

VANESSA SODRÉ DE SOUZA

**Contribuição das principais metodologias de citogenética clássica e molecular
na investigação de rearranjos cromossômicos estruturais**

Brasília, 2023



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

**Contribuição das principais metodologias de citogenética clássica e molecular
na investigação de rearranjos cromossômicos estruturais**

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

Orientadora: Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília, 2023

Dedico este trabalho a minha avó, Joana D'arc Sodré, meu exemplo de fé e força.
Mesmo dentro de uma realidade limitada ela enxergou na educação a oportunidade
de crescer e modificar a vida dos seus.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por conceder-me fortaleza e determinação para seguir na carreira acadêmica.

À minha querida orientadora, Dra. Juliana Mazzeu, pela oportunidade e por confiar em meu trabalho, mesmo quando eu tinha dúvidas. Não é possível mensurar o quanto eu aprendi com seu exemplo. Muito obrigada!

Aos pacientes participantes da pesquisa, sem eles esse trabalho não seria possível.

À equipe do Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília pela atenção e comprometimento nos atendimentos. Dra. Mara Córdoba e Dra. Beatriz Versiani, obrigada.

À equipe de técnicos do Laboratório Genética da Faculdade de Medicina pelo apoio e fornecimento dos meios para que esse trabalho fosse concretizado. Aluísio, Nilza, Renata e Lídia, o suporte de vocês foi essencial.

À minha família, por ser meu alicerce e meu porto seguro. Agradeço a minha mãe, Fátima Valéria, e ao meu padrasto, Roberto Santana, por todo suporte emocional, por acreditarem em meu trabalho e não me deixarem desistir nos momentos difíceis. Sem vocês nada disso seria possível. Serei eternamente grata. Amo vocês!

À minha querida amiga, Gabriela Corassa, pelos longos anos de parceria no trabalho e na amizade. A nossa paixão em comum pela genética nos trouxe até aqui. Sou muito feliz e grata pelo caminho que percorremos juntas. Obrigada por dividir comigo as alegrias e as angústias dessa jornada acadêmica.

À minha psicóloga, Lorena Silva, por me acompanhar durante o doutorado, um período de muitas transformações. O seu suporte profissional e o seu cuidado foram essenciais nesse processo. Obrigada!

Aos meus amigos que me acompanharam durante esse período, o apoio de vocês foi fundamental.

À agência de fomento CNPq pelo apoio financeiro.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas.”

Marie Curie

Resumo

Alterações cromossômicas estruturais são uma importante fonte de variação de sequências que contribuem para diferenças fenotípicas entre indivíduos. O genoma humano possui em média 18,4 Mb de variantes estruturais (SVs), o que demonstrou ter impacto na expressão gênica e estar associado a doenças humanas. As SVs levam a duas principais consequências: alteração da dosagem gênica e alteração na ordem do DNA podendo levar a formação de fusões gênicas e proteínas quiméricas, além de afetar a interação entre genes e elementos reguladores. Consequentemente, a caracterização dos rearranjos cromossômicos e a identificação dos pontos de quebra são essenciais para compreender os impactos fenotípicos gerados por essas alterações. O presente trabalho teve por objetivo investigar como as metodologias de cariótipo, *microarray* e mapeamento óptico genômico podem contribuir para a investigação de rearranjos cromossômicos estruturais. Foram selecionadas nove famílias de portadores de variações cromossômicas estruturais atendidos no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília. Para caracterizar os rearranjos cromossômicos foram realizadas análise de cariótipo, Análise Cromossômica por *Microarray* (CMA) e Mapeamento Óptico Genômico (OGM). As nove famílias selecionadas foram avaliadas clinicamente a fim de descrevê-las fenotipicamente. Pela metodologia de cariótipo foi possível selecionar quatro casos de translocação, três casos de inversão, um caso de cromossomo marcador e um de cromossomo derivativo proveniente de translocação materna. Uma família com cariótipo normal foi incluída no estudo devido ao conhecimento prévio de uma microduplicação detectada pela técnica de CMA, que foi posteriormente caracterizada por OGM. Em três dos nove casos analisados foram identificadas variações do número de cópias (CNVs) pela técnica de CMA, indicando inicialmente que os demais rearranjos eram balanceados. Das dez famílias selecionadas, oito prosseguiram para análise por OGM. Em sete casos foram identificadas interrupções gênicas lavando a identificação de possíveis genes candidatos nos pontos de quebra ou em regiões próximas, são eles: *DLGAP2*, *DLGAP4* e *BIRC6* em casos de DI e TEA; *HMGGA2* em um caso de Síndrome de Silver-Russell; *PTPRZ1* e *TAF4* em casos de dificuldade de aprendizado e alterações comportamentais. Além disso, O OGM mostrou que alguns rearranjos eram mais complexos do que o cariótipo sugeria. Conclui-se que o cariótipo continua sendo um excelente método de triagem das variações

cromossômicas estruturais. O CMA foi efetivo na identificação de CNVs, contudo a maior parte dos casos eram de rearranjos balanceados que não são detectados pela técnica. Pelo OGM foi possível identificar todos os tipos de rearranjos, definir os pontos de quebra e ter um refinamento dos segmentos cromossômicos envolvidos, demonstrando ser uma ótima ferramenta na investigação de SVs com potencial de substituir o uso outras metodologias.

Abstract

Structural chromosomal abnormalities are an important source of sequence variation that contribute to phenotypic differences among individuals. The human genome has an average of 18.4 Mb of structural variants (SVs), which has been shown to impact gene expression and be associated with human diseases. SVs lead to two main consequences: changes in gene dosage and changes in DNA order, which can result in the formation of gene fusions and chimeric proteins. They also affect interactions between genes and regulatory elements. Consequently, characterizing chromosomal rearrangements and identifying breakpoints are essential to understand the phenotypic impacts generated by these alterations. This work aimed to investigate how karyotype, microarray and optical genomic mapping methodologies can contribute to the investigation of structural chromosomal rearrangements. Nine cases of families with structural chromosomal variations who were seen at the Medical Genetics Service of the University Hospital of Brasília were selected. To characterize the chromosomal rearrangements, karyotype analysis, Chromosomal Microarray Analysis (CMA) and Optical Genome Mapping (OGM) were performed. The nine selected families underwent clinical evaluation to characterize their phenotypes. Using karyotype it was possible to select four cases of translocation, three cases of inversion, one case of marker chromosome and one case of derivative chromosome from maternal translocation. In three of the nine cases copy number variations (CNVs) were identified by the CMA technique, initially indicating that the other rearrangements were balanced. A family with a normal karyotype was included in the study due to prior knowledge of a microduplication detected by the CMA technique, which was subsequently characterized by OGM. Of the ten selected cases, eight proceeded to OGM analysis. In seven cases, gene interruptions were identified. Possible candidate genes at the breakpoints or in nearby regions included: *DLGAP2*, *DLGAP4* and *BIRC6* in cases of ID and ASD; *HMGA2* in a case of Silver-Russell Syndrome; *PTPRZ1* and *TAF4* in cases of learning difficulties and behavioral changes. Furthermore, the OGM showed that some rearrangements were more complex than the karyotype had suggested. In conclusion karyotyping remains an excellent screening method for detecting structural chromosomal variations. While CMA effectively identified CNVs, it missed most cases of balanced rearrangements that are not detected by the technique. Through OGM, it

was possible to identify all types of rearrangements, define the breakpoints, and refine the involved chromosomal segments. This demonstrates that OGM is a valuable tool in investigating SVs, with the potential to replace other methodologies.

Lista de figuras

Figura 1. Resumo das variações cromossômicas estruturais.

Figura 2. Rearranjos cromossômicos estruturais complexos.

Figura 3. Representação esquemática dos TADs.

Figura 4. Representação dos rearranjos recorrentes.

Figura 5. Recombinação homóloga não alélica.

Figura 6. Reparo da quebra da dupla fita por junção de extremidade não homóloga. (NHEJ) e junção de extremidade mediada por microhomologia.

Figura 7. Reparação da forquilha de replicação colapsada.

Figura 8. Metáfases obtidas a partir da cultura de fibroblastos obtidos de explante de pele (A) e de explante de baço (B-D).

Figura 9. Bandeamento G.

Figura 10. Bandeamento-R. Evidencia-se o padrão de coloração oposto ao bandeamento-G.

Figura 11. Bandeamentos cromossômicos.

Figura 12. Representação esquemática da técnica de FISH.

Figura 13. Análise de FISH de um indivíduo com cromossomo 12 derivativo, detectado previamente pela técnica de bandeamento G.

Figura 14. Representação esquemática da hibridação genômica comparativa por microarranjo (aCGH).

Figura 15. Alterações estruturais possíveis de serem detectadas pelos sequenciamentos long-read PacBio e ONT.

Figura 16. Representação esquemática da visualização das variações estruturais detectadas pelo mapeamento óptico.

Figura 17. Interpretação *Circos plot*.

Figura 18. Protocolo resumido da plataforma *Affymetrix® CytoScan® 750k Array*, com o tempo aproximado de cada etapa.

Figura 19. Protocolo resumido das etapas de processamento e análise do Mapeamento Óptico Genômico *Bionano Genomics®*.

Figura 20. Protocolo resumido das etapas de processamento do sequenciamento *long-read* da *Pacific Biosciences®*.

Figura 21. Tetrassomia de 18p no caso 1.

Figura 22: Representação esquemática do rearranjo no caso 2.

Figura 23. Duplicação de 37,2Mb em 7q31.32 no caso 2.

Figura 24. Duplicação de 1,5Mb em 4p16.3 no caso 2.

Figura 25. Translocação do caso 3.

Figura 26. Pontos de quebra da translocação no caso 3.

Figura 27. Análise *in silico* da translocação na plataforma TADeus2 no caso 3.

Figura 28. Score de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 3.

Figura 29. Translocação do caso 4.

Figura 30. Pontos de quebra da translocação no caso 4.

Figura 31. Translocação do caso 5.

Figura 32. Pontos de quebra da translocação no caso 5.

Figura 33. Análise *in silico* da translocação na plataforma TADeus2 no caso 5.

Figura 34. Score de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 5.

Figura 35. Inversão do caso 6.

Figura 36. Pontos de quebra da translocação no caso 6.

Figura 37. Análise *in silico* da inversão na plataforma TADeus2 no caso 6.

Figura 38. Score de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 6.

Figura 39. Heredograma representativo da família investigada no caso 7.

Figura 40. Inversão do caso 7.

Figura 41. Pontos de quebra da translocação no caso 7.

Figura 42. Análise *in silico* da inversão na plataforma TADeus2 no caso 7.

Figura 43. Score de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 7.

Figura 44. Duplicação de 690 Kb em 2p22.3 no caso 8.

Figura 45. Inversão do caso 8.

Figura 46. Análise por OGM na plataforma Acces do caso 8.

Figura 47. Representação esquemática do rearranjo no braço curto do cromossomo 2 do probando do caso 8.

Figura 48. Representação esquemática do rearranjo no braço curto do cromossomo 2 na progenitora do probando do caso 8.

Figura 49. Cariótipo resultado da técnica de bandeamento C mostrando a translocação entre os cromossomos 9 e 20.

Figura 50. Translocação do caso 9.

Figura 51. Pontos de quebra da translocação no caso 9.

Figura 52. Ponto de quebra cromossomo no cromossomo 9.

Figura 53. Ponto de quebra no cromossomo 20.

Figura 54. Duplicação de 760Kb em 8p23.3 do caso 10.

Figura 55. Duplicação do caso 10.

Figura 56. Análise por OGM na plataforma *Acces* do caso 10.

Figura 57. Alinhamento com segmento do cromossomo 9.

Figura 58. Alinhamento com segmento do cromossomo 5.

Figura 59. Gráfico com as porcentagens dos tipos de rearranjos cromossômicos investigados e caracterizados neste estudo.

Lista de tabelas

Tabela 1: Compilado dos resultados da investigação citogenética.

Lista de abreviaturas e siglas

BAC, cromossomos artificiais bacterianos

CGH, hibridização genômica comparativa

CMA, do inglês *Chromosomal microarray*

CNVs, do inglês *copy-number variations*

DI, deficiência intelectual

dNTP, dioxinucleotídeos

ddNTP, dideoxinucleotídeos

FISH, Hibridização Fluorescente *in situ*

FoSTeS, do inglês *fork stalling and template switching*

IAPs, inibidores de apoptose

ICR1, do inglês *Imprinted Control Region 1*

LCRs, do inglês *Low Copy Repeats*

LLC, leucemia linfocítica crônica

MMEJ, junção de extremidade mediada por microhomologia

MMBIR, quebra mediada por microhomologia

NAHR, recombinação homóloga não alélica

NHEJ, junção de extremidades não homóloga

NDDs, distúrbios do neurodesenvolvimento

OGM, do inglês *Optical Genome Mapping*

OPCs, células precursoras de oligodendrócitos

PCR, do inglês *Polymerase chain reaction*

RC, do inglês *ring chromosome*

SMRT, do inglês *Single-molecule real-time*

sSMC, do inglês *small Supernumerary Marker Chromosome*

SNPs, do inglês *Single nucleotide polymorphism*

SRS, do inglês *Silver-Russell syndrome*

SV, do inglês *structural variations*

TAD, domínio de associação topológica

TDAH, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TEA, transtorno do espectro autista

WHS, do inglês *Wolf-Hirschhorn syndrome*

YAC, cromossomos artificiais de levedura

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Variantes cromossômicas estruturais.....	16
2.1 Deleção e duplicação.....	17
2.2 Translocação.....	18
2.3 Inversão.....	19
2.4 Inserção.....	19
3. Rearranjos envolvendo cromossomos inteiros.....	20
3.1 Cromossomo em anel.....	20
3.2 Isocromossomo.....	21
3.3 Cromossomo marcador.....	21
4. Rearranjos complexos.....	23
4.1 <i>Chromotripsis</i>	24
4.2 <i>Chromoplexy</i>	25
4.3 <i>Chromoanasyntesis</i>	25
5. Alterações na conformação da cromatina.....	27
6. Mecanismos associados a formação de variações estruturais.....	28
6.1 Recombinação homóloga não alélica.....	29
6.2 Junção de extremidade não homóloga.....	30
6.3 Quebra induzida pela replicação mediada por microhomologia.....	31
7. Metodologias utilizadas na identificação de variações estruturais.....	33
7.1 Bandeamento.....	33
7.2 Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>	37
7.3 Metodologias de hibridização genômica.....	40
7.4 Metodologias de sequenciamento.....	42
7.5 Mapeamento Óptico Genômico.....	43
8. Justificativa.....	47
9. Objetivos.....	47
10. Metodologia.....	47
10.1 Seleção de pacientes.....	47
10.2 Cariótipo.....	48
10.3 Extração de DNA.....	48

10.4	Análise Cromossômica por <i>Microarray</i>	49
10.5	Mapeamento Óptico Genômico.....	51
10.6	Sequenciamento <i>Long-read PacBio</i>	52
10.7	Análise <i>in silico</i> dos domínios de associação topológica.....	53
11.	Resultados e discussão.....	54
12.	Considerações finais.....	121
13.	Referências.....	122
14.	Anexos.....	138

1 Introdução

As variantes cromossômicas estruturais (SV, do inglês *structural variations*) são uma importante fonte de variação de sequências que contribui para diferenças fenotípicas entre indivíduos. O Projeto *1000 Genomes* revelou em suas análises que o genoma humano possui em média 18,4 Mpb de SVs, o que demonstrou ter impacto na expressão gênica e estar associado a doenças humanas (Chan et al., 2018).

