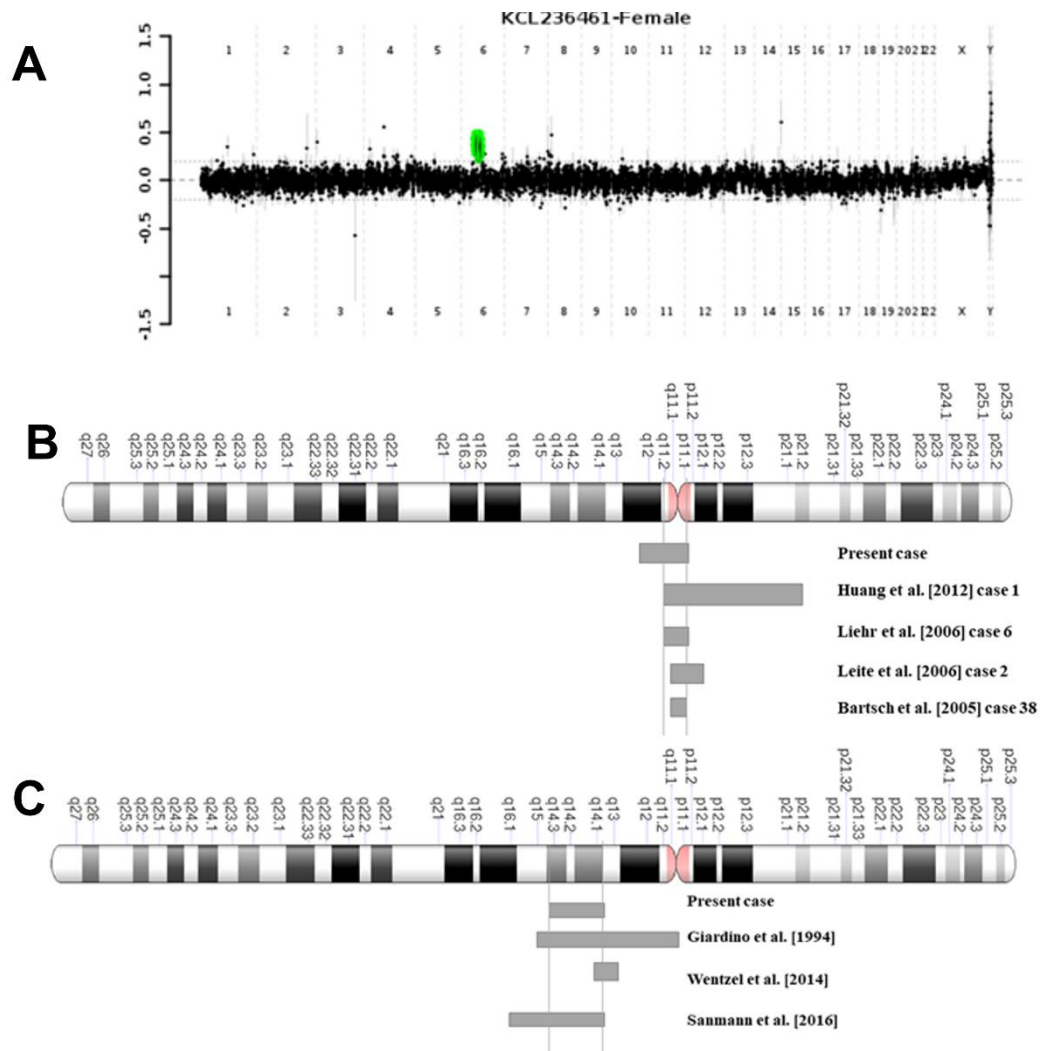


Fig. 4: Result of the aCGH of chromosome 6 and description of cases diagnosed with duplication chromosome 6. **A-** the green indicates the duplicated chromosomal regions 6p11.2q12 and 6q14.1q14.3. **B-** Below is a diagram with the works published with regions similar to region 6p11.1 → q12 of the present case. **C-** Below the representative scheme of published works with regions similar to region 6q14.1 → q14.3 of the present case.



4.2. Artigo científico 02

Revista Científica: *Genetics and Molecular Biology*

Formato da publicação: *Short Communication*

Fator de impacto (2017/2018): 1.493

Status: Submetido a revista (Aguardando o convite do revisor)

Dear Ms. Oliveira:

Your manuscript entitled "Partial duplication 12p in a patient with dysmorphic characteristics and developmental delay" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the *Genetics and Molecular Biology*.

Your manuscript ID is GMB-2018-0285.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>.

Note that *Genetics and Molecular Biology* has established a publication charge for accepted manuscripts. For detailed information, please consult our homepage <http://www.gmb.org.br>.

Thank you for submitting your manuscript to the *Genetics and Molecular Biology*.

Sincerely,

Genetics and Molecular Biology Editorial Office

Short Communications

Partial duplication 12p in a patient with dysmorphic characteristics and developmental delay

Jakeline Santos Oliveira¹, Tatiana Joaquim Mozer², Rosana Aparecida Bicudo da Silva¹,
Deise Helena de Souza¹, Lúcia Regina Martelli², Danilo Moretti-Ferreira¹

¹ São Paulo State University – Departament of Genetics, IBB/Unesp. Botucatu, São Paulo, Brazil.

² Ribeirão Preto School of Medicine - São Paulo University, Departament of Genetics, FMRP-USP. Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Subtitle: Case report of a patient with facial dysmorphism characterized by *array*-CGH as duplication 12p11.32→p13.31.

Key words: duplication 12p, *array*-CGH, facial dysmorphism.

Corresponding author: Jakeline Santos Oliveira

Mailing address: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético

Botucatu/SP – CEP:18.618-000

E-mail: jakoliveira.jo@gmail.com

Abstract

Duplication of the short arm of chromosome 12p is a rare chromosomal abnormality that may arise *de novo* or result from malsegregation of a balanced parental translocation. This study comprises the clinical description, cytogenetic and cytogenomic analyses and genotype-phenotype correlation in a patient with facial dysmorphism, developmental delay and intellectual impairment caused by partial duplication 12p. The patient's GTG-banded karyotype was 46,XX, dup(12)(p13.1-p11.2). A genetic gain of approximately 28 Mb was detected in the chromosomal region arr[GRCh37]p13.31-p11.1(chr12:6,914,072-34,756,209)x3. The chromosomal alteration seen in our patient is described as partial duplication 12p. In most cases, duplication 12p phenotype is characterized by dysmorphic features, multiple congenital anomalies and intellectual disability. Genes *GRIN2B*, *ATF7IP*, *ALG10*, *SYT10*, *DNM1L*, *PKP2*, *PIK3C2G*, *SCNN1A*, *PIANP* and *SOX5* were overlapped by gain CNVs classified as pathogenic that correlate with phenotypes characterized by dysmorphic face, seizures, cognitive dysfunction and neurodevelopmental disorders. In our patient, duplication 12p was sporadic and of *de novo* origin. This study should contribute to the genotype-phenotype correlation in partial duplication 12p cases.

Duplication of the short arm of chromosome 12p, first described by Uchida & Lin (1973), is a rare chromosomal abnormality with an estimated incidence of 1/50,000 live births (Stengel-Rutkowski et al., 1979). To date, about 40 patients have been reported in the literature. However, since diagnosis usually occurs at childhood and adolescence, little is known about the clinical course of development in adults. Duplication 12p is considered

“pure” when no other chromosome is involved or “complete” when it extends from 12p11 to 12pter (Segel et al., 2006; Poirsier et al., 2014).

The clinical signs most commonly associated with duplication 12p are craniofacial anomalies such as turricephaly, macrocephaly, round face, full cheeks, frontal bossing, wide nasal bridge, short nose, anteverted nares, long philtrum, thin upper lip, short neck, dysmorphic ears, intellectual impairment and moderate to severe psychomotor delay (Hung et al., 2012; Poirsier et al., 2014).

The observed variability in the phenotype of individuals with duplication 12p can be attributable to the length of the trisomic segment, involvement of other chromosomes, and presence of mosaicism (Tekin et al., 2001; Izumi et al., 2012).

Individuals with duplication 12p may also carry a phenotype similar to that of Pallister-Killian syndrome (PKS) (OMIM: 601803), typically caused by the presence of a supernumerary isochromosome composed of the short arms of chromosome 12 (tetrasomy 12p). Nonetheless, the phenotypic difference between trisomy 12p and PKS remains to be established (Inage et al., 2010; Izumi et al., 2012).

In most of the reported cases, duplication 12p resulted from malsegregation of a balanced parental translocation (Segel et al., 2006). Duplication 12p may also arise *de novo* from misalignment of low copy repeats (LCRs) through non-allelic homologous recombination (NAHR) (De Gregori et al., 2005).

Most reports of cases of duplication 12p describe the clinical characteristics of the patients and conventional cytogenetics analysis. Few of them address chromosomal breakpoints and Copy Number Variations (CNVs) present in the duplication 12 region using CGH-array (Izumi et al., 2012; Poirsier et al., 2014).

This study included the clinical description, cytogenetic and cytogenomic analyses, as well as genotype-phenotype correlation in a patient with facial dysmorphism, developmental delay and intellectual impairment caused by partial duplication 12p.

This 15-year-old girl, the only child of young and healthy non-consanguineous parents, was born at 40 weeks after uneventful pregnancy and delivery. Her birth weight was 2.535 Kg (p 2.5), and length 48 cm (p>2.5). She presented jaundice at birth, and, therefore, received phototherapy for five days. At one year, the patient started having seizures with recurrence. At two years and two months of age, her height was 86 cm (p<3.95), weight 12.5 Kg (p<3.58) and head circumference 47.5 cm (percentile <2). She had a broad forehead, flat face, narrow eye slits, anteverted nostrils, low nasal root with a broad nasal base, smooth nasolabial philtrum, tent-shaped upper lip, scoliosis, single Simian crease in the left hand, bilateral flat foot, right genu valgum, developmental delay and intellectual disability (Figure 1). She could walk and talk when she was three. At six years, she underwent surgical correction of genu valgum and showed short lower limbs. She experienced thelarche at 10 years, and pubarche at 11. She was last seen 13 years of age. At that time, her cholesterol was 600 mg/dL, and she had hypothyroidism, speech delay, good comprehension but unable to read or write.

Chromosomal analysis was carried out on temporary peripheral lymphocyte cultures obtained from the patient and her parents as described by Moorhead and Furman (1960), with modifications. GTG banding (300-550 bands) was performed as described by Seabright (1971) and high-resolution banding according to Yunis (1976), both with modifications. The patient's GTG-banded karyotype was 46,XX,dup(12)(p13.1-p11.2) while the karyotype of both parents were normal. FISH analysis, performed according to the instructions of the manufacturer, using a WCP chromosome 12 probe (ONCOR®) revealed that one of the homologous chromosomes differed in size (Figure 2).