De modo geral variações estruturais compreendem regiões do DNA que apresentam variações no número de cópias, mudança de orientação ou de localização cromossômica (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015). Rearranjos estruturais típicos envolvem segmentos maiores que 100 pb incluindo deleções, duplicações, inversões, inserções, translocações e rearranjos complexos (WECKSELBLATT; RUDD, 2015).

As SVs ocorrem por erros na replicação do DNA, reparo de danos à dupla fita e atividade de elementos repetitivos. Diversos mecanismos moleculares já foram descritos na formação de SVs, como: recombinação homóloga não alélica, junção de extremidades não homólogas, junção de extremidade alternativa, replicação induzida por quebra e parada da forquilha de replicação (HAREL; LUPSKI, 2018).

As SVs levam a duas principais consequências: alteração da dosagem gênica e alteração na ordem do DNA. A amplificação, duplicação ou deleção de genes e elementos regulatórios podem ter impacto fenotípico e causar doenças. As SVs podem também levar a formação de fusões gênicas e proteínas quiméricas devido a reorganização do DNA. Ademais, a interação entre genes e elementos reguladores pode ser modificada (YANG, 2020).

Conseqüentemente, a detecção, caracterização e identificação dos pontos de quebra são essenciais para compreender os impactos gerados por essas alterações. Para isso, existem diversas metodologias de citogenética clássica e molecular disponíveis que vão desde as técnicas de bandeamento cromossômico até sequenciamento de terceira geração, passando pelo FISH, microarranjo, e sequenciamento *short read* (YANG, 2020).

2 Variantes cromossômicas estruturais

Os rearranjos estruturais podem ser classificados em balanceados e não balanceados. Nos rearranjos balanceados não há perda nem ganho de conteúdo gênico, que inclui inserções, translocações recíprocas e inversões. Já nos rearranjos não balanceados há material gênico ausente ou adicional, que inclui principalmente deleções e duplicações (HAREWOOD; FRASER, 2014).

A Figura 1 demonstra de forma esquemática todas as variações cromossômicas estruturais abordadas a seguir.

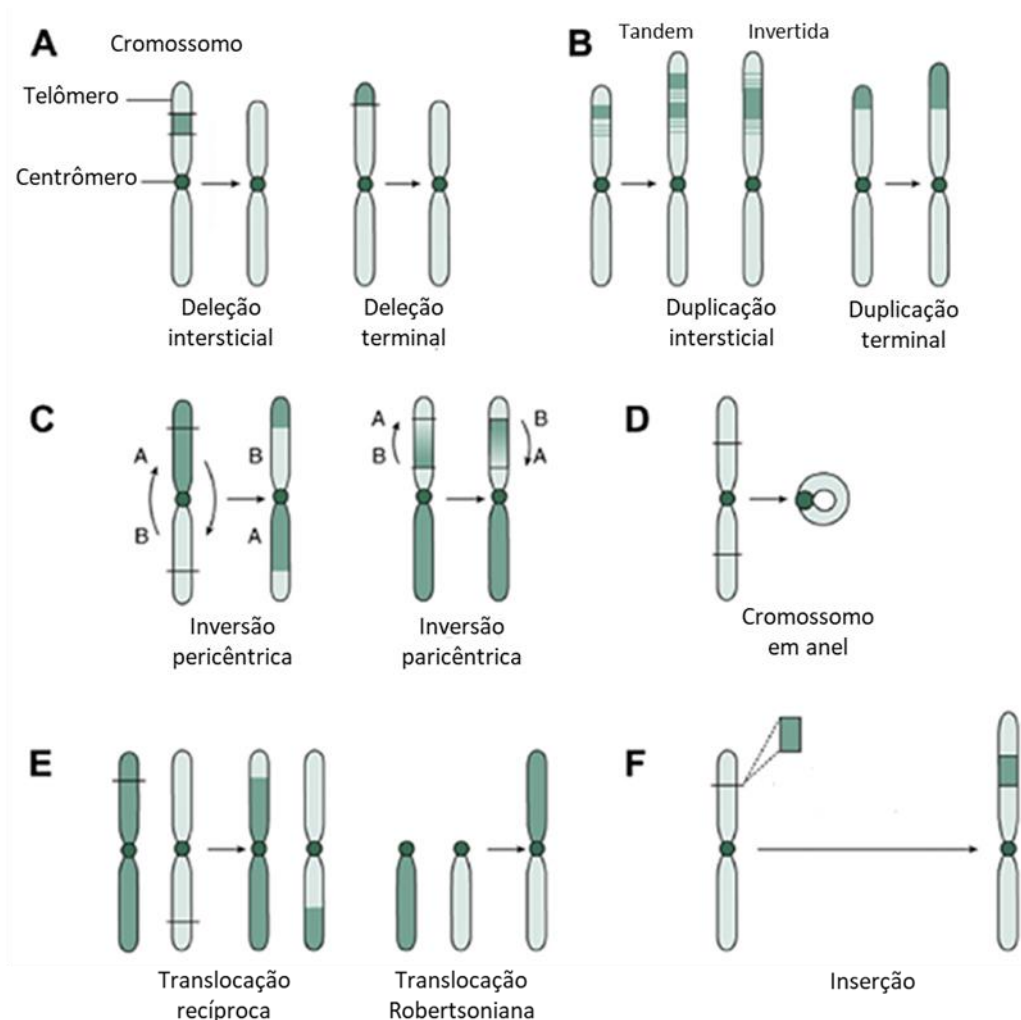


Figura 1. Resumo das variações cromossômicas estruturais. A, deleções; B, duplicações; C, inversões; D, cromossomo em anel; E, translocações; F, inserção.

Fonte: Adaptado de Kaser, 2018.

2.1 Deleção e duplicação

O genoma humano possui milhares de deleções e duplicações maiores que 1 kb. Esses polimorfismos são denominados de variações no número de cópias (CNVs, do inglês *copy-number variations*), diferem entre indivíduos e podem ter influência no fenótipo afetando a dosagem e/ou a estrutura de genes. Diversas CNVs, raras e *de novo*, já têm função estabelecida e bem conhecidas em doenças (USHER; MCCARROLL, 2015). Desse modo, as CNVs podem levar ao aumento ou diminuição de cópias de vários genes simultaneamente, afetar regiões regulatórias, além de também poder alterar a expressão de genes vizinhos (LAUER; GRESHAM, 2019).

Deleções são caracterizadas pela perda de conteúdo gênico (JACKSON et al., 2018) sendo classificada em intersticial, quando há dois pontos de quebra dentro de um braço cromossômico; ou terminal, quando há apenas um ponto de quebra com a perda da extremidade cromossômica. Deleções terminais já foram relatadas na maioria cromossomos humanos levando a desordens já estabelecidas na literatura, como por exemplo a Síndrome de Cri-du-Chat em que ocorre deleção terminal do braço curto do cromossomo 5 (WECKSELBLATT; RUDD, 2015).

A perda de genes críticos dentro de segmentos deletados levam a haploinsuficiência do gene, ou seja, são necessárias duas cópias para resultar em um fenótipo normal ou tipo selvagem (DANG et al., 2008).

Já o ganho de material genético consiste na adição de cópia adicional de determinada sequência (duplicações, triplicações ou mais cópias. Essas sequências extras podem ser inseridas em *tandem*, de forma contínua seguindo a mesma orientação da sequência original, ou de forma invertida (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015). A análise de diversos segmentos duplicados demonstrou que as duplicações intersticiais são em sua maioria em *tandem* e apresentam a mesma orientação da sequência original (NEWMAN et al., 2015).

A interpretação das duplicações e o estabelecimento de uma correlação genótipo-fenótipo são dificultadas a cópia adicional do gene pode não levar a um aumento da expressão do gene ou esse aumento pode não ser deletério. Além disso genes podem ou não ser interrompidos nos pontos de quebra e contribuir para o quadro clínico (WECKSELBLATT; RUDD, 2015). No entanto, diversas síndromes já foram associadas com regiões genômicas duplicadas, como por exemplo a síndrome Potocki-Lupski ocasionada pela duplicação típica de 3,7 Mb no braço curto do cromossomo 17 (17p11.2) (GOLDENBERG, 2018).

Uma análise dos distúrbios genéticos anotados no Banco de Dados de Desequilíbrios Cromossômicos e Fenótipo em Humanos (DECIPHER) revelou que somente 20% destes são causados por duplicações, ao passo que 80% são deleções e, de modo geral, as duplicações estavam associadas a fenótipos mais brandos. Essa diferença pode ser explicada pelo efeito de dosagem ser mais expressivo quando um gene se encontra deletado (WEISCHENFELDT et al., 2013).

2.2 Translocação

A translocação é caracterizada pela troca de segmentos cromossômicos entre dois cromossomos não homólogos (MORIN et al., 2017), essa troca também pode ocorrer entre segmentos diferentes presentes no mesmo cromossomo (ESCARAMÍS; DO CAMPO; RABIONET, 2015)

Para que uma translocação ocorra é necessário que haja quebra da fita dupla de DNA em dois loci genômicos diferentes que são unidos por mecanismos de reparação ou recombinação. Existem dois modelos propostos para explicar como as quebras cromossômicas ficam justapostas para a formação da translocação: (1) há primeiro a quebra e a extremidade exposta se move através do núcleo a procura de um novo emparelhamento; (2) há primeiro o contato entre regiões pré-determinadas pela proximidade entre os domínios cromossômicos e depois ocorre quebra (MCCORD; BALAJEE, 2018).

De modo geral, se a translocação balanceada não estiver acompanhada de variações do número de cópias não existem consequências fenotípicas. Entretanto, translocações podem levar a interrupção gênica, a formação de um gene de fusão, a desregulação de um gene separado de seu elemento regulador ou desregulação de um gene colocado em um ambiente de modificação da cromatina (WILCH; MORTON, 2018).

Indivíduos portadores de translocações balanceadas apresentam maior risco de infertilidade, aborto espontâneo e desequilíbrios genômicos na progênie (WILCH; MORTON, 2018). Além disso, translocações já foram reconhecidas como causa de diversos tipos de cânceres humanos, seja tumor de origem sólida ou hematopoiética (BAIRD; HENDRICKSON, 2018).

O Cromossomo Filadélfia é um exemplo claro de como uma fusão gênica ocasionada por uma translocação pode gerar produto funcional deletério levando ao estado de doença. A translocação entre os cromossomos 9 e 22 [t (9; 22) (q34; q11)]

resulta na fusão BCR-ABL1 que codifica uma proteína com atividade de tirosina quinase. A atividade irregular da tirosina altera as vias de sinalização levando a proliferação celular aumentada, resistência à morte e interrupção da diferenciação celular. A presença do Cromossomo Filadélfia leva a diferentes fenótipos de leucemia, e as células que possuem a translocação são mais propensas a apresentar outras anormalidades genômicas que também contribuem para a leucemogênese (KANG et al., 2016).

2.3 Inversão

A inversão é caracterizada por duas quebras cromossômicas seguida de reinserção do segmento fragmentado no sentido oposto. As inversões são classificadas em dois tipos: (1) pericêntrica, em que os pontos de quebra envolvem os dois braços cromossômicos incluindo o centrômero; (2) paracêntrica, os pontos de quebra envolvem somente um dos braços cromossômicos e não inclui o centrômero (MORIN et al., 2017; PUIG et al., 2015).

A inversão não leva a perda nem ganho de material genético, portanto é considerada um tipo de variação estrutural balanceada. Contudo, pode levar à produção de gametas desequilibrados durante a meiose o que aumenta a probabilidade de perda gestacional. A inversão paracêntrica leva à formação de gametas com cromossomos acêntricos ou dicêntricos, o que gera gametas inviáveis. Já a inversão pericêntrica leva a formação de cromossomos com deleções ou duplicações, produzindo gametas com monossomia e trissomia parciais respectivamente (KASER, 2018).

Apesar de não apresentar alterações quantitativas, a reorganização de um segmento genômico pode refletir em alterações fenotípicas (ALVES et al., 2012) como a perda ou ganho de funções regulatórias. Exemplos desse fenômeno são a inversão do elemento regulador do gene *SHH* que leva a formação de dedos curtos e polissindactilia, e a inversão do locus do gene *FOXP1* que é a causa de uma forma atípica da Síndrome de Rett (SPIELMANN; LUPIÁÑEZ; MUNDLOS, 2018).

2.4 Inserção

Quando um segmento cromossômico se quebra e é inserido em outro cromossomo, caracteriza-se a inserção. Geralmente, ocorrem duas quebras no

cromossomo de origem, permitindo a liberação do segmento, e apenas uma quebra no cromossomo no qual esse segmento será inserido, em orientação direta ou inversa.

Da mesma forma que a inversão, a inserção também pode levar a formação de gametas desequilibrados. Durante a meiose o cromossomo irá parear com seu homólogo e com cromossomo de origem do fragmento inserido formando-se alças. Desse modo, as células filhas poderão ter duplicação ou deleção deste fragmento (MALUF, RIEGEL et al., 2011).

3 Rearranjos envolvendo cromossomos inteiros

3.1 Cromossomo em anel

O Cromossomo em anel (RC) é uma molécula de DNA circular típica em procariotos, mas um evento raro entre seres eucarióticos (PRISTYAZHNYUK; MENZOROV, 2018). Já foram identificados cromossomos em anel provenientes de todos os cromossomos humanos. Quebras nas regiões teloméricas seguida de fusão das duas pontas quebradas é o principal mecanismo associado à formação do RC. Isso pode levar à formação do anel completo, sem perda de material genético; ou resultar em síndrome de deleção subtelomérica, havendo, portanto, a perda de material genético (RAJESH; FRECKMANN; CHAPMAN, 2011).

A presença de um cromossomo em anel leva a instabilidade cromossômica resultando em anormalidades na divisão celular (PRISTYAZHNYUK; MENZOROV, 2018). A troca de material genético entre as cromátides-irmãs durante a mitose pode levar a formação de anéis duplos ou dois anéis interligados. Como resultado pode haver: (1) perda do anel nas duas células filhas, levando a monossomia do cromossomo em questão; (2) não disjunção com produção de duas linhagens celulares, uma com anel duplo (trissômica) e outra sem anel (monossômica); (3) quebra do anel, que pode ser simétrica ou assimétrica, resultando em deleções ou duplicações. Desse modo, a constituição cromossômica pode tornar variável a cada divisão das células somáticas, o que é designado mosaïcismo de tecido dinâmico (RAJESH; FRECKMANN; CHAPMAN, 2011).

Geralmente o RC ocorre como um evento *de novo* e a maioria dos portadores apresentam manifestações fenotípicas como características dismórficas e deficiência intelectual (MORIN et al., 2017). A deficiência de crescimento é outra característica

comum em portadores de RC. Essas manifestações fenotípicas em conjunto foram denominadas *ring syndrome*, em que as manifestações não estão associadas a perda de material genético e sim decorrentes da morte celular causada pelo mosaicismo de tecido dinâmico (COTE; KATSANTONI; DELIGEORGIS, 1981). Contudo, análises mais recentes apontam que as manifestações fenotípicas são consequência do desequilíbrio de genes sensíveis a dosagem (AZIZ; VAN BELZEN; ROOS, 2008).

3.2 Isocromossomo

O isocromossomo é caracterizado pela presença de duas cópias iguais de um mesmo braço cromossômico unidos por um centrômero, o que tem como consequência trissomia e monossomia parciais. Dois mecanismos foram propostos para explicar a formação do isocromossomo: (1) “divisão do centrômero”, em que o cromossomo passaria por uma divisão transversal ao invés de uma divisão longitudinal, separando assim os braços cromossômicos; (2) troca tipo U, nesse caso ocorreria uma quebra da dupla fita nas duas cromátides-irmãs levando a fusão das duas extremidades cromossômicas formando um cromossomo dicêntrico (BARRA; FACHINETTI, 2018).

A instabilidade gerada pode levar a falhas na segregação cromossômica que por sua vez podem levar a variações numéricas e estruturais, características encontradas principalmente em células tumorais (BARRA; FACHINETTI, 2019). Isocromossomos de diferentes origens já foram associados à diversos tipos de câncer, como leucemias, linfomas, carcinoma de células escamosas, sarcoma e melanoma. Em ordem decrescente de frequência, os principais isocromossomos associados à essas manifestações são: i(17q), i(8q), i(1q), i(12p), i(6p), i(7q), i(9q) e i(5p) (MERTENS; JOHANSSON; MITELRNAN, 1994). Além disso, cerca de 20% dos casos de Síndrome de Turner (45,X) ocorrem devido a formação do isocromossomo i(Xq), o que aumenta a probabilidade de desenvolver doenças autoimunes e hipotireoidismo (GRAVHOLT et al., 2019).

3.3 Cromossomo marcador

Um tipo de anomalia estrutural resultado de um rearranjo cromossômico não balanceado são os cromossomos marcadores. Eles também são conhecidos pela sigla sSMC (do inglês *small Supernumerary Marker Chromosomes*), e são definidos como cromossomos supranumerários estruturalmente anormais que não podem ser

identificados e caracterizados somente por técnicas de citogenética clássica. Outro fator que define um sSMC é o tamanho, que geralmente é igual ou menor que o cromossomo 20 na mesma metáfase (LIEHR; CLAUSSEN; STARKE, 2004).

O fenótipo dos portadores de cromossomo marcador exhibe uma grande variabilidade, podendo variar de normal até condições clínicas graves. O risco de manifestação fenotípica depende de diversos fatores como: origem, conteúdo gênico, tipo de herança, morfologia, presença de dissomia uniparental e grau de mosaicismo, caso ocorra (SANTACROCE et al., 2015). A maioria dos casos não possui correlação clínica específica, porém algumas síndromes clinicamente conhecidas têm como causa a presença de um cromossomo marcador, como: Síndrome Palliester-Killian [i(12p)]; Síndrome de Emanuel [der(22)t(11;22)(q23;q11.2)]; Síndrome do isocromossomo 18p; e Síndrome do olho de gato [inv dup (22)] (HASHEMZADEH-CHALESHTORI et al., 2015).

Estima-se que a incidência de sSMC no período pré-natal seja de 0,075% e que a incidência em recém-nascidos seja de 0,044%, essa redução se dá, em parte, devido a abortamentos espontâneos ou induzidos. Essa taxa aumenta quando grupos específicos são analisados, como portadores de deficiência intelectual que apresentam uma incidência de 0,288%, e indivíduos que possuem problemas de infertilidade com uma taxa de 0,125% (ARMANET et al., 2015; RECALCATI et al., 2018).

Cerca de 30% dos casos são herdados e 70% são em decorrência de alterações novas (HASHEMZADEH-CHALESHTORI et al., 2015). O risco de manifestar um fenótipo anormal varia de 14% a 30% nos casos *de novo*, dependendo do conteúdo gênico do cromossomo supranumerário (MALVESTITI et al., 2014). A transmissão materna é duas vezes maior que a transmissão paterna, observada em 16% e 7% dos casos respectivamente. Em contraste, a presença de cromossomos marcadores em homens inférteis é oito vezes maior quando comparado com mulheres inférteis (REDDY et al., 2013).

A maior parte dos cromossomos marcadores derivam de regiões pericentroméricas, provenientes de qualquer cromossomo, seja autossômico ou sexual. Em ordem decrescente os cromossomos marcadores mais frequentes na população humana são derivados dos cromossomos: 15, 22, 12, 18, 8, 14, 13, 21, 1, 9 e 16. Esses sSMC são constituídos principalmente por heterocromatina constitutiva, podendo ou não conter genes. Uma menor parte dos cromossomos marcadores,

cerca de 3%, podem ser derivados de regiões intersticiais, que apresentam, portanto, um neocentrômero que não contém DNA alfa-satélite (RAO; BELOGOLOVKIN, 2012), sequência de DNA repetitivo presente em todos os centrômeros que possui importante função durante a divisão celular (ALDRUP-MACDONALD et al., 2016).

Diversos mecanismos que explicam a origem dos cromossomos marcadores já foram propostos, como o resgate de trissomia (HOCHSTENBACH et al., 2015), caracterizado pela perda pós-zigótica de um cromossomo extranumerário (NUSSBAUM; MCLNNES; WILLARD, 2008). Morfologicamente eles podem se apresentar como: cromossomo duplicado invertido (inv dup), que são dicêntricos e levam a tetrassomia parcial; cromossomo *minute* (min); e cromossomo em anel (r). Os dois últimos possuem apenas um centrômero e levam a trissomia parcial (RAO; BELOGOLOVKIN, 2012; SPITTEL et al., 2014).

O mosaïcismo somático é observado em aproximadamente 50% dos portadores de sSMC em graus variáveis. A porcentagem de células portadoras do cromossomo marcador também varia muito de tecido para tecido, o que influencia nas manifestações clínicas. Há também uma diferença quanto a origem cromossômica em casos em mosaico: 28% dos sSMC são derivados de cromossomos acrocêntricos enquanto 82% são derivados de cromossomos não-acrocêntricos (LIEHR et al., 2013).

4 Rearranjos complexos

Rearranjos complexos são caracterizados por três ou mais pontos de quebra que pode levar a variações estruturais balanceadas ou não balanceadas (WECKSELBLATT; RUDD, 2015). Eles surgem como um evento mutacional único, contudo, é difícil estabelecer a origem da variante complexa (QUINLAN; HALL, 2012).

A replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (MMBIR) e *fork stalling and template switching* (FoSTeS) são os principais mecanismos associados a geração de rearranjos complexos, assim como inversões, duplicações em tandem e translocações. Esses mecanismos envolvem a paralização da replicação e o deslocamento da polimerase para qualquer DNA fita simples próximo que apresente microhomologia. Esse evento pode ocorrer em diferentes escalas genômicas, de quilobases a megabases, no entanto as regiões de microhomologia podem possuir somente 2 pb (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015).

As variações estruturais complexas foram denominadas de forma abrangente como cromosomopatias (“renascimento” cromossômico) e são categorizados em três tipos: *chromotripsis*, *chromoplexy* e *chromoanasyntesis* (ZEPEDA-MENDOZA; MORTON, 2019).

4.1 *Chromotripsis*

A denominação *chromotripsis* foi estabelecida por Stephens e colaboradores em 2011 para descrever rearranjos encontrados na triagem de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC). O termo é derivado de duas palavras gregas, *chromo* (cromossomo) e *tripsis* que significa “fragmentação em pedaços” (MARCOZZI; PELLESTOR; KLOOSTERMAN, 2018). Apesar de ter sido primeiramente descrita em tumores, a *chromotripsis* também foi identificada em pacientes com malformações congênitas, desordens do desenvolvimento e portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente balanceados (PELLESTOR; GATINOIS, 2020).

A *chromotripsis* ocorre quando um cromossomo é fragmentado em diversos segmentos e um subconjunto desses segmentos são remontados de forma aleatória. Partes do cromossomo fragmentado podem ser perdidas, dando origem a deleções, ou podem formar cromossomos derivativos (LEIBOWITZ; ZHANG; PELLMAN, 2015). A remontagem cromossômica ocorre entre fragmentos com pouca ou nenhuma homologia o que sugere que o principal mecanismo envolvido nesse processo seja a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (Figura 2A) (ZEPEDA-MENDOZA; MORTON, 2019).

A *chromotripsis* é um evento catastrófico único e fisicamente isolado. Existe a hipótese de formação de micronúcleos, ou seja, a formação de um envoltório nuclear próprio para o cromossomo em questão. O micronúcleo pode ser gerado por falhas na segregação cromossômica, como também por estresses em qualquer estágio do ciclo celular como atrito telomérico, erros mitóticos, “apoptose abortiva”, condensação cromossômica prematura, defeito de p53 ou integração viral. O micronúcleo pode persistir nas células filhas durante diversos ciclos celulares até serem eliminados ou reintegrados ao envoltório nuclear regular. Portanto, sugere-se que seja uma importante fonte de variação genética (PELLESTOR; GATINOIS, 2020).

4.2 *Chromoplexy*

A partir do sequenciamento de amostras de tumor de próstata foi identificado um novo rearranjo complexo, a *chromoplexy*. Diferente da *chromotripsis*, a *chromoplexy* exibe menos rearranjos, uma diferença no padrão de quebra/junção e envolve mais de um cromossomo. A remontagem cromossômica ocorre entre cadeias fechadas com junções quase precisas não havendo oscilação no número de cópias (MARCOZZI; PELLESTOR; KLOOSTERMAN, 2018).

Portanto, a *chromoplexy* é uma variação cromossômica complexa que envolve dois ou mais cromossomos levando a formação de cromossomos quiméricos equilibrados. Os cromossomos envolvidos sofrem diversas quebras em pontos de microhomologia. Desse modo, durante o processo de remontagem há o mínimo (ou nenhum) ganho ou perda de material genético (Figura 2B) (ZEPEDA-MENDOZA; MORTON, 2019).

Eventos de *chromoplexy* podem ocorrer durante múltiplos ciclos celulares. Os pontos de quebra estão presentes principalmente em regiões com transcrição ativa (cromatina aberta) e ricas em GC. Os principais mecanismos envolvidos na reconstrução cromossômica são junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e junção de extremidades alternativas (alt-EJ), uma vez que os pontos de junções apresentam extremidades cegas sem homologia de sequência (MARCOZZI, PELLESTOR, KLOOSTERMAN, 2018; ZEPEDA-MENDOZA; MORTON, 2019).

4.3 *Chromoanasyntesis*

A *chromoanasyntesis* pode ser definida como uma grande série de ganhos de número de cópias (e algumas perdas) em um único cromossomo como resultado da troca de molde. A principal característica que a difere da *chromotripsis* são os ganhos de pequenos segmentos cromossômicos (duplicações e triplicações) (LEIBOWITZ; ZHANG; PELLMAN, 2015).

A *chromoanasyntesis* surge a partir de erros ocorridos durante a replicação do DNA, em que a forquilha de replicação é paralisada ou entra em colapso. Desse modo, a fita retardatória da forquilha defeituosa sofre uma série de trocas com forquilhas que exibem proximidade física antes da conclusão da replicação na fita molde. Esse processo é mediado por mecanismos de *fork stalling and template switching* (FoSTeS) ou replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (MMBIR) (Figura 2C) (PELLESTOR; GATINOIS, 2018).

Esse fenômeno envolve uma série combinações complexas e agrupadas de variações estruturais, sendo tipicamente restrita a apenas um cromossomo. Ocorrem combinações complexas de deleções, duplicações, triplicações, inversões e inserções, como os arranjos DUP-NORM-DUP e DUP-TRIP (ZEPEDA-MENDOZA; MORTON, 2019).