For cytogenomic analysis, DNA was extracted from 200 µL of the patient's whole blood using the MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit – Epicentre (US) according to the manufacturer's instructions. Array-CGH (Agilent *GenetiSure* CGH + SNP 4x180k). Analyses performed by the software Nexus Copy Number (Biodiscovery) v. 8.0, conducted using the reference genome GRCh37/hg19. Indicated a genetic gain of approximately 27.842 pb (~28 Mb) in size arr[GRCh37]12p13.31-p11.1(chr12:6914072-34756209)x3, encompasses around 282 genes (Figure 3). Copy number variants (CNVs) were interpreted using online databases such as UCSC *Genome Browser* (GRCh37/hg19), DGV, DECIPHER, OMIM and PUBMED.

The DECIPHER database lists about 273 gain CNVs with chromosomal breakpoints similar to those seen in our case. Twenty-one of these CNVs are classified as pathogenic and in seven cases (IDs: 270537, 0282283, 284998, 296420, 303564, 331701 e 361145) the clinical signs described (macrocephaly, facial dysmorphism, micrognathism, seizures, abnormal ears, generalized hypotonia, speech and language delay, developmental delay and intellectual disability) are also present in our patient. In most cases, there was overlap of gain CNVs classified as pathogenic with genes *GRIN2B*, *ATF7IP*, *ALG10*, *SYT10*, *DNM1L*, *PKP2* and *PIK3C2G*.

The *GRIN2B* gene (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B*, ID: 2904) encodes the subunit GluN2B, whose expression is high in parts of the brain during embryogenesis, but decreases after birth. The N2B subunit plays a critical role in brain function. Naturally occurring mutations within *GRIN2B* are associated with neurodevelopmental disorders including intellectual impairment (OMIM: 613970), epilepsy and autism spectrum disorder (Hu et al. 2016). Nonetheless, the phenotypic impact of *GRIN2B* duplication is still unclear (Poirsier et al., 2014).

The gene *ALG10* (*alpha-1,2-glucosyltransferase*, ID: 84920) encodes a membrane-associated protein that adds the third glucose residue to the lipid-linked oligosaccharide precursor for N-linked glycosylation. This gene, also known as KCR1, reduces the sensitivity of classic pro-arrhythmic I_{Kr} blockers to Kv11 arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysfunction of this gene has been associated with long QT syndrome (OMIM: 603313). However, the phenotypic impact of *ALG10* duplications remains to be further elucidated (Sonoda et al., 2017).

SYT10 (*Synaptotagmin 10*, ID: 341359) is a protein coding gene. Among its related pathways are protein-protein interactions at synapses and transmission across chemical synapses. In a rat study, Woitecki et al.(2016) demonstrated that increased *Syt10*mRNA levels lead to the excessive stimulation of neurons by neurotransmitters such as glutamate, that not only causes neuronal damage and cell death, but also initiates neuroprotective mechanisms. In addition, they found that *Syt10* gene expression is strongly upregulated due to its neuronal activity. These findings, however, still have not been confirmed in humans (Woitecki et al., 2016). In Decipher patient 303564, pathogenic CNV overlapping genes *APG10* and *SYT10* is described as a phenotype of cognitive dysfunction. Since our patient also presents this duplication, it is possible to infer that she carries this same phenotype.

The gene *DNM1L* (*dynamamin 1 like*, ID: 10059) encodes the DRP-1 protein, a member of the superfamily of GTPases that mediates mitochondrial and peroxisomal division. Alterations in this gene produce a neurological and neurodevelopmental phenotype, consistent with impaired mitochondrial architecture and function, through a diminished ability to oligomerize, such as encephalopathy due to defective mitochondrial and peroxisomal fission 1- EMPF1 (OMIM: 614388) (Hogarth et al., 2017).

PKP2 (*plakophilin 2*, ID: 5318) encodes the protein *plakophilin*, which participate in linking cadherins to intermediate filaments in the cytoskeleton. This gene product may regulate the signaling activity of beta-catenin. Alterations in this gene may be associated with arrhythmic cardiomyopathy (OMIM: 609040) an heterogeneous disease associated with several phenotypes (Wang et al., 2018).

Coe et al. (2014) constructed an expanded CNV morbidity map of individuals with intellectual impairment, developmental delay and or Autism Spectrum Disorder (ASD) both as a clinical resource for pathogenic CNVs and also to identify genes potentially sensitive to dosage imbalance. They found that pathogenic gain CNVs overlapping with genes *GRIN2B*, *SCNN1A*, *PIANP* and *SOX5* are associated with the phenotype neurodevelopmental disorders (Coe et al., 2014).

The majority of the genes altered in duplication 12p are associated with neurological and cognitive functions. In the case series described by Segel et al. (2006), individuals with duplication 12p tended to experience seizures at seven or eight years of age, and were all developmentally delayed not only in speech, the most prominent area of delay, but also in the cognition and motor areas. Our patient experienced seizures at one year with recurrence, and showed delay in speech, cognition, motor, and intellectual skills.

The clinical features of our patient (Table 1) are consistent with those described in former duplication 12p case reports. Irrespective of deletion size, patients with duplication 12p seem to share a common facial pattern, supporting the notion that the duplication of a subset of genes is responsible for the facial phenotype. The characterization of the genes present in the affected region has been limited by the fact that only few studies have used array-CGH (Allen et al., 1996; Zumkeller et al., 2004; De Gregori et al., 2005; Inage et al., 2010; Izumi et al., 2012; Poirsier et al., 2014).

Some of the clinical signs in duplication 12p have also been described in PKS. However, the clinical features characteristic of PKS, i.e., diaphragmatic hernia, coarse facial features, and hearing loss absent in most reported cases of partial duplication 12p (Izumi et al., 2012). The diagnosis of PKS requires the identification of mosaic isochromosome 12p by conventional karyotyping and FISH (Hung et al., 2012). Our patient showed clinical features consistent with duplication 12p, but since no isochromosome 12p was detected by karyotyping and FISH, the patient was diagnosed with partial duplication 12p.

Most cases of duplication 12p reported in the literature have duplication of 12p13.31 in common. This region also overlaps with PKS. Izumi et al. (2012) hypothesized that 12p13.31, which has been strongly associated with the pathogenesis of various neoplasms, harbors genes that play a critical role in the pathogenesis of 12p duplication/PKS. According to these authors, *ING4*, *CHD4* and *MAGP2*, represent strong candidate genes, given their important roles in cellular proliferation and differentiation. Moreover, alterations in these genes have been associated with neurological disorders (Segel et al., 2006; Izumi et al., 2012).

Rare are the cases of *de novo* duplication 12p in any segment of chromosome 12 short arm (Kim et al., 2006). In our case, GTG banding showed no abnormality in both parents. Thus, it is possible that duplication 12p was of *de novo* origin in our patient. Furthermore, Gregori et al. (2005) suggested that 12p11.21-p13.31 regions are mediated by three LCRs (9, 31 and 3 Mb, respectively) that generate duplications/deletions due to NAHR.

In conclusion, this study should contribute to the genotype-phenotype correlation in partial duplication 12p cases. Array-CGH allowed the characterization of CNV-overlapped genes associated with neurodevelopmental disorders (intellectual disability, developmental delay, ADS), cardiac diseases and facial dysmorphism.

Acknowledgements

We thank the patient and her parents for their cooperation, and IBB / Unesp Graduation Program in Biological Sciences (Genetics). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brazil (CAPES) – Finance Code 001.

References

- Allen TL, Brothman AR, Carey JC and Chance PF (1996) Cytogenetic and molecular analysis in trisomy 12p. *Am J Med Genet* 63:250–256.
- Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, van Bon BWM, Vulto-van Silfhout AT, Bosco P, Friend KL, Baker C, Buono S, Vissers LELM et al. (2014) Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet* 46:1063–1071.
- De Gregori M, Pramparo T, Memo L, Gimelli G, Messa J, Rocchi M, Patricelli MG, Ciccone R, Giorda R and Zuffardi O (2005) Direct duplication 12p11.21-p13.31 mediated by segmental duplications: A new recurrent rearrangement? *Hum Genet* 118:207–213.
- Hogarth KA, Costford SR, Yoon G, Sondheimer N and Maynes JT (2017) DNM1L Variant Alters Baseline Mitochondrial Function and Response to Stress in a Patient with Severe Neurological Dysfunction. *Biochem Genet* 1–22.

- Hu C, Chen W, Myers SJ, Yuan H and Traynelis SF (2016) Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *Journal of Pharmacological Sciences*. 132:115–121.
- Hung CC, Lin CH, Lin SY, Shin JC, Lee CN and Su YN (2012) Prenatal diagnosis of a fetus with a de novo trisomy 12p by array-comparative genomic hybridization (array-CGH). *Gene* 495:178–182.
- Inage E, Suzuki M, Minowa K, Akimoto N, Hisata K, Shoji H, Okumura A, Shimojima K, Shimizu T and Yamamoto T (2010) Phenotypic overlapping of trisomy 12p and Pallister-Killian syndrome. *Eur J Med Genet* 53:159–161.
- Izumi K, Conlin LK, Berrodin D, Fincher C, Wilkens A, Haldeman-Englert C, Saitta SC, Zackai EH, Spinner NB and Krantz ID (2012) Duplication 12p and Pallister-Killian syndrome: A case report and review of the literature toward defining a Pallister-Killian syndrome minimal critical region. *Am J Med Genet Part A* 158 A:3033–3045.
- Kim YO, Baek HJ, Woo YJ, Choi YY and Chung TW (2006) Moyamoya Syndrome in a Child With Trisomy 12p Syndrome. *Pediatr Neurol* 35:442–445.
- Moorhead ED and Furman NH (1960) A Chronopotentiometric Study of Gallium. *Anal Chem* 32:1507–1509.
- Poirsier C, Landais E, Bednarek N, Nobecourt JM, Khoury M, Schmidt P, Morville P, Gruson N, Clomes S, Michel N et al. (2014) Report on 3 patients with 12p duplication including GRIN2B. *Eur J Med Genet* 57:185–194.
- Seabright M (1971) a Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. *Lancet* 298:971–972.

- Segel R, Peter I, Demmer LA, Cowan JM, Hoffman JD and Bianchi DW (2006) The natural history of trisomy 12p. *Am J Med Genet Part A* 140 A:695–703.
- Sonoda K, Ohno S, Otuki S, Kato K, Yagihara N, Watanabe H, Makiyama T, Minamino T and Horie M (2017) Quantitative analysis of PKP2 and neighbouring genes in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by heterozygous PKP2 deletion. *Europace* 19:644–650.
- Stengel-Rutkowski S, Murken JD, Pilar V, Dutrillaux B, Rodewald A, Goebel R and Bassermann R (1979) New chromosomal dysmorphic syndromes - 3. Partial trisomy 3q. *Eur J Pediatr* 130:111–125.
- Uchida IA and Lin CC (1973) Identification of partial 12 trisomy by quinacrine fluorescence. *J Pediatr* 82:269–272.
- Wang L, Liu S, Zhang H, Hu S and Wei Y (2018) Arrhythmogenic cardiomyopathy: Identification of desmosomal gene variations and desmosomal protein expression in variation carriers. *Exp Ther Med* 15:2255–2262.
- Tekin M, Jackson-Cook, Pandya A (2001) De novo inverted tandem duplication of the short arm of chromosome 12 in a patient with microblepharon. *Am J Med Genet* 104:42–46.
- Woitecki AMH, Muller JA, van Loo KMJ, Sowade RF, Becker AJ and Schoch S (2016) Identification of Synaptotagmin 10 as Effector of NPAS4-Mediated Protection from Excitotoxic Neurodegeneration. *J Neurosci* 36:2561–2570.
- Yunis JJ (1976) High resolution of human chromosomes. *Science* (80-) 191:1268 LP-1270.