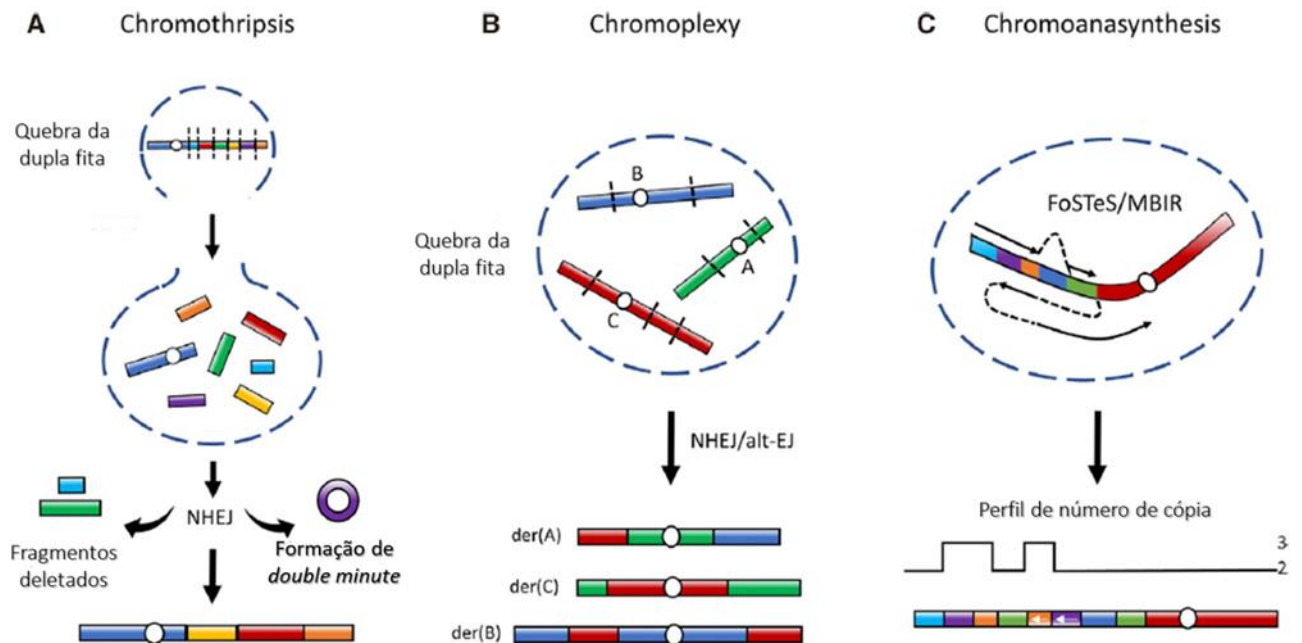


Figura 2. Rearranjos cromossômicos estruturais complexos. (A) *Chromothripsis*: cromossomo incorporado por um micronúcleo que pode sofrer múltiplas quebras da dupla fita. Quando o micronúcleo é reincorporado ao núcleo as quebras sofrem reparo por NHEJ e os fragmentos são remontados de forma aleatória. Neste processo pode haver fragmentos deletados e formação de formas circulares funcionais (*double minute*). (B) *Chromoplexy*: quebra da dupla fita em diferentes cromossomos que são reparados sem perda de conteúdo gênico. Os fragmentos podem ser reorganizados em diferentes configurações. (C) *Chromoanasythesis*: ressíntese de segmentos de DNA de um cromossomo normal mediado por mecanismos de replicação (FoSTeS e MMBIR). Esse processo pode levar a variações no número de cópias organizadas em diferentes orientações.

Fonte: Adaptado de Zepeda-Mendoza; Morton, 2019.

5 Alterações na conformação da cromatina

A cromatina é organizada em domínios de associação topológica (TADs), regiões distintas que possuem elevado nível de interação interna e são essenciais para a expressão gênica. Os TADs são estruturas tridimensionais que atuam no controle espacial das interações entre genes, promotores, *enhancers* e outros elementos reguladores. Os TADs são isolados uns dos outros por barreiras que impedem que um elemento regulador de um TAD possa interferir na expressão de um gene vizinho, por exemplo (Figura 3) (BOMPADRE; ANDREY, 2019)

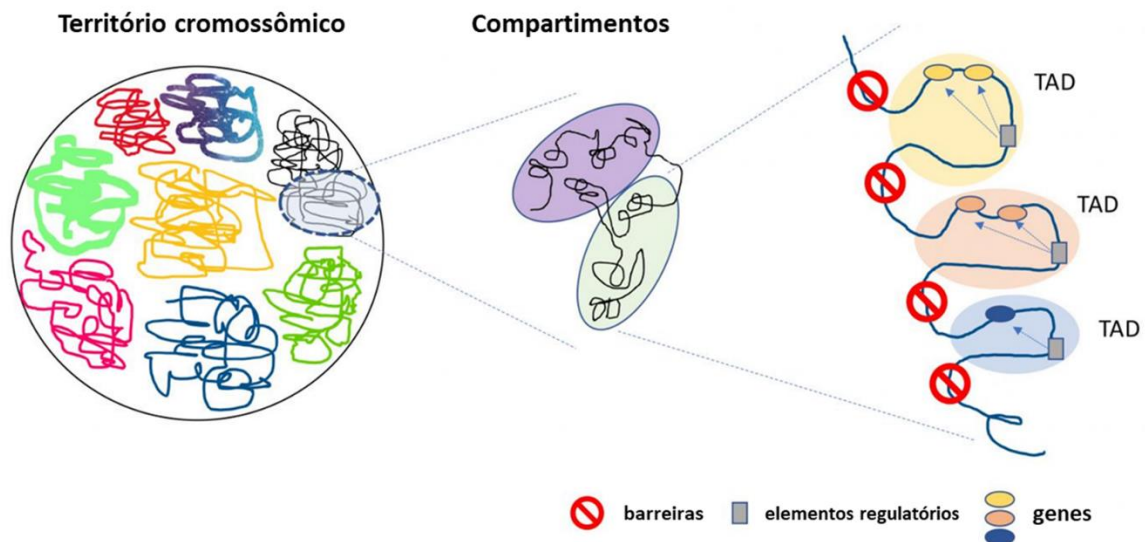


Figura 3. Representação esquemática dos TADs. Visualiza-se os territórios cromossômicos no núcleo da célula, que são subdivididos em compartimentos. Cada compartimento cromossômico pode abrigar diversos TADs. Os TADs são compostos por genes elementos regulatórios e são isolados por barreiras.

Fonte: Adaptado de news.unchealthcare.org

O dobramento da cromatina é não é apenas essencial para o posicionamento dos cromossomos no núcleo, como também é um pré-requisito para a regulação gênica de longo alcance. Os *enhancers*, ou potenciadores, são localizados a cerca de 1Mb de distância do seu gene alvo, e para que a interação promotor-*enhancer* ocorra é necessário a formação de um loop que aproxime fisicamente esses dois componentes (SPIELMANN, 2018).

Quando ocorre uma SV a conformação 3D do genoma pode ser perturbada, reorganizar os TADs e conseqüentemente alterar a expressão dos genes próximos a

região do rearranjo. Desse modo, a desconexão de regiões regulatórias pode ter o efeito de perda de função. Por outro lado, a fusão de TADs distintos ou a o surgimento de neo-TADs pode levar desregulação gênica ou ganho de função. Podendo assim contribuir para etiologia de transtornos do desenvolvimento, malformações congênitas dos membros e câncer (IBRAHIM; MUNDLOS, 2020).

6 Mecanismos associados a formação de variações estruturais

Diversos mecanismos já foram propostos para explicar a origem das variações cromossômicas estruturais. Mecanismos associados à elementos de repetição geralmente levam a rearranjos recorrentes, e os mecanismos associados à microhomologia contribuem para a formação de rearranjos não recorrentes. Os rearranjos recorrentes normalmente compartilham o mesmo tamanho e conteúdo gênico entre indivíduos não relacionados, já os rearranjos não recorrentes exibem tamanho e conteúdo únicos entre indivíduos não relacionados, conforme demonstrado na Figura 4 (CARVALHO; LUPSKI, 2016).

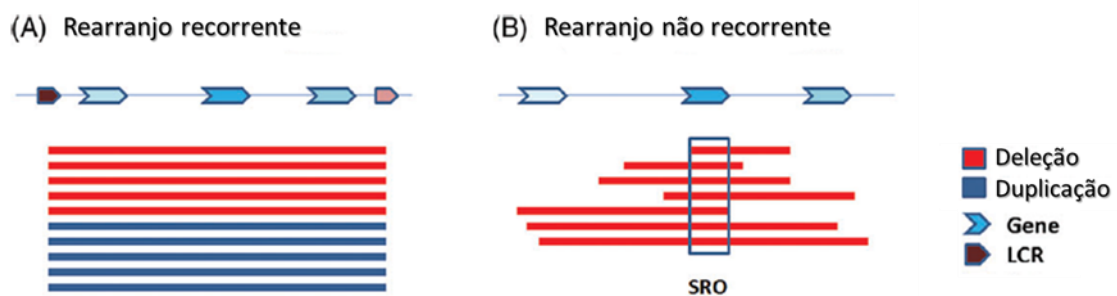


Figura 4. Representação dos rearranjos recorrentes (A), flanqueados por LCRs; e rearranjos não recorrentes (B), que geralmente apresentam uma pequena região de sobreposição (SRO) entre indivíduos não relacionados.

Fonte: Adaptado de Harel; Lupski, 2017.

Os rearranjos recorrentes apresentam pontos de quebra que são flanqueados por regiões de sequência repetitiva. Cerca de 50% do genoma humano é composto por essas sequências, que incluem: elementos móveis, pseudogenes, repetições de sequência simples, sequências *in tandem* e LCRs (*Low Copy Repeats*) (CARVALHO; LUPSKI, 2016). O principal mecanismo associado a formação de rearranjos

recorrentes é a recombinação homóloga não alélica (NAHR) (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015).

Já os rearranjos cromossômicos não recorrentes são caracterizados por microhomologia e extremidades cegas simples, as vezes com a presença de pequenas inserções nas junções dos pontos de quebra. Os principais mecanismos implicados nesses rearranjos são: junção de extremidades não homólogas (NHEJ); mecanismos baseados em replicação (RBMs), o que inclui *fork stalling* e *template switching* (FoSTeS); e junção de extremidades mediada por microhomologia (MMBIR) (HAREL; LUPSKI, 2018).

6.1 Recombinação homóloga não alélica (NAHR)

A recombinação homóloga é um dos principais mecanismos de reparo do DNA quando ocorre quebra da dupla fita. Esse mecanismo de reparo utiliza como molde sequências homólogas para restaurar com precisão a sequência de DNA afetada. Essa sequência homóloga pode ser a cromátide-irmã, um par homólogo (em organismos diplóides) ou uma sequência duplicada, localizada no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes (MCVEY; LEE, 2008).

As LCRs, também denominadas de duplicações segmentais (SD), são sequências genômicas parálogas dispostas em grupos hierárquicos que apresentam elevado grau de identidade, e tamanho que varia de 1 a 100 Kb. Essas sequências curtas constituem cerca de 4 a 5% do genoma humano e são as principais sequências de repetição implicadas nos rearranjos cromossômicos recorrentes (CHEN et al., 2014).

As LCRs são importantes na configuração da estrutura do DNA, estão associadas a genes duplicados e pseudogenes, e contribuem para a variação humana individual desempenhando papel na evolução do genoma (CHEN et al., 2014). Por outro lado, já foi identificado que há uma sobreposição do padrão de distribuição de grandes LCRs (>10 Kb) e regiões de rearranjo associadas a doenças (CARVALHO; LUPSKI, 2016).

Quando grandes LCRs apresentam proximidade física e mais de 97% de identidade de sequência podem predispor à recombinação homóloga não alélica (NAHR) (HAREL; LUPSKI, 2017). Portanto, um erro de recombinação que tem como substrato as LCRs. A NAHR foi o primeiro mecanismo descrito relacionado com a formação de variantes estruturais (LUPSKI, 2015).

A NAHR ocorre por um desalinhamento de sequência durante a mitose ou meiose. Esse desalinhamento pode levar a formação de diferentes SVs: (1) duplicações e deleções, quando as sequências homólogas estão no mesmo cromossomo e têm a mesma orientação; (2) inversões, em que as sequências estão no mesmo cromossomo, contudo em orientação inversa; (3) e translocações, quando os segmentos homólogos encontram-se em cromossomos diferentes (Figura 5) (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015).

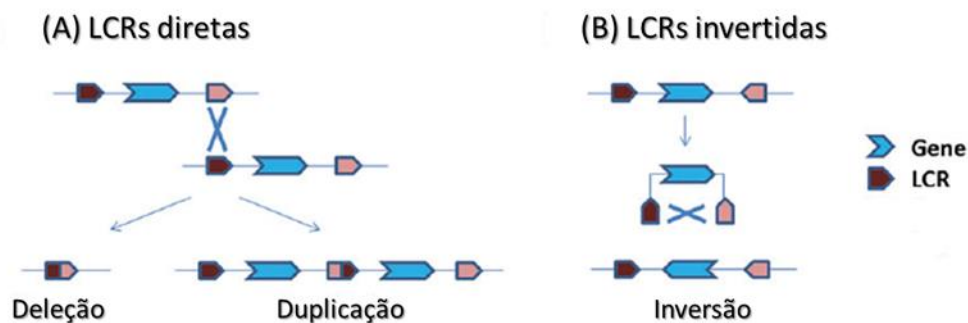


Figura 5. Recombinação homóloga não alélica. (A), NAHR entre LCRs diretas que resulta em deleções ou duplicações. (B), NAHR entre LCRs invertidas que resulta em inversões.

Fonte: Adaptado de Harel; Lupski, 2017.

6.2 Junção de extremidade não homóloga (NHEJ)

A NHEJ é outro mecanismo de reparo de quebra da dupla fita de DNA, que ocorre principalmente entre as fases G0 e G1 do ciclo celular. Enquanto o reparo mediado por recombinação homóloga necessita de um modelo para copiar as sequências de DNA perdidas, a NHEJ sela as extremidades quebradas sem depender de um modelo. A fusão de extremidades da dupla fita ocorre sem ou com pouca homologia de sequência, podendo levar a pequenas inserções e deleções (1-4 pb) no ponto de junção (MCVEY; LEE, 2008; ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015).

Segundo Pannunzio, Watanabe e Lieber (2017) a utilização do termo “não homólogo” pode ser interpretada erroneamente como ausência total de homologia, contudo sabe-se que é comum ter até 4 pares de bases (pb) de microhomologia para que a NHEJ ocorra. O termo é utilizado para diferenciar da recombinação homóloga, que necessita de centenas de pares de base de homologia para realizar um reparo com elevada fidelidade.

A junção de extremidade mediada por microhomologia (MMEJ) é uma forma alternativa de junção de extremidades não homólogas que normalmente ocorre quando a NHEJ e o reparo da replicação homóloga são reprimidos (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015). Nesse caso, o reparo é mediado pelo emparelhamento de bases entre sequências microhomólogas, que variam de 2 a 22 pb (ZHAO et al., 2020). A MMEJ é considerada uma importante fonte de instabilidade genômica pelo fato de sempre resultar em deleções e estar frequentemente associada a translocações (MCVEY; LEE, 2008), como demonstrado na Figura 6.

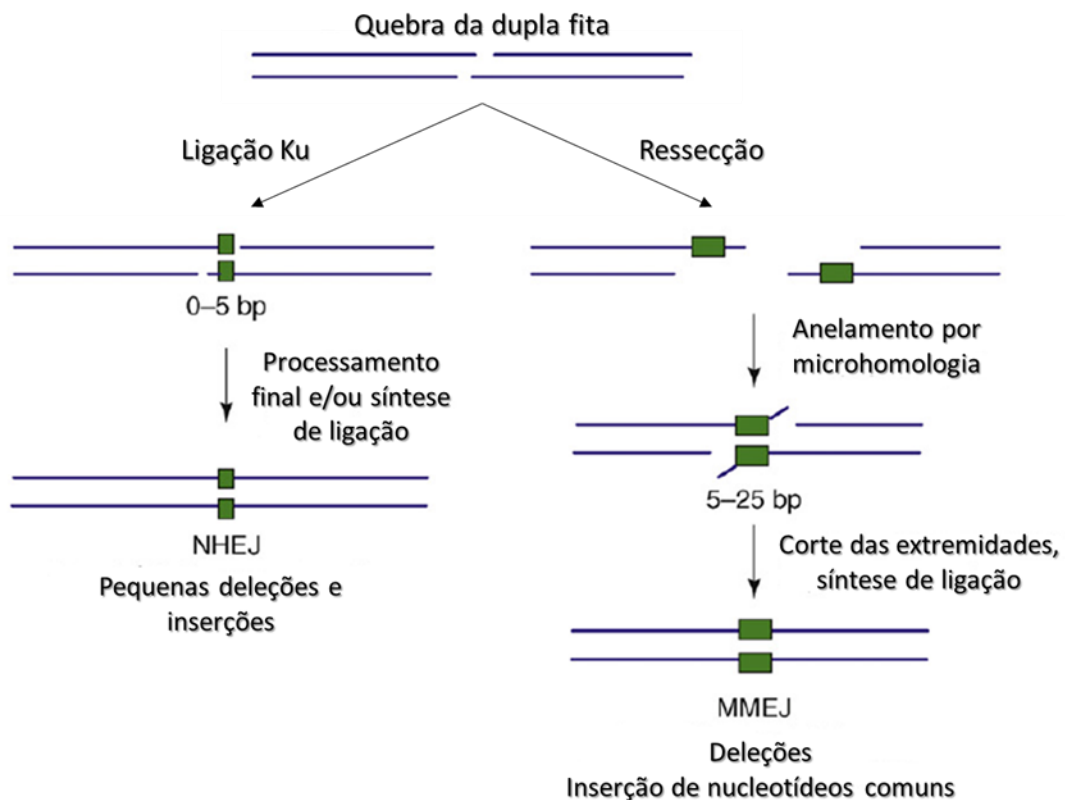


Figura 6. Reparo da quebra da dupla fita por junção de extremidade não homóloga (NHEJ) e junção de extremidade mediada por microhomologia.

Fonte: Adaptado de Mcvey; Lee, 2008.

6.3 Quebra induzida pela replicação mediada por micro-homologia (MMBIR)

Além da quebra da dupla fita de DNA, que pode ser reparada através dos mecanismos citados anteriormente, outra falha que pode ocorrer é a quebra (*nick*) de apenas uma fita durante o processo de replicação do DNA. A quebra induzida por

replicação (do inglês *break-induced replication, BIR*) foi o modelo proposto para o reparo de forquilhas de replicação colapsadas (HASTINGS; IRA; LUPSKI, 2009).

Esse mecanismo de reparo é utilizado quando uma das pontas da quebra é capaz de encontrar uma sequência homóloga para realizar o reparo. Isso pode ocorrer em regiões teloméricas degradadas, em forquilhas de replicação colapsadas, como já citado, e quando as duas extremidades de uma quebra de dupla fita encontram modelos homólogos independentes (SAKOFSKY; MALKOVA, 2017).

Hastings, Ira e Lupski (2009) propuseram que a quebra induzida por replicação pode ser mediada por micro-homologia (MMBIR). Segundo os autores esse mecanismo é utilizado para reparar extremidades de fita dupla simples, quando a fita simples está disponível e compartilha micro-homologia com a extremidade 3' da forquilha de replicação colapsada. A paralização da replicação devido ao *nick* em uma das fitas moldes provoca o deslocamento da DNA-polimerase para qualquer sequência de fita simples próxima que tenha micro-homologia (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015).

De modo geral a extremidade livre sofre ação de uma exonuclease para expor uma saliência 3'. A extremidade 3' invade uma sequência homóloga e inicia a síntese de DNA. Contudo, a forquilha pode apresentar baixa processabilidade e a nova fita sintetizada se solta da sequência homóloga. Desse modo, a extremidade livre estabelece nova forquilha e reinicia a síntese. Após alguns ciclos de invasão, extensão e separação a forquilha torna-se mais reprodutível e a replicação prossegue até o fim do braço cromossômico ou do replicon (Figura 7) (HASTINGS; IRA; LUPSKI, 2009).

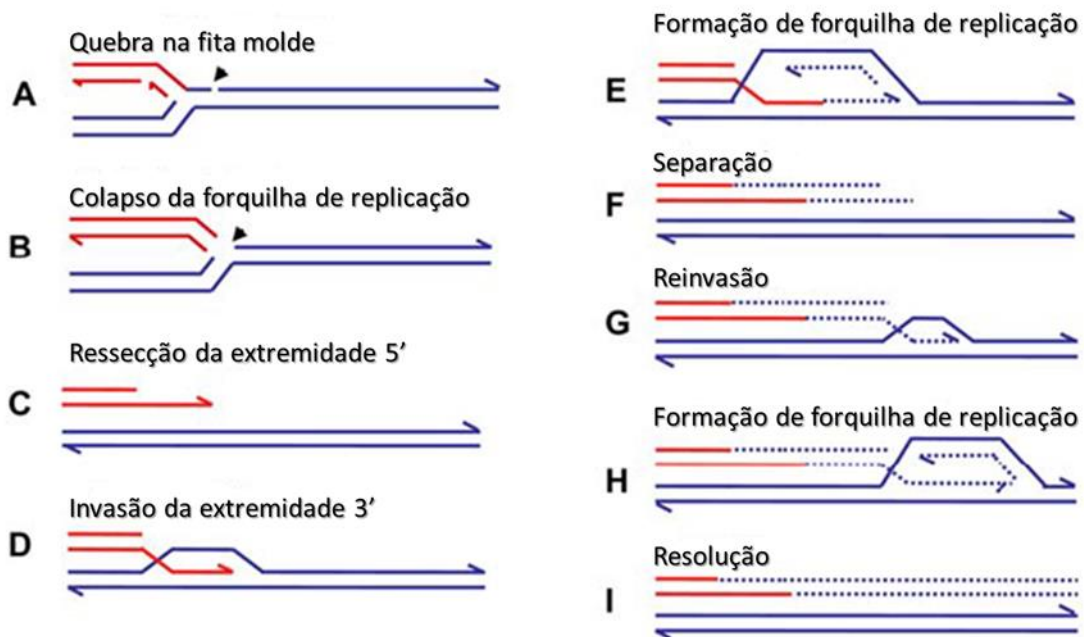


Figura 7. Reparação da forquilha de replicação colapsada. (A) Nick na fita molde. (B) Colapso da forquilha de replicação. (C) Excisão da extremidade 5'. (D) Invasão da extremidade 3' de outra dupla fita, que pode ser mediada por microhomologia. (E) Formação de nova forquilha de replicação, com seguidos ciclos de separação, invasão e formação de forquilhas até a resolução.

Fonte: Adaptado de Hastings; Ira; Lupski, 2009.

Dependendo da localização da sequência homóloga e da posição da forquilha diferentes variações estruturais podem surgir a partir desse mecanismo de reparo: translocação, duplicação, deleção, triplicação, inversão e rearranjos complexos (HASTINGS; IRA; LUPSKI, 2009).

7 Metodologias utilizadas na identificação de variações estruturais

7.1 Bandeamento

A investigação e detecção das variações estruturais do genoma humano teve início em 1952 a partir do tratamento hipotônico de células em cultura o que tornou possível a visualização individual dos cromossomos em metáfase (MARTIN; WARBURTON, 2015). O estudo publicado por Hsu (1952) analisou cultura de fibroblastos que demonstraram diversos graus de compactação cromossômica. Segundo o autor só foi possível fazer a contagem cromossômica em quatro

metáfases, que naquele momento, demonstraram ter 48 cromossomos. A Figura 8 mostra os registros obtidos da análise por realizada Hsu em 1952.

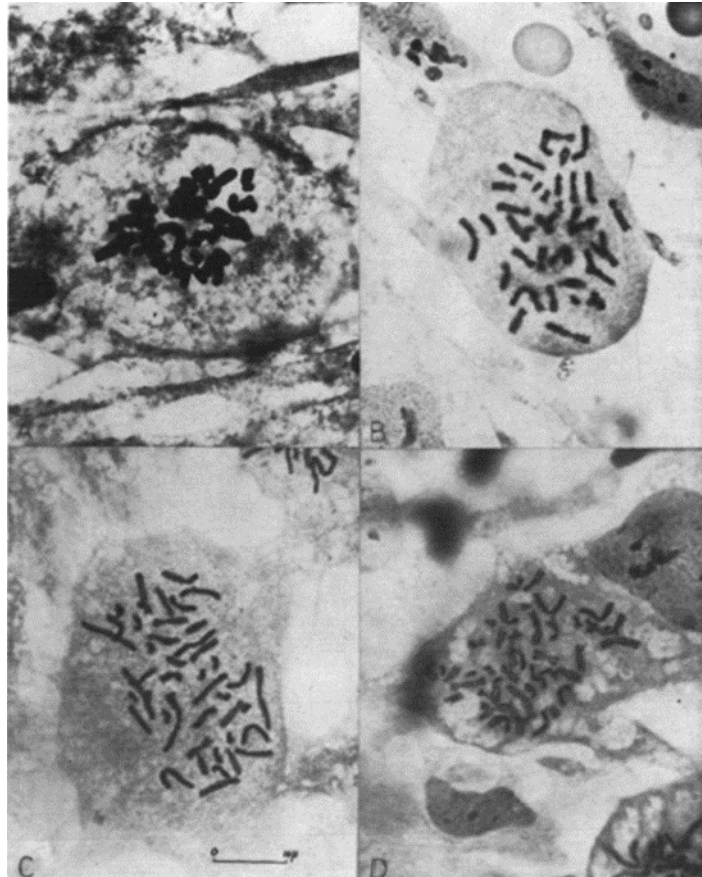


Figura 8. Metáfases obtidas a partir da cultura de fibroblastos obtidos de explante de pele (A) e de explante de baço (B-D).

Fonte: HSU, 1952.

Em 1956 foi estabelecido por Tijo e Levan que o conjunto cromossômico humano tinha na verdade 46 cromossomos. Até início da década de 1970 as células em metáfase eram apenas coradas, sem um pré-tratamento, dessa forma os cromossomos eram corados por inteiro, mostrando um padrão único de coloração. Esse tipo de coloração permitia apenas a diferenciação dos cromossomos pelo tamanho e posição do centrômero. Mesmo assim, já foi possível a identificação anormalidades numéricas, como as síndromes de Down (trissomia do 21), Klinefelter (47, XXY) e Turner (45, X) (DOLAN, 2011) e até mesmo algumas alterações estruturais maiores como a deleção do braço curto do cromossomo 4 (WILCOCK et al., 1970).

Posteriormente a técnica evoluiu para a utilização de lâminas tratadas com tripsina e coradas com Giemsa, o que permitiu a visualização de um padrão de bandas

específico para cada cromossomo (Figura 9) (revisado em MARTIN; WARBURTON, 2015). A banda pode ser definida como a parte de um cromossomo que é claramente distinguível dos segmentos adjacentes por aparecer escuro ou claro após as técnicas de bandeamento (revisado em HUANG; CHEN, 2017). Esse padrão oscilante de regiões claras e escuras apresentado pelos cromossomos são definidas pela distribuição de sequências ricas em AT (bandas claras) e ricas em CG (bandas escuras) (revisado em HU; MAURAS; LY, 2020).