Zumkeller W, Volleth M, Muschke P, Tönnies H, Heller A, Liehr T, Wieacker P and Stumm M (2004) Genotype/phenotype analysis in a patient with pure and complete trisomy 12p. *Am J Med Genet* 129 A:261–264.

Internet Resources Section

Nexus software, <http://www.biodiscovery.com/nexus-copy-number/> (November 18, 2017).

UCSC genome Browser , <https://genome.ucsc.edu/> (June 04, 2018).

Database of Genomic Variants (DGV), <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (June 06, 2018).

Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER), <https://decipher.sanger.ac.uk/> (July 05, 2018).

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://omim.org/> (July 23, 2018).

US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (August 01, 2018).

Table 1: Comparison of the clinical features of patients with duplication 12p described in literature and present case.

Clinical features	Allen et al., 1996 pter→p12.1	Zumkeller et al., 2004 pter→p11.2	De Gregori et al., 2005 p11.21→p13.31	Inage et al., 2010 12p12.3 →12p13.33	Izumi et al., 2012 p13.31	Poirsier et al., 2014 Patient 1 p13.33→p11.21	Present case p13.31→p11.1
Round face / full cheeks	+	+	+	+	+	+	+
Round face	+	+	NR	NR	+	+	+
Prominent forehead/Frontal	+	+	+	+	+	+	+
Hypertelorism	+	-	NR	+	NR	+	-
Epicanthus	+	-	NR	+	-	+	-
Occipital plane	NR	+	NR	-	+	NR	-
Short nose	+	+	+	+	+	+	+
Wide/Depressed nasal bridge	+	+	+	+	+	+	+
Anteverted nares	+	+	+	+	+	+	+
Long/deep philtrum	+	+	+	+	NR	+	+
Micrognathia	+	+	NR	+	-	+	+
Big mouth facing down	+	NR	+	+	+	+	+
Thin upper lip	+	+	NR	NR	NR	+	+
Inverted lower lip	+	+	+	+	+	+	+
Low-Eyed ears	-	-	+	+	+	+	-
Dysmorphic ears	+	+	NR	+	+	+	-
Short neck	NR	+	NR	NR	+	+	+
Hypotonia	+	-	NR	+	+	+	+
Seizure	+	+	NR	-	NR	-	+
Developmental delay	+	+	+	+	NR	+	+

+, feature present; -, negative feature; nr, not reported/not determined.

Figure 1 (A-B): Patient at 13 years. Note the frontal humps, flat cheeks, round face, full cheeks, short nose, low nasal bridge, thin upper lip and short neck.



Figure 2: **A**-GTG-banded karyotype of patient showing the normal and duplicated chromosome 12 (arrows). **B**-FISH metaphase using WCP probe for chromosome 12 of ONCOR® indicating a difference in size in one of the patient's homologous chromosome, the arrow indicates the duplication 12 p.

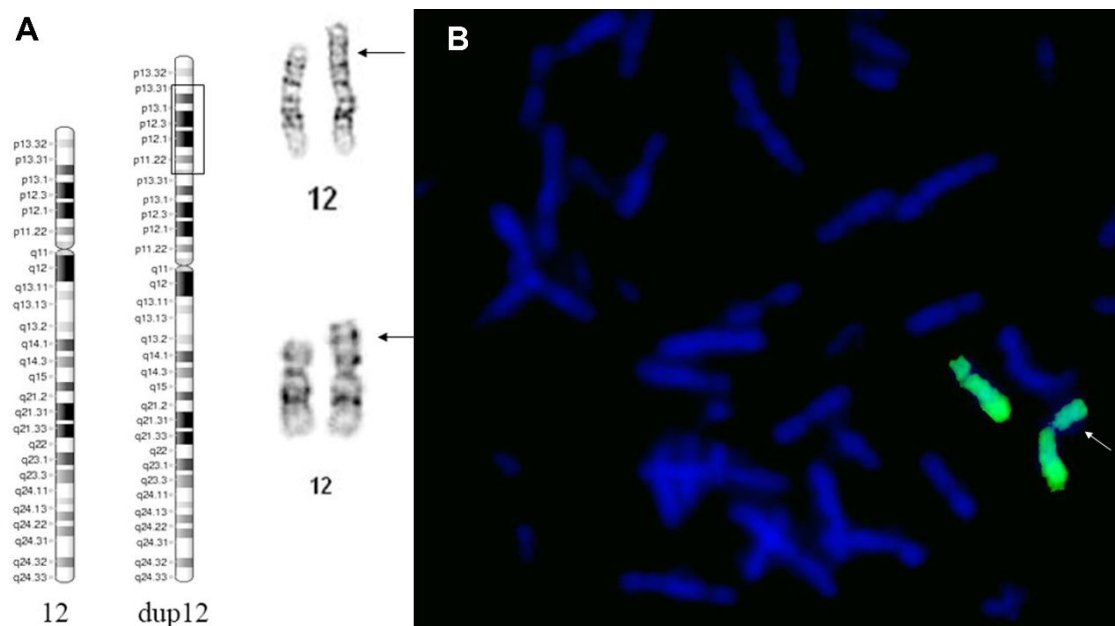
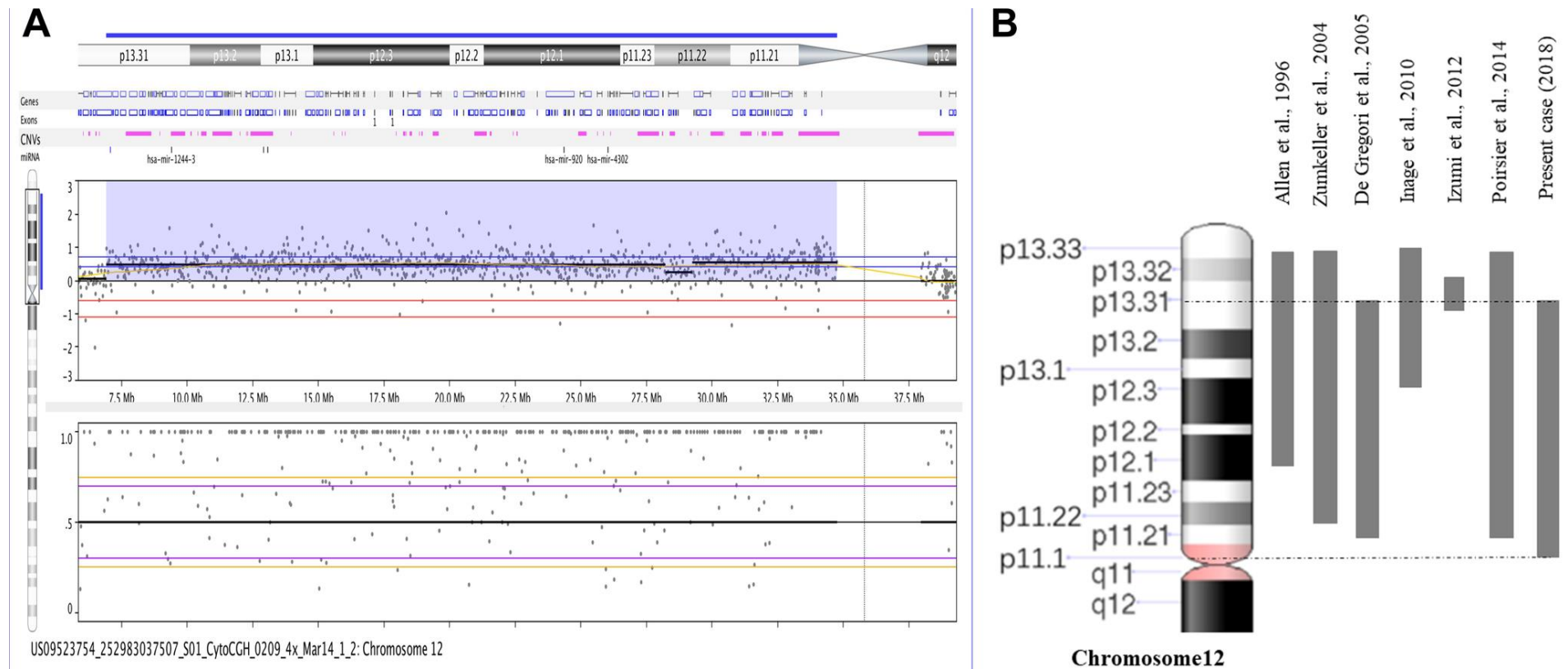


Figure 3: A-Array-CGH of chromosome 12, the color blue indicates the duplicated chromosomal region 12p13.32→p11.2 of ~28 Mb in size: B- Duplication 12p patients reported in the literature with chromosome region similar to that of the present case.



4.3. Artigo científico 03

Revista Científica: *Genetics and Molecular Biology*

Formato da publicação: *Short Communication*

Fator de impacto (2017/2018): 1.493

Status: Submetido a revista

Short Communication

Deleção 14q13.1-q13.3 na menor região sobreposta ao locus para holoprosencefalia (HPE8) em uma paciente com hemiface, incisivo central único e deficiência intelectual.

Jakeline Santos Oliveira¹, Tatiana Mozer Joaquim ², Rosana Aparecida. Bicudo da Silva¹, Deise Helena de Souza¹, Lúcia Regina Martelli², Danilo Moretti-Ferreira¹

¹ Universidade Estadual Paulista - Departamento de Genética, IBB/Unesp. Botucatu, São Paulo, Brasil.

² Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Departamento de Genética, FMRP-USP. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Subtítulo: Relato de caso de uma paciente com atraso do desenvolvimento com possível microforma de holoprosencefalia (HPE) caracterizada por *array*-CGH como portadora de uma microdeleção 14q13.1→q13.3.

Palavras-Chaves: Translocação cromossômica, deleção, cromossomo 14, holoprosencefalia, atraso de desenvolvimento.

Autor correspondente: Jakeline Santos Oliveira

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético

Botucatu/SP – CEP:18.618-000

E-mail: jakoliveira.jo@gmail.com

Resumo

As translocações aparentemente equilibradas são permutas de fragmentos cromossômicos entre cromossomos não-homólogos. O estudo compreendeu a descrição de uma paciente portadora de uma translocação aparentemente equilibrada envolvendo os cromossomos 1 e 14, apresentando os sinais clínicos de hemiface, incisivo central único, deficiência intelectual e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. A análise citogenética da paciente revelou o cariótipo 46,XX, t(1;14)(p36.2;q23). A caracterização genômica do rearranjo cromossômico na paciente foi realizada por meio da técnica de *array*-CGH, que revelou uma perda cromossômica arr[GRCh37]14q13.1-q13.3(14:34958898-37046989)x1 com aproximadamente 2,1 Mb de tamanho, contendo cerca de 22 genes; e uma perda cromossômica arr[GRCh37]Xp22.31(chrX:6424636-8131127)x1 com aproximadamente 1,7Mb de tamanho contendo 9 genes. A deleção da região cromossômica 14q13 é descrita como menor região sobreposta (SRO) ao *locus* HPE8 para o espectro de holoprosencefalia. 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, contribuindo com a correlação genótipo-fenótipo em casos de HPE com deleção no *locus* HPE8.

Rearranjos cromossômicos estruturais resultam em quebras cromossômicas seguida de reconstituição em uma combinação anormal. As translocações aparentemente equilibradas (TAEs), são alterações cromossômicas estruturais, em que ocorrem troca de

fragmentos cromossômicos entre cromossomos não-homólogos, sem perda ou ganho genéticos visíveis no cariótipo (Jacobs et al. 1992; Nowakowska et al. 2012).

Em muitos casos, portadores de uma translocação aparentemente equilibrada apresentam fenótipo normal. No entanto, tem sido relatado casos de portadores de translocações aparentemente equilibrada com anomalias fenotípicas. Isso pode ser atribuído a desequilíbrio de genes sensíveis à dosagem e formação de novo produto gênico devido à fusão gênica e alteração na organização nuclear dos cromossomos, além de possíveis deleções e duplicações cromossômicas agregadas (Ciccone et al. 2005; Zhang et al. 2013).

A investigação citogenômica, por meio da técnica de *array*-CGH (Hibridação Genômica Comparativa) permite a detecção de microdeleções e/ou microduplicações, não identificadas anteriormente no cariótipo de paciente portadores de translocações aparentemente equilibradas que apresentam fenótipos anormais como deficiência intelectual, autismo e/ou anomalias congênitas. Possibilitando a correlação genótipo-fenótipo e a identificação de genes possivelmente candidatos aos sinais clínicos de deficiência intelectual, autismo e/ou anomalias congênitas (South et al. 2013).

Deleções intersticiais envolvendo a região 14q13.1→q13.3 são raras. Pouco mais de dez casos foram descritos na literatura envolvendo essa região e todos os pacientes apresentavam alterações clínicas dentro do espectro da holoprosencefalia (HPE) (Piccione et al. 2012).

A HPE caracteriza-se pela clivagem incompleta do prosencéfalo em hemisférios, o que resulta em alterações morfológica e/ou funcional do sistema nervoso central (SCN) e anomalias faciais. Uma ampla variedade de gravidade para a HPE fora descrita. Dentre as características faciais associadas a HPE, as mais presentes são: ciclopia ou anoflalmia com probóscide, etmocefália, nariz de narina única, hipoplasia da face média com lábio

leposso e/ou palato, hipotelorismo e único incisivo central. Alguns indivíduos apresentam microformas de HPE, em que características leves de HPE não estão associadas a quaisquer anomalias craniofaciais, podendo apresentar características faciais normais (Rosenfeld et al. 2010).

A incidência de HPE em nascidos vivos é de 1: 16.000. Apresenta etiologia heterogênea e os fatores genéticos (como as anomalias genéticas) contribuem de 25-45% no papel etiológico da anormalidade (Segawa et al. 2007; Rosenfeld et al. 2010).

A associação do cromossomo 14 em humanos com a HPE origina-se de casos descritos em pacientes diagnosticados com HPE, que carregam uma deleção na banda citogenética 14q13, sugerindo que localizado nessa região esteja o *locus* para HPE8 (OMIM 609408). Os genes candidatos a HPE acarreta papéis fundamentais na formação da placa pré-cordal ou na padronização do tubo neural anterior e em estruturas craniofaciais (Kamnasaran et al. 2005).

Este estudo compreendeu a descrição clínica, análise citogenética e citogenômica de uma paciente portadora de hemiface, incisivo central único, deficiência intelectual e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, devido a uma translocação aparentemente equilibradas envolvendo o braço curto do cromossomo 1 e braço longo do cromossomo 14.

Aqui descrevemos uma paciente do sexo feminino, segunda filha de casal não consanguíneo, jovem e saudável, que têm mais um filho de 11 anos de idade e um filho de 7 anos de idade, ambos saudáveis. A gestação foi sem intercorrências, com pouca movimentação intrauterina, movimentação fetal relatada pela genitora apenas após o oitavo mês de gestação. Nasceu de parto cesariano sem intercorrência, com o peso de 3,350 Kg (p 50%), 50 cm (p 50%) e perímetro cefálico de 34 cm (p 50%).

Foi realizado o primeiro exame físico na paciente aos 9 anos e 7 meses observado peso de 34 Kg ($p < 75\%$), altura de 128 cm ($p < 25\%$) e perímetro cefálico de 48,5 cm ($p > 2\%$). Foram considerados na avaliação clínica: microcefalia, frontal estreito, hipertelorismo, assimetria de narinas (menor a esquerda) e de hemiface (discreta, detrimento a esquerda), lábio superior volumoso, presença de incisivo central único, cílios longos, consegue estruturar pequenas frases com troca e supressão de fonemas, bem como com voz bastante anasalada, marcha desequilibrada, deficiência intelectual, atraso do desenvolvimento e deficiência na fala. Foi informado que apresentou hipotonia com 1 ano de idade, sustentação cefálica aos 18 meses de vida, sentou com 2 anos, andou com 4 anos de idade e com essa idade iniciou as várias crises de pneumonia que se estenderam até os 6 anos de idade, começou a falar com 8 anos de idade (algumas palavras). Apresenta comportamento agitado, distúrbio do sono, ressonância magnética (RM) cerebral sem alterações, eletroencefalograma (EEG) com lentificação frontal direito sem crise convulsiva relatada, alteração oftalmológica como dacriostenose em olho direito e frequentes quedas. No *follow-up* realizado aos 20 anos de idade, foi observado que a paciente fala poucas palavras, apresenta atraso neuropsicomotor e deficiência intelectual diagnosticada de moderada à grave.

As análises cromossômicas foram realizadas após culturas temporárias de linfócitos de sangue periférico segundo a técnica de (Moorhead and Furman 1960), modificada. O bandamento GTG (300-550 bandas) da paciente e dos pais, seguiu a técnica de (Seabright 1971) e a de alta resolução (Yunis 1976), ambas modificadas. O cariótipo por bandamento GTG da paciente apresentou o resultado 46,XX, t(1;14)(p36.2;q23). Os cariótipos dos pais foram normais. A técnica da FISH foi realizada segundo o protocolo do fabricante da sonda utilizada e confirmou-se que a translocação aparentemente equilibrada envolveu apenas os cromossomos 1 e 14.

Para a realização da técnica de citogenômica foi feita a extração de DNA pelo método *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit – Epicentre (US)*, a partir de 200 µL de sangue total coletado da paciente, seguindo as recomendações do fabricante. A técnica de *array-CGH*, foi realizada utilizando a plataforma *GenetiSure CGH + SNP 4x180k (Agilent)*. Os dados foram analisados com o auxílio do *software Nexus Copy Number (Biodiscovery)* versão 8.0, considerando como genoma de referência o GRCh37/hg19. A análise citogenômica revelou a perda genética de 2088092 pb (~2,1 Mb) na região cromossômica arr[GRCh37]14q13.1-q13.3(14:34958898-37046989)x1, que abrange cerca de 22 genes e a perda genética de 17,064,92 (1,7 Mb) na região cromossômica arr[GRCh37]Xp22.31(chrX:6424636-8131127)x1, que contém 9 genes. Nenhuma alteração estrutural foi vista no cromossomo 1 da paciente. O ponto de quebra vista no cariótipo na região 14q23 difere em aproximadamente em 200 Mb em comparação com o ponto de quebra caracterizado por *array-CGH* na região 14q13.1. Nós presumimos que a deleção 14q13.1→q13.3 foi em decorrência da translocação aparentemente equilibrada. Para a investigação das CNVs (*Copy Number Variation*) associadas a variações genômicas do tipo de perda/deleção, os resultados da técnica de *array-CGH* foram interpretados por meio de repositórios de banco de dados *onlines*, tais como: como o UCSC *Genome Browser* (GRCh37/hg19), o DGV, o DECIPHER, o OMIM e o PUBMED.

Foram descritas no banco de dados DECIPHER cerca de 29 CNVs do tipo de perda/deleção envolvendo a região 14q13.1-q13.3, dentre essas 29 CNVs encontradas sete casos (IDs: 286741, 289774, 293331, 300434, 337740, 351794 e 351794) foram de CNVs classificadas como patogênicas e a maioria dos sinais clínicos descritos nos pacientes foram microcefalia, anomalias oftalmológicas, hipertonia, quedas frequentes, deficiência intelectual e atraso do desenvolvimento. Estes sinais clínicos também estão

presentes na nossa paciente. Na maioria dos casos, das CNVs patogênicas de perda estão sobrepostas aos genes *CFL2* (*cofilin 2*, Gene ID: 1073), *BAZ1A* (*bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A*, Gene ID: 11177) e *SNX6* (*sorting nexin 6*, Gene ID: 58533). Esses genes estão correlacionados com doenças neurológicas, como atraso do desenvolvimento, deficiência intelectual e espectro holoprosencefalia (HPE) (Kamnasaran et al. 2001; Miller et al. 2010).

A microdeleção da região cromossômica 14q13.1→q13.3 presente na nossa paciente é compatível com a menor região sobreposta (SRO) 14q13.1→14q13.3 referente ao *locus* HPE8 para a HPE (Rosenfeld et al. 2010; Piccione et al. 2012). Os estudos realizados por Kamnasaran e col. (2005), Shimojima e col. (2009) e Rosenfeld e col. (2010) apontam os genes *EAPP*, *SNX6*, *TULIP1* e *NKX2*, inseridos na região 14q13, como potenciais genes candidatos a HPE quando em haploinsuficiência, uma vez que as funções genicas dos genes inseridos na região 14q13, são semelhantes as funções dos genes *SHH* (7q36), *ZIC2* (13q32), *SIX3* (2p21) e *TGIF1* (18q11.3) descritos como principais causadores a HPE. Em nossa paciente os genes *EAPP*, *SNX6*, *TULIP1* e *NKX2* estão deletados.

O gene *EAPP* (*E2F associated phosphoprotein*, Gene ID: 55837) codifica a fosfoproteína nuclear que interage com várias proteínas da família E2F de fatores transcricional, aumentando a atividade de vias regulatórias de promotores no ciclo-celular de maneira dependente de E2F, estimulando assim a proliferação celular. Níveis aumentados do gene *EAPP* vem sendo correlacionado como contribuinte ao desenvolvimento de tumores, porém estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese (Schwarzmayr et al., 2008). Sabe-se que este gene vem sendo apontado como candidato a HPE devido a sua alta expressão no cérebro em humanos (Kamnasaran et al., 2005).

O gene *SNX6* codifica a proteína PX-BAR, que desempenha papéis importantes no transporte vesicular retrógrado. Achados recentes revelam que este gene possui papel fisiológico em neurônios excitatórios do Sistema Nervoso Central- SNC, e que alterações neste gene pode estar associada a *déficits* de aprendizagem espacial e de memória (Niu et al. 2017).