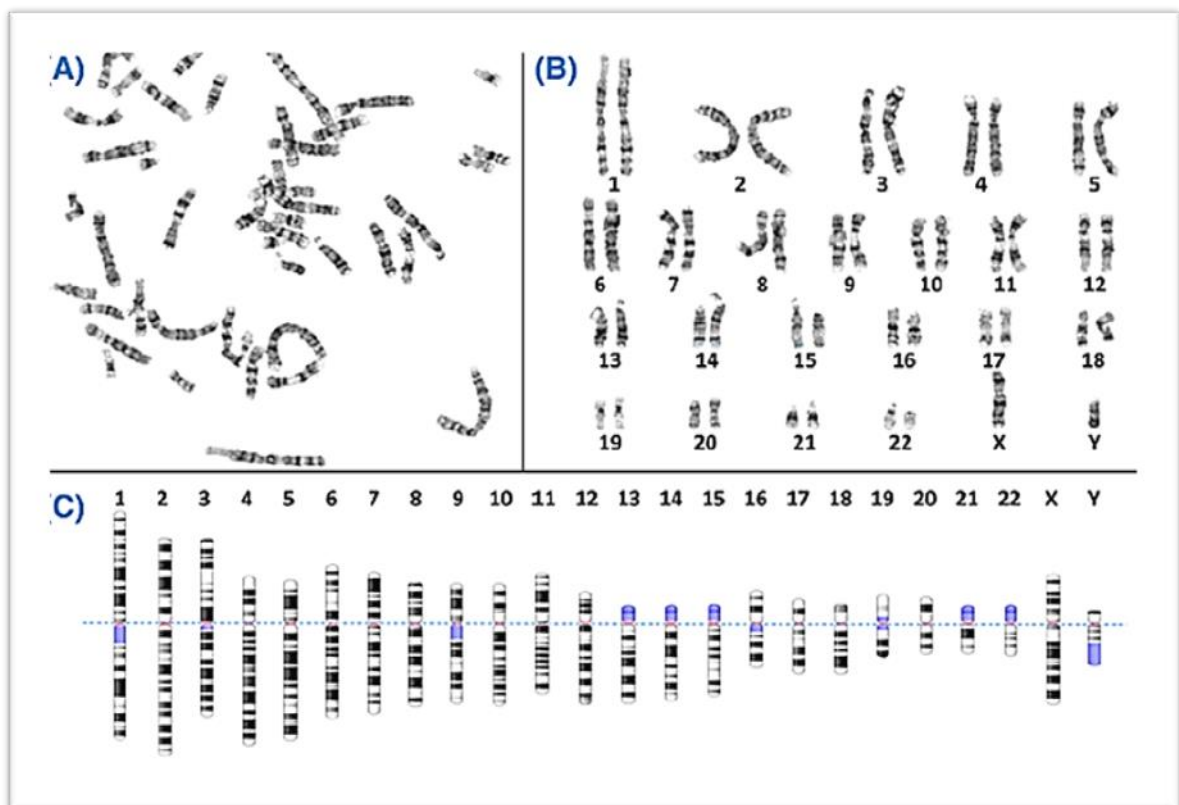


Figura 9. Bandeamento G. (A) As propagações de metáfase como esta são obtidas a partir de células cultivadas paradas em metáfase seguido por coloração com Giemsa para criar bandas claras e escuras características. (B) Os cromossomos da propagação são organizados em pares para visualizar o cariótipo, muitas vezes usando software especializado. (C) Representações diagramáticas dos padrões de banda G, chamados ideogramas, são usados como referência. Os ideogramas foram alinhados no centrômero (linha pontilhada); as regiões sombreadas em azul são altamente variáveis.

Fonte: Jackson; Marks; May; Wilson, 2018.

A análise do cariótipo por bandeamento-G tornou possível a detecção variações estruturais em larga escala, além das alterações numéricas, sendo a técnica de citogenética clássica mais utilizada em laboratórios clínicos (HU; MAURAS; LY, 2020). A capacidade de detectar translocações, inversões, deleções e duplicações

permitiu o esclarecimento de diversas anormalidades cromossômicas, como a síndrome de Cri du Chat caracterizada pela deleção distal do braço curto do cromossomo 5, e o cromossomo Filadélfia (t 9;22) associado a leucemia mieloide crônica (DOLAN, 2011).

Outras abordagens técnicas complementam a análise por bandeamento-G como os bandeamentos R, C e NOR. No bandeamento-R, antes da coloração com Giemsa, os cromossomos são tratados com solução salina ácida quente levando a desnaturação preferencial de regiões ricas em AT, o que promove um padrão de bandas oposto ao visto na banda G. Desse modo, as bandas G e R são complementares e coram preferencialmente regiões de eucromatina (Figura 10) (HUANG; CHEN, 2017).



Figura 10. Bandamento-R. Evidencia-se o padrão de coloração oposto ao bandeamento-G.

Fonte: www.biomedicinapadiao.com.br

O bandeamento C permite a análise de regiões de heterocromatina constitutiva, ou seja, regiões constituídas por DNA repetitivo e que não codificam genes conhecidos (Figura 11 A). A heterocromatina está presente nos centrômeros de todos os cromossomos e na porção distal do braço longo do cromossomo Y. Portanto, a banda C contribui para identificação de rearranjos cromossômicos que envolvem as

regiões pericentroméricas, especialmente dos cromossomos 1, 9 e 16 (DOLAN, 2011).

Já o bandeamento NOR utiliza a coloração com prata para expor as regiões organizadoras de nucléolo presentes nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos, que são ricas em repetições de DNA ribossômico (Figura 11 B) (HU; MAURAI; LY, 2020). Este bandeamento pode contribuir para a identificação de rearranjos e polimorfismos envolvendo cromossomos acrocêntricos. Além disso, também é possível identificar a origem parental em trissomias (MALUF; RIEGEL et al., 2011).

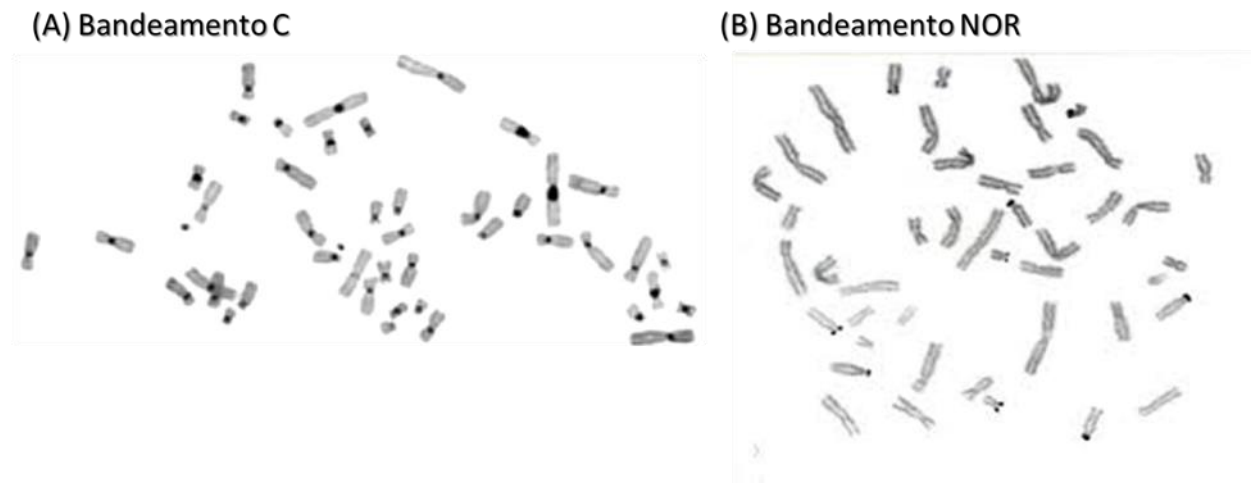


Figura 11. Bandeamentos cromossômicos. (A) Bandeamento C, com coloração preferencial das regiões centroméricas. (B) Bandeamento NOR, coloração das regiões organizadoras de nucléolo dos cromossomos acrocêntricos.

Fonte: www.biomedicinapadrao.com.br

7.2 Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH)

Rudkin e Stollar (1977) descreveram um novo método de análise que permitia a identificação de híbridos de DNA-RNA em preparações citológicas. Contudo, somente no final da década de 1980 a hibridização fluorescente *in situ* passou ser utilizada em larga escala na detecção de anormalidades submicroscópicas, ou seja, alterações que não eram possíveis ser vistas ao cariótipo convencional (MARTIN; WARBURTON, 2015).

A hibridização *in situ* foi uma técnica que tornou possível a identificação de sequências específicas de mRNA e DNA em amostras de tecido fixadas ou amostras

de cultura celular a partir da hibridização de uma fita complementar marcada (MONTAZERINEZHAD; EMAMJOMEH; HAJIEGHRARI, 2020).

A técnica tem como princípio a capacidade de um DNA fita simples se ligar ao seu DNA complementar. Células em metáfase (ou interfase) são fixadas em uma lâmina de microscópio e hibridizadas com sondas de oligonucleotídeos marcadas com um fluorocromo, o que permite a detecção por microscopia de fluorescência (BISHOP, 2010). A Figura 12 mostra de forma esquemática as etapas da técnica de FISH.

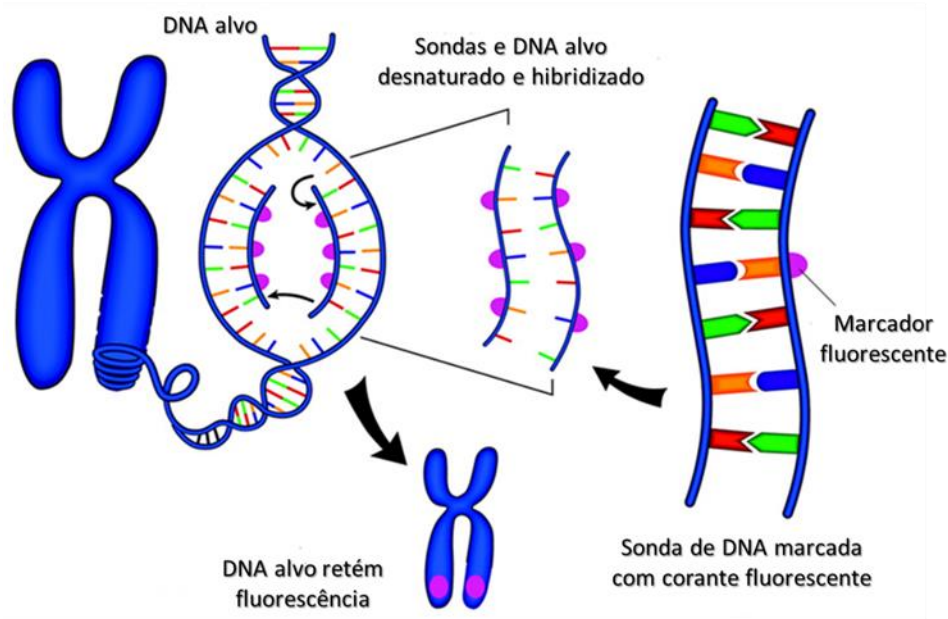


Figura 12. Representação esquemática da técnica de FISH. DNA alvo é desnaturado para poder hibridizar com a sonda marcada com fluorescência.

Fonte: Adaptado de Wippold; Perry, 2007.

Esse método passou a explorar a capacidade de desnaturação e renaturação do DNA na detecção de sequências alvo específicas com elevado grau de sensibilidade (HU; MAURAS; LY, 2020). Isso permitiu que a técnica tivesse diversas aplicações passando a ser utilizada como um importante instrumento de investigação em laboratórios clínicos (BISHOP, 2010), que tornou possível a detecção de alterações cromossômicas menores, em torno de 10 Kb (MARTIN; WARBURTON, 2015).

Diferentes tipos de sondas foram desenvolvidas permitindo a análise de diversas regiões cromossômicas: (1) *paint probes*, pintam o cromossomo por

completo sendo útil na contagem cromossômica e na identificação de rearranjos intercromossômicos; (2) sondas para regiões repetitivas, permite a avaliação de regiões centroméricas e telôméricas; (3) sondas locus específico, direcionadas para pontos interrupção definidos. Além disso, no FISH *multicolor* é realizada a co-marcação e visualização de todos os cromossomos gerando uma combinação de cores única para cada cromossomo, o que auxilia na identificação de rearranjos intercromossômicos (Figura 13) (HU; MAURAI; LY, 2020).

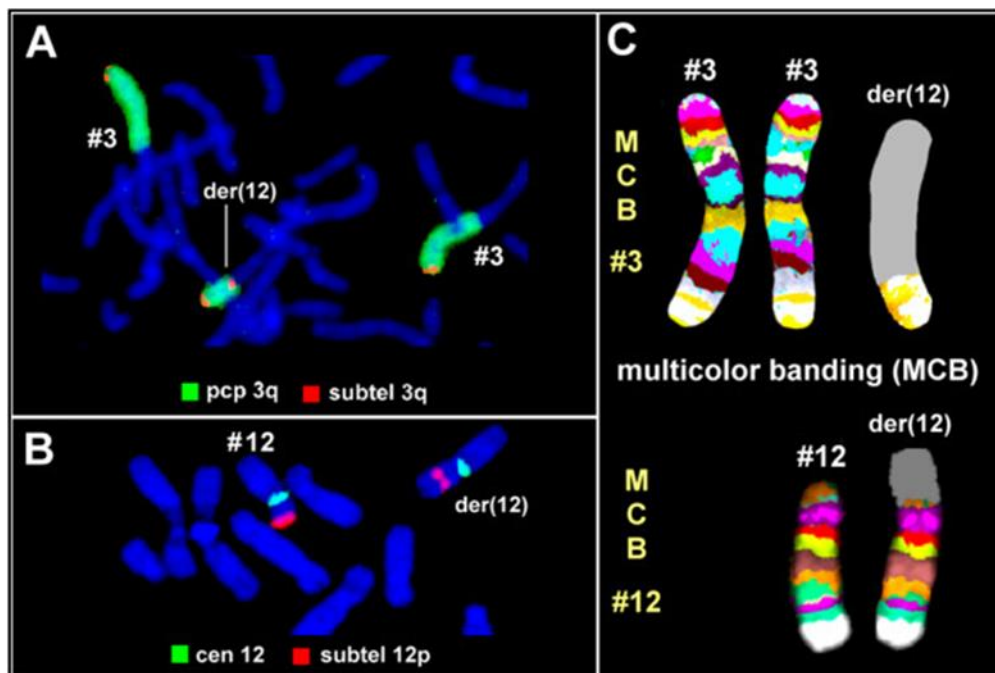


Figura 13. Análise de FISH de um indivíduo com cromossomo 12 derivativo, detectado previamente pela técnica de bandeamento G. (A) Pintura do braço curto dos dois cromossomos 3 normais e do cromossomo 12 derivativo (verde), fundidos com a sonda subteloômérica 3q (vermelho). (B) Hibridização da sonda subteloômérica 12p no cromossomo 12 normal e derivativo. (C) Análise de bandas multicoloridas usando conjuntos de sondas específicos para os cromossomos 3 e 12. O padrão resultante provou que o material adicional em der(12) resultou de uma duplicação invertida da porção terminal de 3q.

Fonte: Carreira et al., 2009.

O advento do FISH, portanto, contribuiu para a ampliar a sensibilidade do cariótipo na detecção de alterações cromossômicas submicroscópicas: microdeleções e microduplicações, translocações, e rearranjos envolvendo regiões teloméricas e centroméricas (MARTIN; WARBURTON, 2015).

7.3 Metodologias de hibridização genômica

A primeira metodologia de hibridização genômica comparativa (CGH) foi desenvolvida por Kallioniemi et al. (1992). O método de citogenética molecular capaz de detectar CNVs através da comparação de sequências de DNA relativas entre genomas utilizando amostras de células e tecidos sem a necessidade de cultura. A análise de células tumorais de bexiga permitiu a identificação de 16 regiões de amplificação não detectadas anteriormente.