Shimojima e col. (2009) descreveram uma paciente do sexo feminino com atraso de desenvolvimento e epilepsia intratável caracterizada pela técnica de *array*-CGH com deleção 14q13.1-q13.3. O estudo associa o gene *TULP1* (*ral GTPase activating protein catalytic alpha subunit 1*(*RALGAPA1*), Gene ID: 253959) as manifestações neurológicas presente na paciente, por meio de ensaios experimentais em zebrafish a diminuição da expressão de *TULP1* gerou-se alterações no prosencéfalo resultando em atraso do desenvolvimento cerebral. Este gene é responsável por produzir a proteína Rap-GTPase que regula a transcrição de genes da imunoglobulina, além do desempenhar funções no músculo esquelético (contração muscular). Em nossa paciente não foi relatado convulsões e epilepsia.

O gene *NKX2-1* (*NK2 homeobox 1*, Gene ID: 7080), codifica a proteína identificada inicialmente como um fator de transcrição específico para genes da tireoide, mas posteriormente foi demonstrado que também regula a expressão de genes envolvidos na morfogênese. Este gene é essencial para a especificação da região tuberal, a eminência mediana e toda a hipófise, além de evidências que *NKX-2* também é necessário para o desenvolvimento de regiões pré-óticas e mamilares (Alvarez-Bolado 2018). Várias doenças, como coreia hereditária benigna (OMIM: 118700), coreoatetose, hipotireoidismo congênito (OMIM: 610978), desconforto respiratório neonatal e mutações em cânceres de tireoide (OMIM: 188550) e de pulmão foram associadas ao gene *NKX-2* (Piccione et al. 2012).

O estudo realizado por Rosenfeld e col. (2010) descreveu sete indivíduos caracterizados com deleções no braço longo do cromossomo 14, em quatro pacientes (2,3,4 e 5) as deleções foram na menor região sobreposta (SRO) ao *locus* HPE8 e os sinais clínicos apresentados foram compatíveis para HPE ou microforma de HPE (Figure 3B). Os sinais clínicos presentes em nossa paciente como microcefalia, assimetria de narinas (menor a esquerda) e de hemiface (discreta, detrimento a esquerda), incisivo central único, eletroencefalograma (EEG) com lentificação frontal direito, alteração oftalmológica como dacriostenose em olho direito, atraso de fala, deficiência intelectual e atraso do desenvolvimento, apresenta similaridade com os sinais clínicos descritos na literatura, desta forma nós apontamos como hipótese diagnóstico a microforma de HPE (Table 1).

O amplo fenótipo e as microformas observadas nos pacientes com HPE se deve aos múltiplos fatores (genéticos, ambientais e a interação de ambos) envolvidos na patogenicidade dessa doença, uma vez que outros fatores que influenciam o fenótipo ainda são desconhecidos. A deleção dos potenciais genes, *EAPP*, *SNX6*, *TULIP1* e *NKX2*, candidatos a HPE ainda é controverso na literatura, uma vez que apenas a deleção ou mutações não são suficientes para causar a HPE, visto que a penetrância incompleta de genes ou a expressividade variável podem ser determinantes para o espectro em HPE como visto em casos de HPE com herança autossômica dominante (Rosenfeld et al. 2010; Piccione et al. 2012).

Assim como em nossa paciente, maioria dos desequilíbrios genômicos em HPE foram descritos como *de novo*, e em poucos casos foram decorrentes de herança autossômica dominante, que em geral apresenta fenótipo acentuado e característico de HPE ou por decorrência de uma mal segregação devido ao um rearranjo cromossômico balanceado em um dos parentais (Rosenfeld et al. 2010).

A alteração cromossômica encontrada na região cromossômica arr[GRCh37]p22.31(chrX:6424636-8131127)x1, que contém a banda cromossômica, compreende a um achado “incidental” em nossa paciente. Inicialmente o interesse da investigação por meio da técnica de *array-CGH* seria em descrever o ponto de quebra cromossômica e possível perda e/ou ganho adicional envolvidas na translocação aparentemente equilibrada t(1;14). Os achados incidentais em genética clínica são ditos como qualquer alteração genômica em que inicialmente não seria a principal causa da investigação clínica (Watson 2013).

Na região Xp22.31 estão inseridos os genes: *VCX3A*, *PUDP*, *STS*, *MIR4767*, *VCX*, *PNPLA4* e *MIR651*. No DECIPHER cerca de 183 CNVs do tipo de perda/deleção envolvendo esta região foram descritas e 45 CNVs foram classificadas como patogênicas, sobrepondo os genes *VCX3A*, *STS* e *VCX* e a maioria dos sinais clínicos descritos foram ictiose, comportamento autista, atraso de fala e deficiência intelectual, similares a nossa paciente, exceto a ictiose, pois nenhuma alteração na pele foi observada na paciente. Os genes *VCX3A* e *STS* foram descritos alterados em doenças neurológicas (Jiao et al. 2009; Wang et al. 2017).

O gene *VCX3A* (*variable charge X-linked 3*, Gene ID: 51481) codifica a proteína VCX-A, responsável pela regulação pós-transcricional do mRNA, evitando sua decomposição e decadência. Desta forma, VCX-A é capaz de modular a estabilidade e tradução de mRNAs alvos envolvidos na neogênese, sendo plausível que na ausência do gene *VCX* ocorra comprometimento dessas funções, contribuindo para um fenótipo de deficiência intelectual (Jiao et al. 2009).

O gene *STS* (*steroid sulfatase*, Gene ID: 412) codifica a proteína de transmembrana localizada no retículo endoplasmático correspondente à sulfatase, que hidrolisa vários sulfatos precursores metabólicos de estrogênios, andrógenos e colesterol.

O estudo realizado por Wang et al. (2017) examinou as relações entre os polimorfismos do gene *STS*, a desidroepiandrosterona (DHEA) e a sua forma sulfatada (DHEA-S), bem como as características do transtorno de *déficit* de atenção/hiperatividade (TDAH). Neste estudo, colabora com a descoberta do papel potencial na patogênese biológica subjacente do TDAH em relação aos polimorfismos *STS* e aos níveis de neurosteróides (Wang et al. 2017).

Em conclusão, os sinais clínicos presentes em nossa paciente em similaridade com os descritos na literatura e a deleção das bandas cromossômicas 14q13.1-q13.3 (inserida na menor região (SRO) para o *locus* de HPE8) permitiram estabelecer o diagnóstico como microforma de HPE, contribuindo com a correlação genótipo-fenótipo em casos de HPE com deleção no *locus HPE8*. Por meio da técnica de *array*-CGH foi possível detectar CNVs de perda do tipo *de novo* que foram relevantes para a correlação genótipo-fenótipo na paciente.

Agradecimentos

Nós agradecemos a paciente e os responsáveis pela contribuição na pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do IBB. O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Referências Bibliográficas

Alvarez-Bolado G (2018) Development of neuroendocrine neurons in the mammalian hypothalamus. *Cell Tissue Res* 1–17.

Ciccone R, Giorda R, Gregato G, Guerrini R, Giglio S, Carrozzo R, Bonaglia MC,

Priolo E, Laganà C, Tenconi R et al. (2005) Reciprocal translocations: A trap for

cytogenetists? *Hum Genet* 117:571–582.

Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C and White H (1992) Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29:103–108.

Jiao X, Chen H, Chen J, Herrup K, Firestein BL and Kiledjian M (2009) Modulation of Neuritogenesis by a Protein Implicated in X-Linked Mental Retardation. *J Neurosci* 29:12419–12427.

Kamnasaran D, Chen CP, Devriendt K, Mehta L and Cox DW (2005) Defining a holoprosencephaly locus on human chromosome 14q13 and characterization of potential candidate genes. *Genomics* 85:608–621.

Kamnasaran D, O'Brien PCM, Schuffenhauer S, Quarrell O, Lupski JR, Grammatico P, Ferguson-Smith MA and Cox DW (2001) Defining the breakpoints of proximal chromosome 14q rearrangements in nine patients using flow-sorted chromosomes. *Am J Med Genet* 102:173–182.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ et al. (2010) Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749–764.

Moorhead ED and Furman NH (1960) A Chronopotentiometric Study of Gallium. *Anal Chem* 32:1507–1509.

Niu Y, Dai Z, Liu W, Zhang C, Yang Y, Guo Z, Li X, Xu C, Huang X, Wang Y et al. (2017) Ablation of SNX6 leads to defects in synaptic function of CA1 pyramidal

neurons and spatial memory. *Elife*.

- Nowakowska BA, De Leeuw N, Ruivenkamp CAL, Sikkema-Raddatz B, Crolla JA, Thoelen R, Koopmans M, Den Hollander N, Van Haeringen A, Van Der Kevie-Kersemaekers AM et al. (2012) Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet* 20:166–170.
- Piccione M, Serra G, Consiglio V, Di Fiore A, Cavani S, Grasso M, Malacarne M, Pierluigi M, Viaggi C and Corsello G (2012) 14q13.1-21.1 deletion encompassing the HPE8 locus in an adolescent with intellectual disability and bilateral microphthalmia, but without holoprosencephaly. *Am J Med Genet Part A* 158 A:1427–1433.
- Rosenfeld JA, Ballif BC, Martin DM, Aylsworth AS, Bejjani BA, Torchia BS and Shaffer LG (2010) Clinical characterization of individuals with deletions of genes in holoprosencephaly pathways by aCGH refines the phenotypic spectrum of HPE. *Hum Genet* 127:421–440.
- Schwarzmayr L, Andorfer P, Novy M and Rotheneder H (2008) Regulation of the E2F-associated phosphoprotein promoter by GC-box binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2845–2853.
- Seabright M (1971) a Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. *Lancet* 298:971–972.
- Segawa Y, Itokazu N, Hirose A, Nakagawa S and Takashima S (2007) A Case of Partial 14q- with Facial Features of Holoprosencephaly and Hydranencephaly. *Pediatr Neurol* 37:51–54.

- Shimojima K, Komoike Y, Tohyama J, Takahashi S, Páez MT, Nakagawa E, Goto Y, Ohno K, Ohtsu M, Oguni H et al. (2009) TULIP1 (RALGAPA1) haploinsufficiency with brain development delay. *Genomics* 94:414–422
- South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW and Kearney HM (2013) ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: Revision 2013. *Genet Med* 15:901–909.
- Wang LJ, Chan WC, Chou MC, Chou WJ, Lee MJ, Lee SY, Lin PY, Yang YH and Yen CF (2017) Polymorphisms of STS gene and SULT2A1 gene and neurosteroid levels in Han Chinese boys with attention-deficit/hyperactivity disorder: An exploratory investigation. *Sci Rep* 7:1–9.
- Watson M (2013) Incidental findings in clinical genomics: A clarification. *Genet Med* 15:664–666.
- Yunis JJ (1976) High resolution of human chromosomes. *Science* (80-) 191:1268 LP-1270.
- Zhang C, Leibowitz ML and Pellman D (2013) chromosomal rearrangements Chromothripsis and beyond : rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. 2513–2530.