Contudo, o CGH ainda apresentava uma baixa resolução, 3-10 Mb para deleções e 2 Mb para amplificações. A técnica foi então aprimorada, o array-CGH surgiu em 1997 como uma plataforma para a detecção de CNVs, sendo capaz de alcançar uma resolução de 1 Mb nas suas primeiras versões até 30-100 Kb nas plataformas atuais (GRANADA et al., 2020; REN et al., 2005; SHINAWI; CHEUNG, 2008).

No aCGH a análise de células em metáfase foi substituída por DNA genômico. O DNA extraído (teste) e o DNA controle são marcados com fluorocromos diferentes, para distinguir um do outro, e são co-hibridizados em uma matriz sólida contendo segmentos de DNA correspondentes a diferentes regiões cromossômicas (MALUF; RIEGEL et al., 2011).

Nos primeiros aCGHs esses segmentos eram produzidos a partir de clones de BAC (cromossomos artificiais bacterianos) ou YAC (cromossomos artificiais de levedura). Mais tarde houve a substituição por sondas de oligonucleotídeos, que passou a oferecer uma cobertura mais ampla de todo genoma (YLSTRA et al., 2006).

Após a hibridização a fluorescência gerada é medida de forma quantitativa por um *scanner* e os dados obtidos são convertidos em um perfil linear a partir de um *software* específico. Através da comparação do DNA teste e o DNA controle é possível identificar amplificações (fluorescência aumentada) e deleções (fluorescência diminuída). Quando não há diferença de sinal entre o teste e o controle significa que não houve ganho nem perda de conteúdo genômico (Figura 14) (MALUF; RIEGEL et al., 2011).

A evolução da técnica permitiu a detecção conjunta de CNVs e SNPs em uma mesma reação, elevando a cobertura do teste. Além disso, as novas plataformas passaram a hibridizar somente o DNA teste e fazer a comparação *in silico* com o conjunto de dados de referência. Dessa forma, tornou-se possível identificar origem

parental, dissomia uniparental, alterações genéticas raras e desequilíbrios alélicos somáticos em câncer (VANDEWEYER; KOOY, 2013).

Neste ponto da evolução da técnica já se utilizava sondas de oligonucleotídeos, o que permitiu uma cobertura de todo o genoma, aumentando potencialmente a detecção de CNVs, inclusive as intra-gênicas. Além disso, matrizes para a detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP array) também passaram a ser projetadas contribuindo de forma significativa para o diagnóstico de indivíduos com anomalias congênitas e do desenvolvimento (CHEUNG; BI, 2018). Além disso, a análise deixou de ser pareada e passou a ser feita uma comparação dos dados brutos das amostras com um banco de dados de indivíduos normais, diminuindo assim os riscos de resultados errôneos.

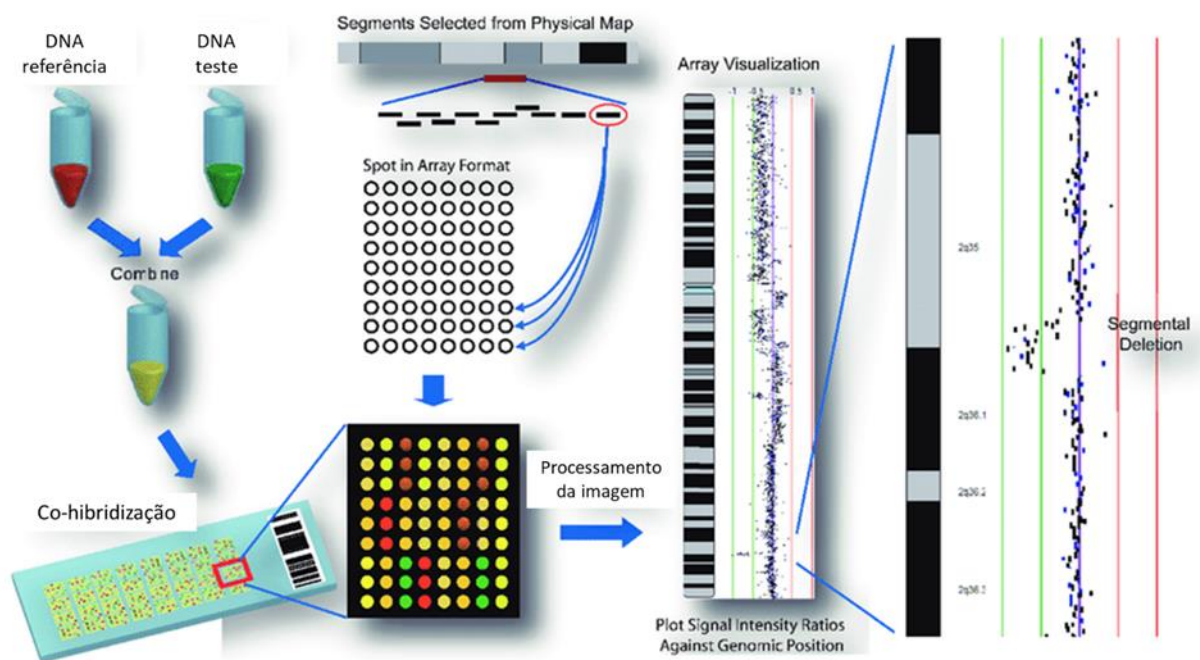


Figura 14. Representação esquemática da hibridação genômica comparativa por microarranjo (aCGH). A amostra teste e a de referência são marcadas diferencialmente com cianina-5 e cianina-3, respectivamente, e hibridizadas na matriz sólida contendo sondas que abrangem todo genoma. A razão das duas intensidades de sinal de fluorescência reflete o número relativo de cópias naquele alvo. A imagem gerada é processada tornando possível a visualização do perfil de número de cópias.

Fonte: Adaptado de Chari; Lockwood; Lam, 2006.

7.4 Metodologias de sequenciamento

Uma das primeiras metodologias de sequenciamento que se popularizou foi a desenvolvida por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). A técnica também conhecida como “método de terminação da reação em cadeia” apresentava um processo similar ao da PCR, com ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

Contudo, o processo de extensão era interrompido pela adição de um ddNTP marcado radioativamente, um nucleotídeo com uma hidroxila a menos no carbono 3'. Dessa forma, os fragmentos diferentes tamanhos gerados eram visualizados em um gel de acrilamida após o processo de eletroforese. Assim tornou-se possível determinar a sequência do DNA em questão.

A técnica foi aprimorada e passou a utilizar ddNTPs marcados com fluoróforos, cada base marcada com uma cor, o que permitiu que o sequenciamento pudesse ser realizado em apenas uma reação. Além disso, a eletroforese em gel foi substituída pela eletroforese capilar levando a detecção das sequências de forma automatizada (PAREEK; SMO CZYNSKI; TRET YN, 2011).

A detecção de SVs por metodologias de sequenciamento tornou-se possível com o advento da segunda geração de sequenciamento. As metodologias de *Next Generation Sequencing* são caracterizadas pela alta cobertura e pela leitura de sequências curtas (*short-reads*). O DNA genômico passa por um processo inicial de fragmentação, e posteriormente é sequenciado em ambas as extremidades (*paired-end sequencing*) (YANG, 2020).

As sequências obtidas são então alinhadas a um genoma de referência e assim é realizada a chamada de variantes, sendo um excelente método para identificação alterações ao nível de pares de bases e de CNVs, através de diferentes abordagens de análise (GORDEEVA; SHAROVA; ARAPIDI, 2022). No caso das SVs o sequenciamento *short-read* não se mostrou a melhor opção. As leituras curtas se alinham mal em regiões repetitivas o que torna a chamada de variantes um processo complexo e propenso a erros (YANG; WU; YAN, 2019).

O desenvolvimento recente do sequenciamento de leituras longas (terceira geração) permitiu a detecção de alterações estruturais do genoma de forma precisa e com elevada acurácia. Sequências contínuas de 10 kb até vários megabases podem ser obtidas diretamente do DNA nativo. Existem atualmente duas metodologias disponíveis: sequenciamento de molécula única em tempo real (SMRT - PacBio); e o sequenciamento *Oxford Nanopore* (ONT) (LOGSDON; VOLLGER; EICHLER, 2020).

O sequenciamento de *long-read* permitiu a detecção de todos os grupos de variações estruturais, inclusive a avaliação de rearranjos complexos, conforme demonstrado na Figura 15. Potenciais aplicações clínicas incluem: diagnóstico de doenças raras, que em sua maioria possuem origem genética; genômica do câncer, tecnologias de leitura longa já demonstraram resultados significativos; e o diagnóstico *in situ* de patógenos infecciosos. Contudo, a utilização em larga escala tem sido inviabilizada devido ao alto custo da técnica (OEHLER et al., 2023).

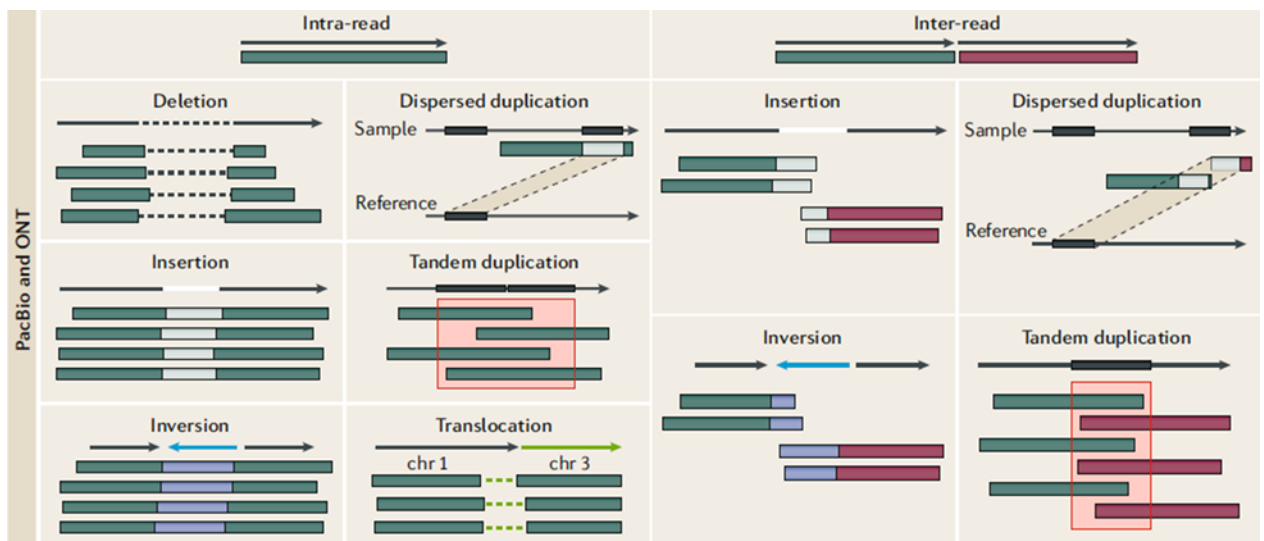


Figura 15. Alterações estruturais possíveis de serem detectadas pelos sequenciamentos long-read PacBio e ONT.

Fonte: Ho; Urban; Mills, 2020.

7.5 Mapeamento Óptico Genômico (OGM)

A investigação de variações estruturais no genoma recebeu um importante reforço com o desenvolvimento do mapeamento óptico genômico. A técnica baseia-se na análise de moléculas de alto peso molecular que são marcadas e linearizadas em eletroforese de *NanoChannels* (sistema Saphyr). Os mapas ópticos gerados fornecem imagens de moléculas de DNA únicas em seu estado nativo (CHAN et al., 2018a).

O isolamento do DNA é realizado a partir da incorporação das células/núcleos em uma matriz de agarose para blindar o DNA de possíveis quebras durante o processo de purificação. A agarose é fundida e o DNA resultante é purificado através de diálise por gota. As moléculas são então marcadas de 8 a 28 vezes em um motivo

específico (entre 6 e 7 pb) a cada 100 Kb. Cada molécula apresenta um padrão de marcação diferente das demais, o que permite a identificação e alinhamento de maneira única no *nanochip* (BOCKLANDT; HASTIE; CAO, 2019).

O DNA isolado e marcado é aplicado no chip do sistema *Saphyr* e são realizados ciclos de eletroforese para mover as moléculas de alto peso molecular da solução para o microambiente do chip. Quando todos os canais estão carregados a eletroforese é interrompida (BOCKLANDT; HASTIE; CAO, 2019).

As imagens brutas obtidas através da leitura do chip são convertidas em moléculas que são agregadas e permitem a montagem *de novo* do genoma. A chamada de variantes é feita a partir do alinhamento com o genoma de referência e são realizadas ao se observar alterações do padrão de espaçamento, posição e orientação das regiões marcadas (CHAN et al., 2018). A Figura 16 mostra as etapas do OGM.

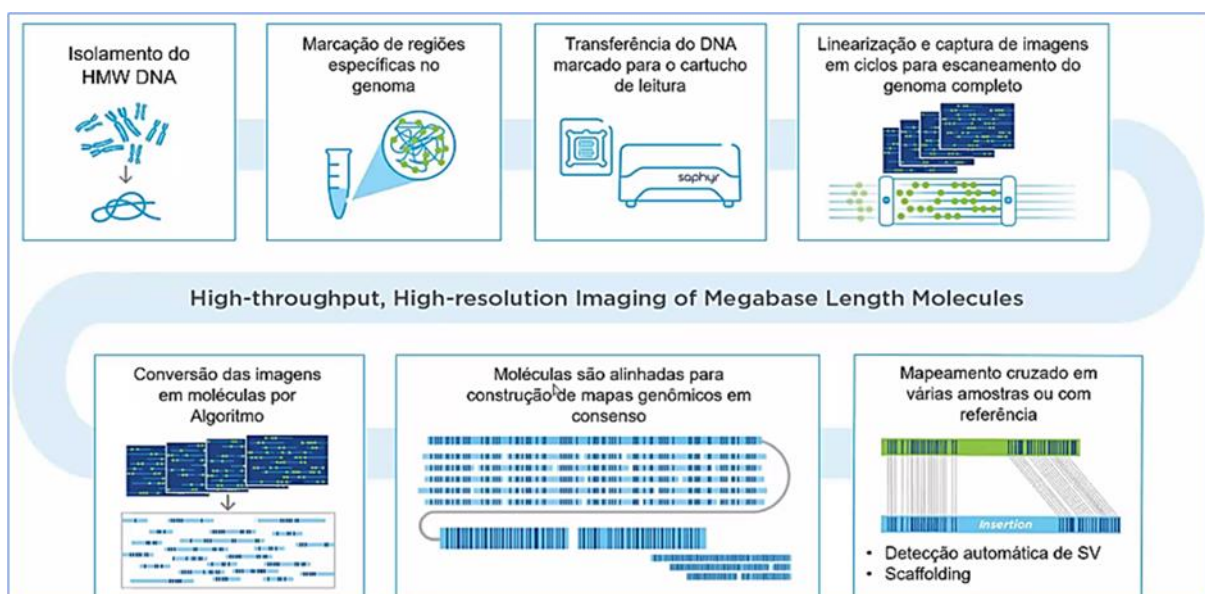


Figura 16. Fluxo de trabalho *Bionano* para isolamento de DNA, marcação, geração de imagem e análise
Fonte: Bocklandt; Hastie; Cao, 2019.