Internet Resources Section

- Nexus software, <http://www.biodiscovery.com/nexus-copy-number/> (November 14 of 2017).
- UCSC genome Browser , <https://genome.ucsc.edu/> (July of 2018).
- Database of Genomic Variants (DGV), <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home> (July of 2018).

Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER), <https://decipher.sanger.ac.uk/> (August of 2018).

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://omim.org/> (August of 2018).

US National Library of Medicine National Institutes of Health (PubMed), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (August of 2018).

Table 1: Comparason of the clinical features and genetic findings of the reported cases of deletions the 14q13.1 loci HPE8 described in literature and present case.

Clinical features	Shimajima et al. (2009) 14q13.1-q13.3	Rosenfeld et al. (2010) Patient 2 14q12-q21.1	Rosenfeld et al. (2010) Patient 3 14q12.2-q21.1	Rosenfeld et al. (2010) Patient 4 14q12-q13.3	Rosenfeld et al. (2010) Patient 5 14q13.1-q21.1	Piccione et al. (2012) 14q13.1-q21.1	Present case (2018) 14q13.1-q13.3
HPE type	NR	HPE of unspecified type	Microform	Microform	Microform	-	Microform
Delelopmental retardation	+	NR	NR	NR	NR	+	+
Microcephaly	-	+	+	-	+	-	+
Corpus callosum anormalities	-	NR	Thim	Small volume	Absence of rostrum	-	NR
Other CNS abnormalities	Mild brain atrophy	NR	Colpocephaly	-	Pituitary Ratheke's cleft cyst	-	EEG with right frontal lag
Neurosensorial defects	-	NR	-	-	-	Greatly reduced right optic nerve size; hypoplastic optic chiasma	Dacryostenosis in the right eye
Other neurological abnormalities	Hypotonia, intractable seizures	NR	Incomplete septum pellucidum	-	-	Hypertonia of the upper and lower limbs	Hypotonia

Facial dysmorphisms	-	NR	Single central incisor	-	Midface hypoplasia higt palate	Bilateral microphthalmia and colome, elongated facies, mandibular prognthism enlarged nose with anteverted nares	Asymmetry of the nostrils (minor to the left), hemifacial (discrete, detrimental to the left) and single central incisor
Parental origin of deletion	Pat	Dn	NR	Dn	Dn	Dn	Dn
Gender	Female	Female	Female	Female	Female	Male	Female

+, present; -, absent; NR, not reported; Pat, paternally derived; Dn, *de novo*.

Figure 1 (A-B): Pictures of the 20-year-old patient. The patient has a single central incisor. Facial and hands changes.



Figure 2: A-GTG-banded karyogram of patient indicates the translocation t (1; 14) (p36.2; q23). **B-** Image of the FISH technique (CYTOCELL® probe). The red and blue arrow indicates that the chromosomes involved in the translocation are only chromosomes 1 (Green Fluorophore) and 14 (Red Fluorophore).

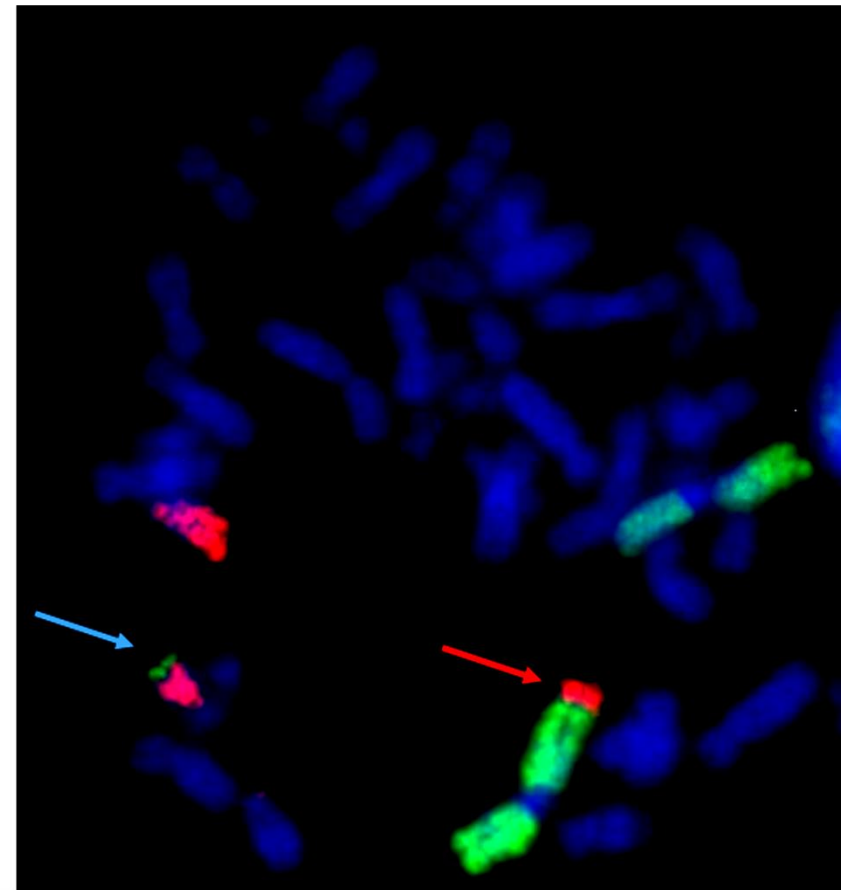
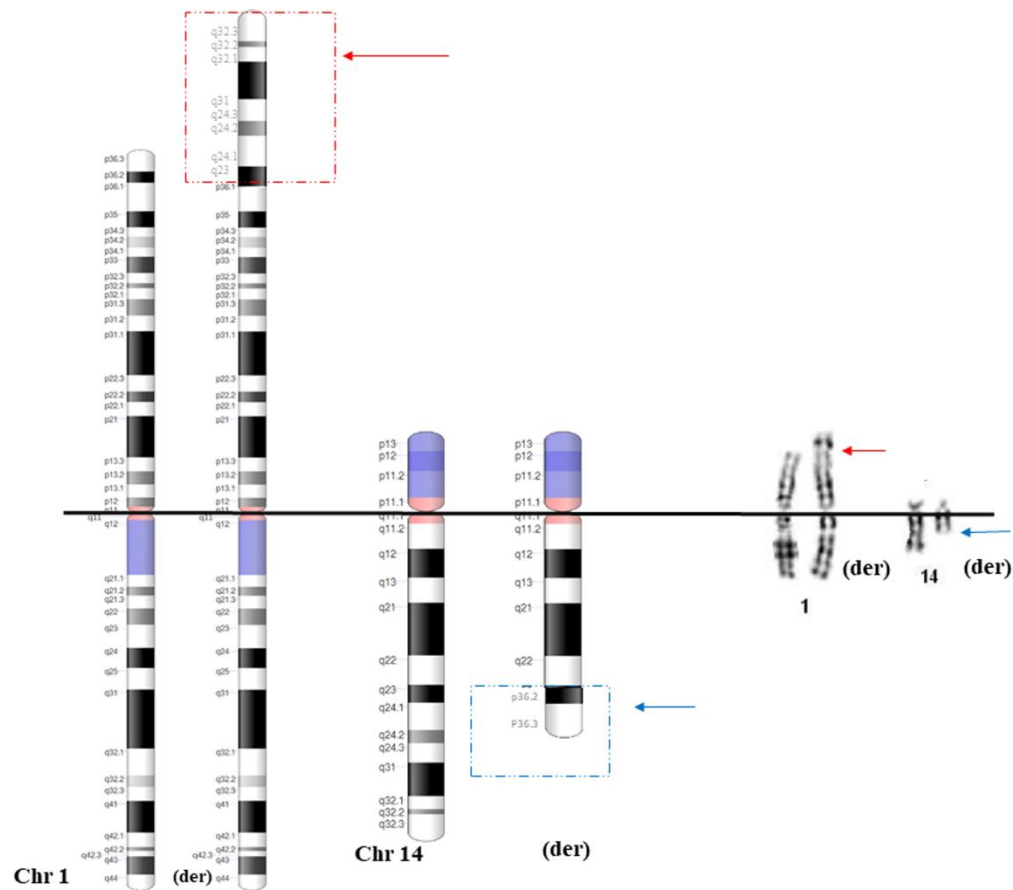
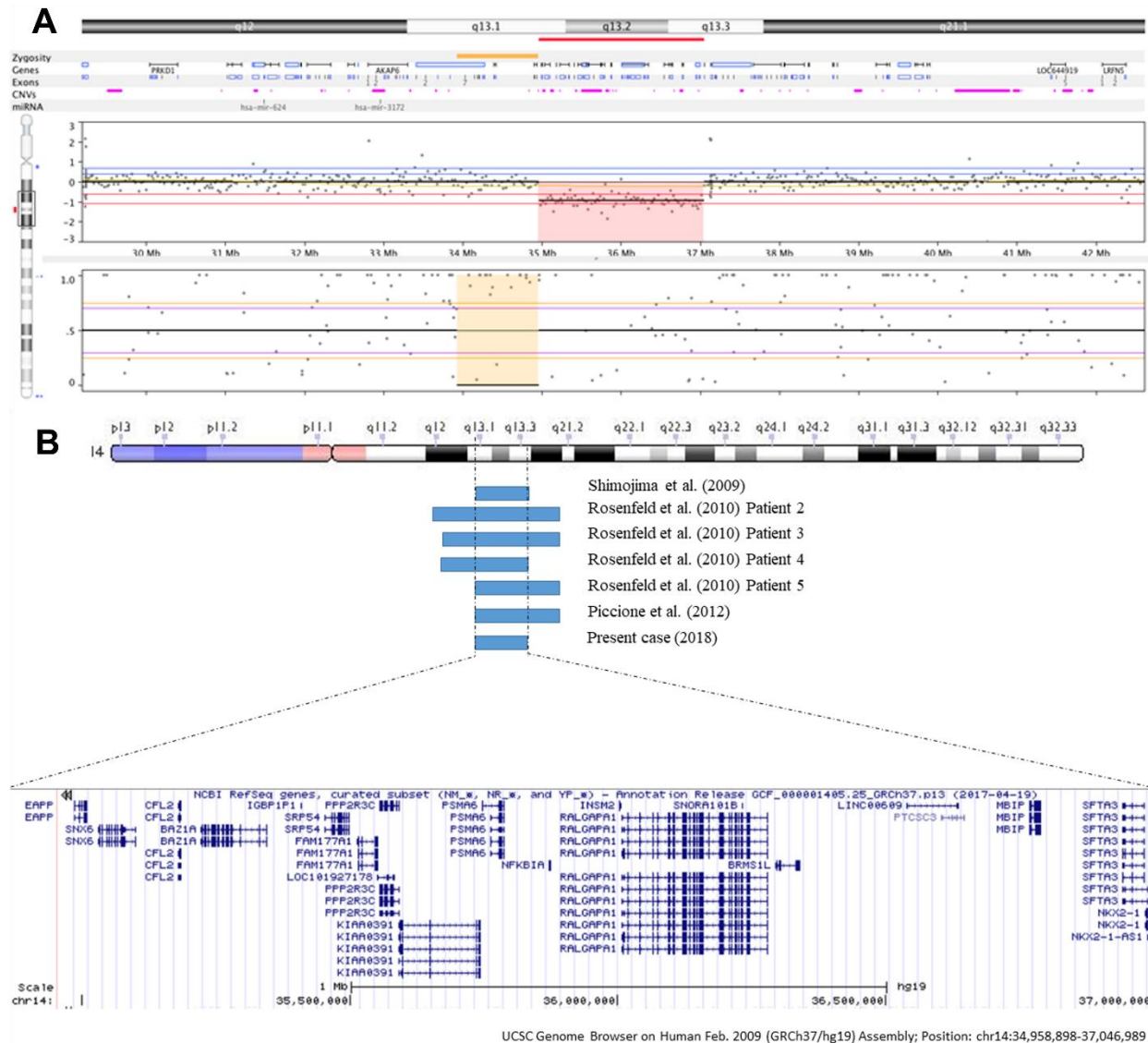


Figure 3: A-Analysis by aCGH showing the genetic loss / deletion of 2088092 bp (~ 2, 1 Mb) in chromosomal region arr[GRCh37]14q13.1-q13.3(14:34958898-37046989)x1, cytogenetic bands q13.1-q13.3. **B-** Deletion in chromosome 14 patients reported in the literature with region chromosome similar the present case.



Supplementary Materials

Figure 4: Analysis by aCGH (GenetiSure CGH + SNP 4x180k platform - Agilent) and interpretation by the Nexus Copy Number (Biodiscovery) software Version 8.0. The region p13.1-13.3 (indicated in red) of chromosome 14, characterized by means of aCGH as the chromosome breakpoint compared to the breaking point described by the GTG banding technique that was t (1; 14) (p36.2; q23) (indicated in blue), the breakpoint differed by ~ 200 Mb.

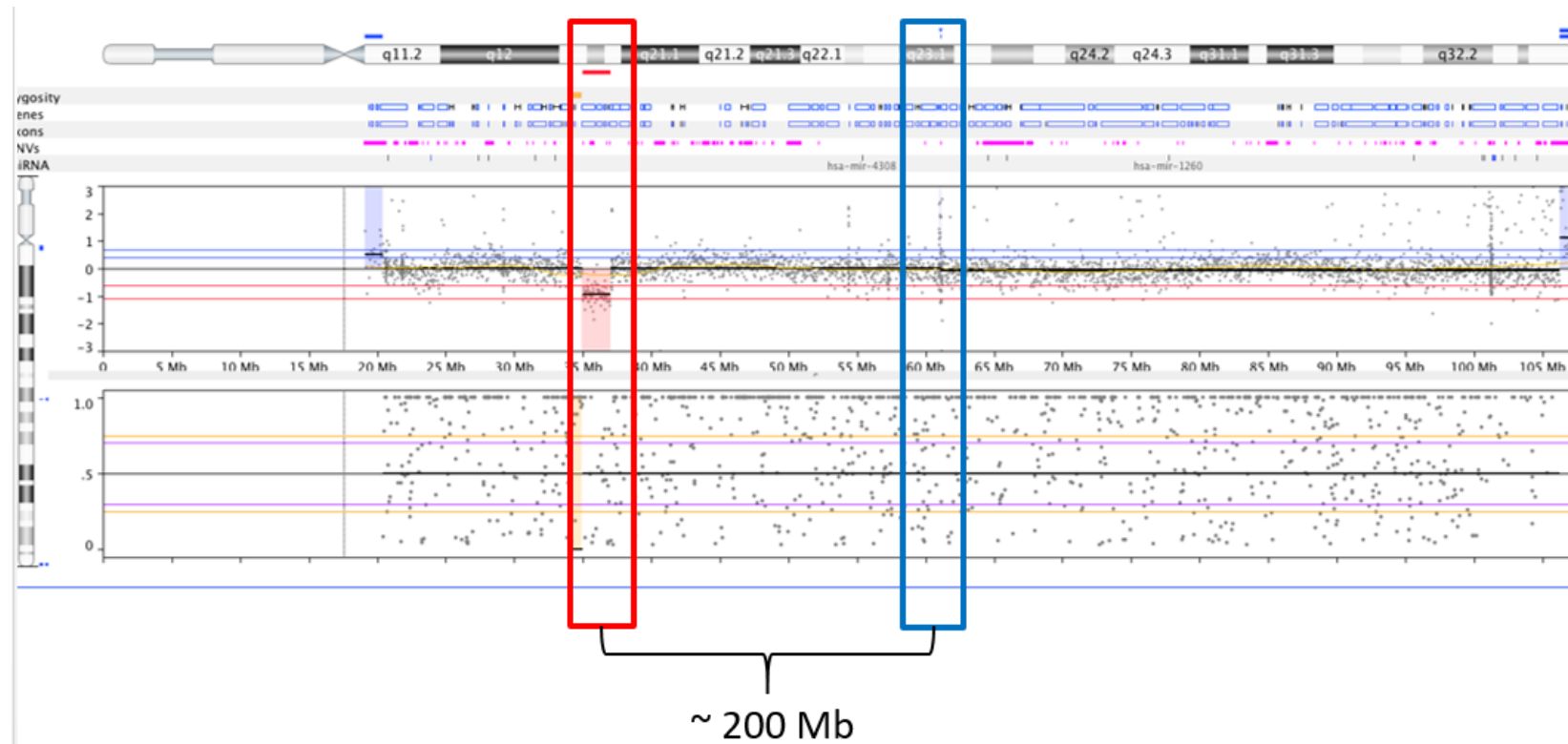
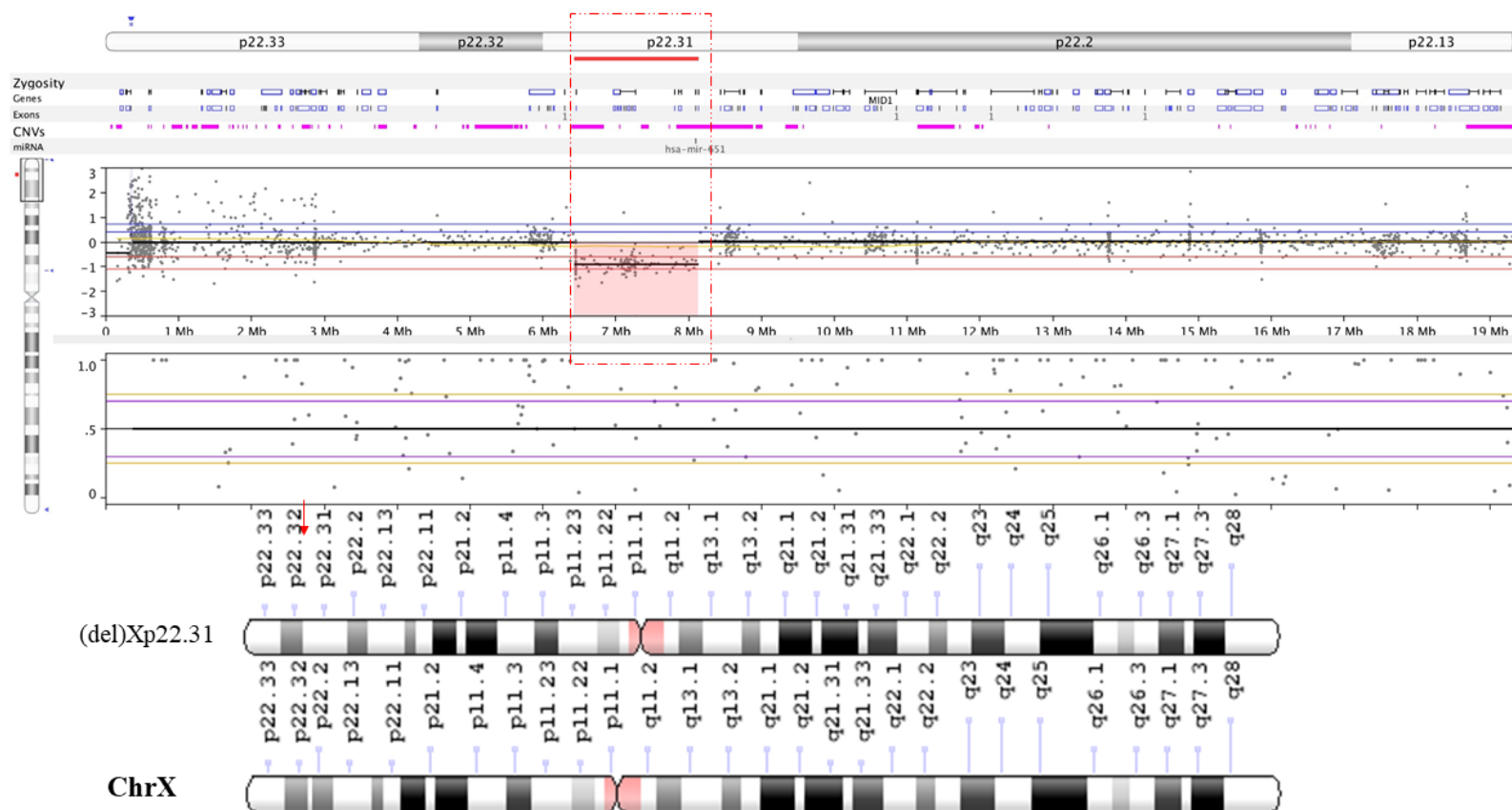


Figure 5: Analysis by aCGH showing the genetic loss/deletion of 17,064,92 (1,7 Mb) na região cromossômica arr[GRCh37]Xp22.31(chrX:6424636-8131127)x1 (in red).



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 *online*s, 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.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A: TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/2012

(Para Responsável Legal – Pacientes incapazes)

CONVIDO, o Senhor (a) _____ responsável pelo paciente _____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Relatos de casos: Pequeno cromossomo marcador supernumerário sSMC (6) e dup 6q parcial em uma criança com displasias esqueléticas, atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual; Duplicação parcial 12p em uma paciente com características dismórficas e atraso no desenvolvimento; e Translocação aparentemente equilibrada t(1;14) em uma paciente com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor”, que será desenvolvido por mim Jakeline Santos Oliveira, mestrandia do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), com orientação do Professor Dr. Danilo Moretti-Ferreira, adjunto do Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu IBB/Unesp.

Estou estudando atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual em portadores de alterações cromossômicas. Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso coletar 3ml do sangue do paciente _____ com a qual será realizada as seguintes técnicas: cariótipo por bandamento GTG, Hibridização in situ por Fluorescência (FISH) e array-CGH. O risco com a coleta de sangue será a picadinha da agulha e poderá ocorrer uma mancha roxa que desaparecerá bem rapidamente.

Informo que o material biológico colhido do paciente, não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada no Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) do Departamento de Genética-IBB/Unesp. Para reutilização desse material será escrito um novo projeto de pesquisa, com um novo termo de consentimento para que o Senhor (a) assine nova autorização para utilização desse material.

Solicito também seu consentimento para consultar o prontuário médico do paciente acima especificado, para coletar outras informações lá contidas como exames de imagens (Raio-X, Ressonância magnética e Tomografia Computadorizada), referentes a consultas feitas anteriormente realizada com o paciente.

Na qualidade de responsável pelo paciente o(a) Senhor (a) responderá um questionário a respeito do paciente, que levará uns 15 (quinze) minutos de duração.

Os benefícios da participação do paciente será a compreensão dos sinais clínicos decorrentes de alterações cromossômicas, que poderá predizer o melhor tratamento ao paciente, com base em casos semelhantes descritos na literatura científica. Além

contribuições para a pesquisa científica a respeito de tais alterações cromossômicas, após os pesquisadores terem o conhecimento dos resultados da pesquisa.

Informo que a participação do paciente neste estudo é voluntária e que mesmo após o senhor ter dado o consentimento para que o mesmo participe da pesquisa, o senhor poderá retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO na qualidade de “Representante Legal” do paciente acima mencionado, SUA PARTICIPAÇÃO de forma voluntária, estando ciente que todos os seus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Representante Legal pelo Participante da Pesquisa

Mestranda: Jakeline Santos Oliveira

Endereço: Rua Coronel José Vitoriano Villas-Boas , 55 apt 11A – Centro Botucatu/SP
CEP 18600-130. Fone: (14) 99103-2236. E-mail: jakoliveira.jo@gmail.com

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Genética –
Serviço de Aconselhamento Genético Botucatu/SP – CEP:18.618-000. Fone: (14) 3880
0376 / 9754-5963. E-mail: sag@fmb.unesp.br

7.2. Anexo B: Termo de consentimento para publicação científica

Termo de Autorização

Eu, _____
____portador do R. G. _____(responsável pelo paciente)
autorizo a publicação de fotos completas e resultados clínicos do paciente,
_____, em
revistas científicas que circulam entre profissionais da saúde que tenham interesse
nesta área. Sempre que ocorrerem publicações científicas a minha identidade e a do
paciente ao qual sou responsável, serão mantidas em absoluto sigilo, somente
pesquisadores da área terão acesso aos dados completos, não sendo permitido, em
nenhuma hipótese, o acesso dos dados por terceiros.

Todos os resultados estarão disponíveis no prontuário do paciente do Serviço de
Aconselhamento Genético de Botucatu.

Assim, declaro haver recebido as devidas explicações a respeito, estar ciente sobre as
informações acima mencionadas e que minha participação é voluntária por opção
própria.

Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo paciente

Dr. Danilo Moretti-Ferreira
Diretor do SAG
Fone: (14) 3815-3131
Endereço: Distrito de Rubião Jr. s/n
Serviço de Aconselhamento Genético- Departamento de Genética
Instituto de Biociências de Botucatu-IBB/Unesp
Botucatu/SP- CEP: 18618970
E-mail: sag@fmb.unesp.br

7.3. Anexo C: Aprovação CEP-FMB/Unesp

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relatos de casos: Duplicação parcial 12p em uma paciente com características dismórficas e atraso no desenvolvimento; e Translocação aparentemente equilibrada t(1;14) em uma paciente com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor

Pesquisador: Jakeline Santos Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 98471218.5.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Genética

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.007.674

Apresentação do Projeto:

Trata-se de relato de casos de projeto intitulado “Duplicação parcial 12p em uma paciente com características dismórficas e atraso no desenvolvimento; e Translocação aparentemente equilibrada t(1;14) em uma paciente com atraso do desenvolvimento neuropsicomotor” a ser conduzido pela acadêmica Jakeline Santos Oliveira sob orientação da Prof Dr Danilo Morreti Ferreira do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu.

Projeto enquadrado na Área Temática Especial: Genética Humana (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP).

O estudo propõe-se a descrever dois casos de alterações cromossômicas sem diagnóstico síndrome utilizando técnicas de citogenética, biologia molecular, citogenômica e bioinformática. Os pacientes incluídos serão uma paciente com características dismórficas e atraso do desenvolvimento que supostamente apresenta duplicação 12p e, uma paciente com atraso de fala e do desenvolvimento com translocação aparentemente equilibrada.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar as alterações cromossômicas sem diagnóstico sindrômico definido, por meio das técnicas de citogenética clássica, molecular e citogenômica em estudos de relato de caso em uma paciente com características dismórficas e atraso do desenvolvimento que supostamente apresenta duplicação parcial no cromossomo 12; e em uma paciente com translocação aparentemente equilibrada com atraso da fala e do desenvolvimento.

Correlacionar o genótipo/fenótipo das pacientes afim de se gerar publicações científicas (Relato de Caso).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores afirmam que o risco se deve ao acesso a informação genética de todo o genoma das pacientes, no entanto, a investigação genômica será realizada somente para a pesquisa das alterações cromossômicas encontradas nas pacientes, as quais alteram o fenótipo clínico.

Como benefício haverá a possibilidade do entendimento da afecção genética e o aconselhamento genético adequado, bem como, melhorias na qualidade de vida da paciente e de seus familiares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Segundo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde foram apresentados todos os documentos obrigatórios.

Recomendações:

Adequar o título do projeto no regulamento apresentado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 05 de novembro de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Continuação do Parecer: 3.007.674

técnicas de citogenética clássica, molecular e citogenômica em estudos de relato de caso em uma paciente com características dismórficas e atraso do desenvolvimento que supostamente apresenta duplicação parcial no cromossomo 12; e em uma paciente com translocação aparentemente equilibrada com atraso da fala e do desenvolvimento.

Correlacionar o genótipo/fenótipo das pacientes afim de se gerar publicações científicas (Relato de Caso).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores afirmam que o risco se deve ao acesso a informação genética de todo o genoma das pacientes, no entanto, a investigação genômica será realizada somente para a pesquisa das alterações cromossômicas encontradas nas pacientes, as quais alteram o fenótipo clínico.

Como benefício haverá a possibilidade do entendimento da afecção genética e o aconselhamento genético adequado, bem como, melhorias na qualidade de vida da paciente e de seus familiares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Segundo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde foram apresentados todos os documentos obrigatórios.

Recomendações:

Adequar o título do projeto no regulamento apresentado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 05 de novembro de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Continuação do Parecer: 3.007.674

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1215570.pdf	15/10/2018 16:55:18		Aceito
Parecer Anterior	resposta_parecer.pdf	15/10/2018 16:54:02	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrep_relatosdecasos.docx	15/10/2018 16:53:46	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_novo.pdf	15/10/2018 16:53:23	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/09/2018 21:42:06	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	portaria_14_2013_ibb_unesp.pdf	10/09/2018 21:41:41	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaDepartamento.pdf	10/09/2018 21:41:04	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	10/09/2018 21:38:28	Jakeline Santos Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 08 de Novembro de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA

(Coordenado

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pequeno cromossomo marcador supernumerário sSMC (6) e dup 6q parcial em uma criança com displasias esqueléticas, atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual

Pesquisador: Jakeline Santos Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 96379318.0.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Genética

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.007.729

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora descreve que as Aberrações Cromossômicas (Acs) são alterações que incluem trissomias, grandes deleções e/ou duplicações cromossômicas, cromossomos em anel, translocações, inversões e rearranjos cromossômicos múltiplos, que resultam em síndromes complexas com manifestações fenotípicas e envolvimento de múltiplos genes. As Acs, na maior parte das vezes, são identificadas em crianças com sinais clínicos suspeitos, como malformações congênitas, atraso do desenvolvimento, deficiência mental, anomalias do crescimento, e em casais com recorrentes abortos espontâneos.

Os cromossomos marcadores, pequenos cromossomos marcadores supernumerários (sSMC), são definidos como cromossomos estruturalmente anormais caracterizados somente por técnicas citogenéticas moleculares, cuja frequência na população geral é de 7,9/10.000 nascidos vivos.

A trissomia parcial do braço curto do cromossomo 6 é considerada rara e embora haja diferentes tamanhos de duplicações envolvidas nas trissomias 6p, as características fenotípicas incluem: baixo peso ao nascimento, atraso do desenvolvimento, retardo do crescimento, anomalias craniofaciais e cardiopatias congênitas.

Será realizado um estudo de caso por meio da descrição clínica de uma paciente encaminhada pelo Hospital das Clínicas de Botucatu (HC/FMB) ao Serviço de Aconselhamento Genético do Departamento de Genética

do Instituto de Biociências de Botucatu- IBB/Unesp.

Serão realizados os seguintes procedimentos de rotina do serviço: Cultura temporária de linfócitos periféricos; Coloração e bandamento; Bandamento G (GTG); Técnica de Hibridização in situ Fluorescência (FISH); Análise citogenômica (array-CGH) onde será coletado cerca de 3 ml de sangue da paciente para a extração do DNA e Análise de Bioinformática.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar as alterações cromossômicas sem diagnóstico sindrômico definido, por meio das técnicas de citogenética clássica, molecular e citogenômica em um estudo de caso de uma criança com displasias esqueléticas, atraso do desenvolvimento, deficiência intelectual e atraso de linguagem que supostamente apresenta trissomias no cromossomo 6 e um cromossomo marcador supernumerário (sSMC).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Refere que o risco deve-se ao acesso a informação genética de todo o genoma da paciente, no entanto, a investigação genômica será realizada somente para a pesquisa das alterações cromossômicas encontradas na paciente, as quais alteram o fenótipo clínico.

Como benefício haverá a possibilidade do entendimento da afecção genética e o aconselhamento genético adequado, bem como, melhorias na qualidade de vida da paciente e de seus familiares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de caso de uma criança com displasias esqueléticas, atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual que supostamente apresenta trissomias no cromossomo 6 e um cromossomo marcador supernumerário (sSMC). A pesquisa é relevante e contribuirá para a compreensão da afecção e aconselhamento genético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta o TCLE de acordo com o modelo proposto pelo CEP, pois a coleta de sangue será feita em criança e necessita da anuência do responsável para a realização do estudo.

Apresenta os documentos de autorização da instituição HCFMB e do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Unesp.

Refere que o armazenamento do material coletado seguirá as normas da Portaria 14/2013 IBB. O pesquisador ressalta que será realizado o exame de citogenética molecular e não haverá armazenamento e depósito em Biorrepositório.

Recomendações:

Seguir o cronograma após a aprovação do CEP.

Continuação do Parecer: 3.007.729

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 05 de novembro de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o “Relatório Final de Atividades”, na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1179116.pdf	15/10/2018 16:52:28		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorrepositorio_chr6.docx	15/10/2018 16:51:14	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Parecer Anterior	resposta_parecer2.docx	15/10/2018 16:50:39	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/09/2018 21:23:28	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Parecer Anterior	Resposta_parecer.pdf	10/09/2018 21:22:11	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	portaria_14_2013_ibb_unesp.pdf	10/09/2018 21:21:16	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	10/09/2018 21:20:35	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folharostoib026.pdf	13/08/2018 11:08:37	Jakeline Santos Oliveira	Aceito

Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaHcfmb.pdf	13/08/2018 11:05:06	Jakeline Santos Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Departamento027.pdf	13/08/2018 11:04:24	Jakeline Santos Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 08 de Novembro de 2018

**Assinado por: SILVANA
ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador(a))**