Dessa forma, o mapeamento óptico genômico permite identificar os principais tipos de variações estruturais: deleção/inserção, representado regiões mal alinhadas, ou não alinhadas, flanqueadas por regiões bem alinhadas; translocação, identificadas por pontos de fusão entre regiões distantes; inversão, alinhamento com orientação oposta; e variação no número de cópias, expansões ou duplicações em tandem (Figura 17) (BOCKLANDT; HASTIE; CAO, 2019).

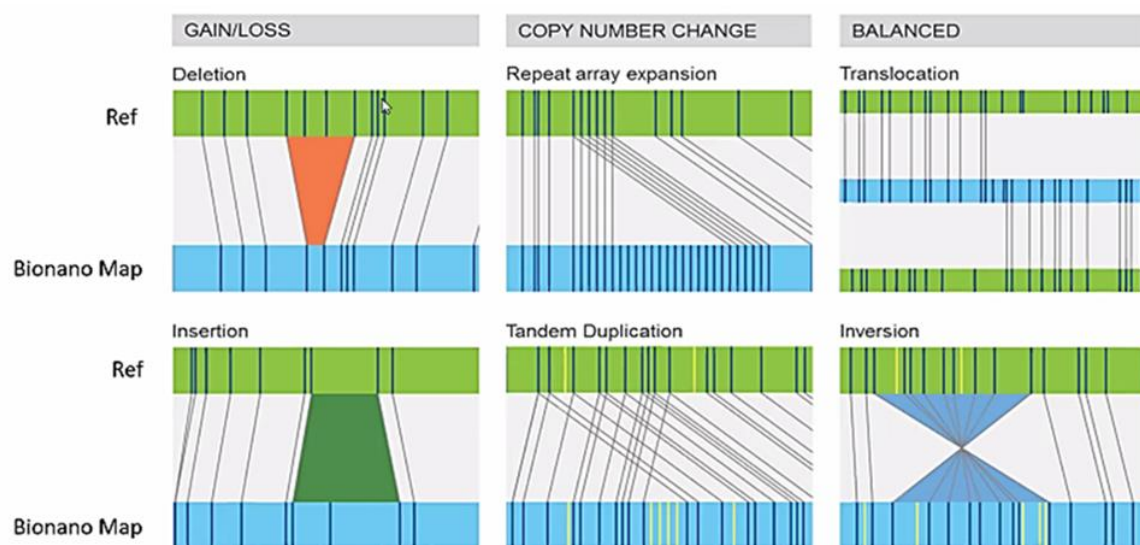


Figura 17. Representação esquemática da visualização das variações estruturais detectadas pelo mapeamento óptico.

Fonte: BOCKLANDT; HASTIE; CAO, 2019.

Portanto, é possível identificar todas as classes de variações estruturais partir de 500 pb de forma mais precisa. A técnica também permite a identificação da origem parental e fornece dados sobre zigossidade (SAHAJPAL et al., 2021). Na figura a seguir é possível ter um demonstrativo de todos os dados gerados pela técnica, denominado *circos plot* (Figura 18).

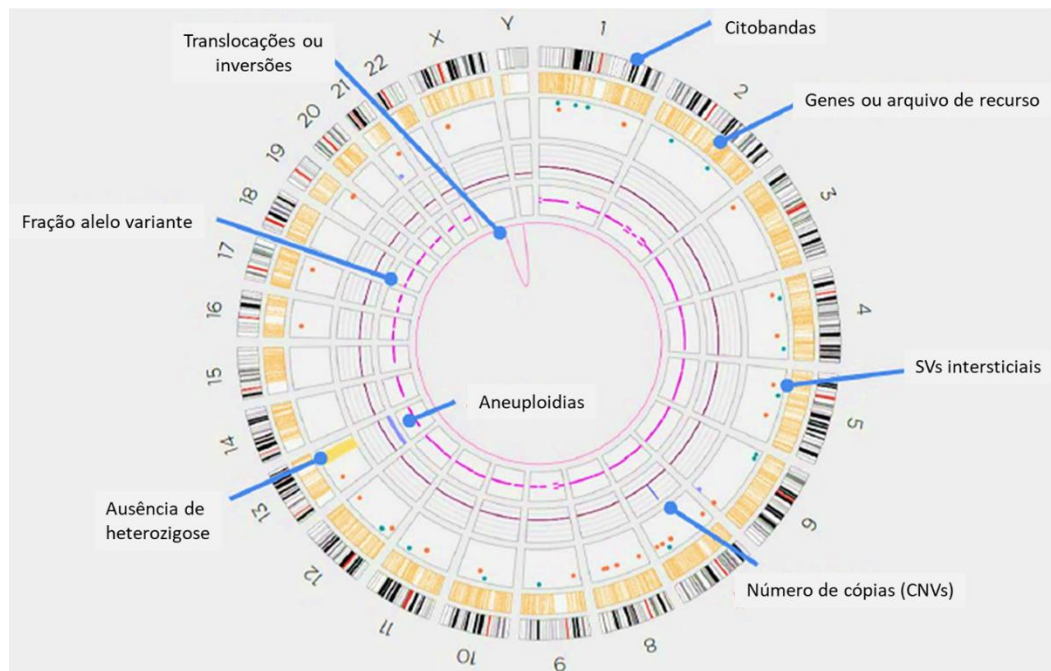


Figura 18. *Circos plot*. Imagem representativa do resultado do OGM com as respectivas interpretações. O gráfico fornece um resumo completo do genoma das variantes detectadas: CNVs, regiões de ausência de heterozigose e um perfil de fração de alelo variante. Essa exibição é filtrada dinamicamente na interface do usuário do *software Access*. O gráfico *Circos* também exibe o número de cromossomos, citobandas e, opcionalmente, localizações de genes.

Fonte: Guia *Bionano Genomics*.

Mantere et al. (2021) avaliaram anormalidades estruturais em 85 indivíduos utilizando a citogenética tradicional (combinação de diferentes técnicas) e o mapeamento óptico genômico. Houve 100% de concordância entre as duas análises e a técnica forneceu achados adicionais não identificados anteriormente.

Além disso, o OGM apresenta um refinamento da identificação dos pontos de quebra em relação a citogenética convencional, tendo uma resolução 10 mil vezes maior que o cariótipo. Contudo, o OGM apresenta como principal limitação a impossibilidade de detectar pontos de quebra dentro de regiões repetitivas como centrômeros e braço curto dos cromossomos acrocêntricos (MANTERE et al., 2021).

8 Justificativa

Considerando as técnicas clássicas de investigação citogenética e o surgimento de novas metodologias moleculares, sobretudo as que utilizam leituras longas e DNA em estado nativo, é relevante avaliar como essas metodologias em conjunto podem contribuir para o processo de identificação e caracterização dos diferentes tipos de SVs. Desse modo, pode-se estabelecer quais metodologias de análise são indicadas de acordo com cada tipo de SV e contribuir para o diagnóstico de doenças genéticas que tem como origem rearranjos cromossômicos estruturais.

9 Objetivos

9.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo investigar como as metodologias de cariótipo, *microarray* cromossômico e mapeamento óptico genômico podem contribuir para a investigação de rearranjos cromossômicos estruturais.

9.2 Objetivos específicos

1. Descrever portadores de rearranjos cromossômicos estruturais.
2. Caracterizar o tipo alteração estrutural, identificar os pontos de quebra e o conteúdo gênico envolvido no rearranjo
3. Estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo.
4. Verificar como as técnicas de investigação citogenética utilizadas contribuíram para a elucidação do quadro clínico.

10 Metodologia

10.1 Seleção de pacientes

Foram selecionadas 10 famílias portadoras de variações cromossômicas estruturais atendidas no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário de Brasília. Os pacientes e/ou seus responsáveis foram esclarecidos e solicitados a

assinar o termo de consentimento livre e esclarecido ao concordarem em participar do projeto. Foram coletados de 4 a 8 ml de sangue periférico em tubos contendo anticoagulante EDTA e heparina.

10.1.1 Critérios de inclusão

Ser portador de alteração cromossômica estrutural previamente identificada: deleção, duplicação, translocação, inversão, cromossomo marcador e inserção.

10.2 Cariótipo

A análise do cariótipo foi realizada a partir da coleta sangue periférico contendo heparina. A primeira etapa consiste no cultivo de linfócitos em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) por 72 horas a 37°C. Em seguida, para a interrupção da divisão celular e obtenção de metáfases foi adicionado Colchicina.

As amostras então foram transferidas para tubos falcon seguida de centrifugação e adição de solução salina para hipotonização. A fixação das células foi realizada utilizando Carnoy I (3:1 Álcool Metílico / Ácido Acético Glacial).

Para preparação das lâminas de bandeamento G foi realizado tratamento com tripsina e coloração com *Giemsa*. Para a realização do bandeamento C as amostras foram tratadas previamente com ácido, seguido de álcali antes de serem coradas por *Giemsa*. Desse modo, as regiões de heterocromatina contendo sequência de DNA altamente repetidas foram coradas preferencialmente.

10.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico preservadas em anticoagulante EDTA. A extração consiste em quatro etapas: (1) lise celular; (2) precipitação da proteína; (3) precipitação do DNA; e (4) hidratação do DNA.

Para a lise celular foi utilizada solução de lise RBC (5 mM MgCl₂ e 1 mM EDTA pH 8,0). Foi adicionado 3 mL de sangue total a tubo *falcon* de 15 mL contendo 9 mL de solução RBC. O tubo foi invertido e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a 3400 rpm. O sobrenadante foi removido deixando um pellet de leucócitos e 100-200 µL de líquido residual. O pellet foi ressuspenso utilizando o vortex e em seguida foi adicionado ao tubo 3 mL de solução de lise celular (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS). Na

presença eventual de resíduos a solução foi incubada a 37°C até ficar totalmente homogênea.

Foi então adicionado ao lisado celular 1 mL de solução de precipitação de proteína composta por 7,5 M NH₄Ac e 57,81g de acetato de amônia diluídos em 100 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada no vórtex por 20 segundos e seguida foi centrifugada por 10 minutos a 3400 rpm.

O sobrenadante contendo DNA foi transferido para um tubo *falcon* contendo 3 mL de isopropanol 100%. O tubo foi invertido lentamente cerca de 50 vezes até o aparecimento dos aglomerados de DNA. Em seguida a solução foi centrifugada por 3 minutos a 3400 rpm formando um pequeno pellet de DNA. O sobrenadante foi descartado e 3 mL de etanol 70% foi adicionado ao pellet. O tubo foi invertido várias vezes com o objetivo de lavar o pellet de DNA. A amostra foi centrifugada por 1 minuto a 3400 rpm e o sobrenadante foi novamente descartado. O pellet (DNA) foi seco a temperatura ambiente.

Para hidratar o DNA extraído foi adicionado 200-250 µL de tampão TE 1X seguido de incubação a 65°C por 1 hora. Posteriormente o DNA foi armazenado a 2°C. As amostras foram quantificadas e diluídas de acordo com as técnicas moleculares utilizadas

10.4 Análise Cromossômica por *Microarray* (CMA)

Para identificar a presença de CNVs e ausência de heterozigose foi utilizada a análise cromossômica por *microarray*. A presença de alterações cromossômicas submicroscópicas foi investigada utilizando a plataforma CytoScan™ 750k (Thermo Fisher Scientific®).

A técnica de CMA tem por base a utilização de sondas (oligonucleotídeos), de sequência conhecida, dispostas em um *microchip*. Os chips CytoScan™ 750k apresentam cerca de 750 mil sondas: 550 mil não polimórficas, que permitem uma análise em alta resolução de variações no número de cópias (CNVs); e 200 mil sondas polimórficas, o que proporciona a análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs).

O DNA genômico extraído foi normalizado para uma concentração de 50 ng/µL, para isso foi diluído em *Low EDTA TE buffer*. O DNA diluído passou uma etapa de digestão, com a enzima de restrição *Nsp I*, seguido da ligação de adaptadores pela

enzima *T4 DNA Ligase*. Os primers universais se anelam aos adaptadores durante a etapa posterior de amplificação (PCR) dos fragmentos obtidos. Após a etapa de PCR, o produto amplificado foi capturado com o uso de esferas magnéticas e purificado com tampão de purificação.

Em seguida as amostras amplificadas foram quantificadas no espectrofotômetro *Nanodrop® 2000* (*Thermo Scientific*, EUA), fragmentadas e marcadas com biotina. Posteriormente, para a etapa de hibridação, 200 µL de cada amostra foram depositados no *GeneChip®*, e estes incubados a 50°C por 16-18h à 60 rpm. Após a hibridização os chips foram lavados em na estação automatizada *Fluidics Station 450* (*Thermo Fisher Scientific®*).x, EUA) e marcados com fluoróforo. Os chips foram analisados utilizando o scanner *GeneChip® Scanner 3000 7G* (*Thermo Fisher Scientific®*).

Os dados obtidos foram analisados utilizando o *Chromosome Analysis Suite* (*ChAS*) Software (*Thermo Fisher Scientific®*). Foram utilizados os seguintes parâmetros de análise: MAPD até 0.25; SNPQC > 15; deleção, alteração do padrão de 25 sondas consecutivas; duplicação, alteração do padrão de 50 sondas consecutivas. A Figura 19 esquematiza de forma simplificada as etapas da CMA.

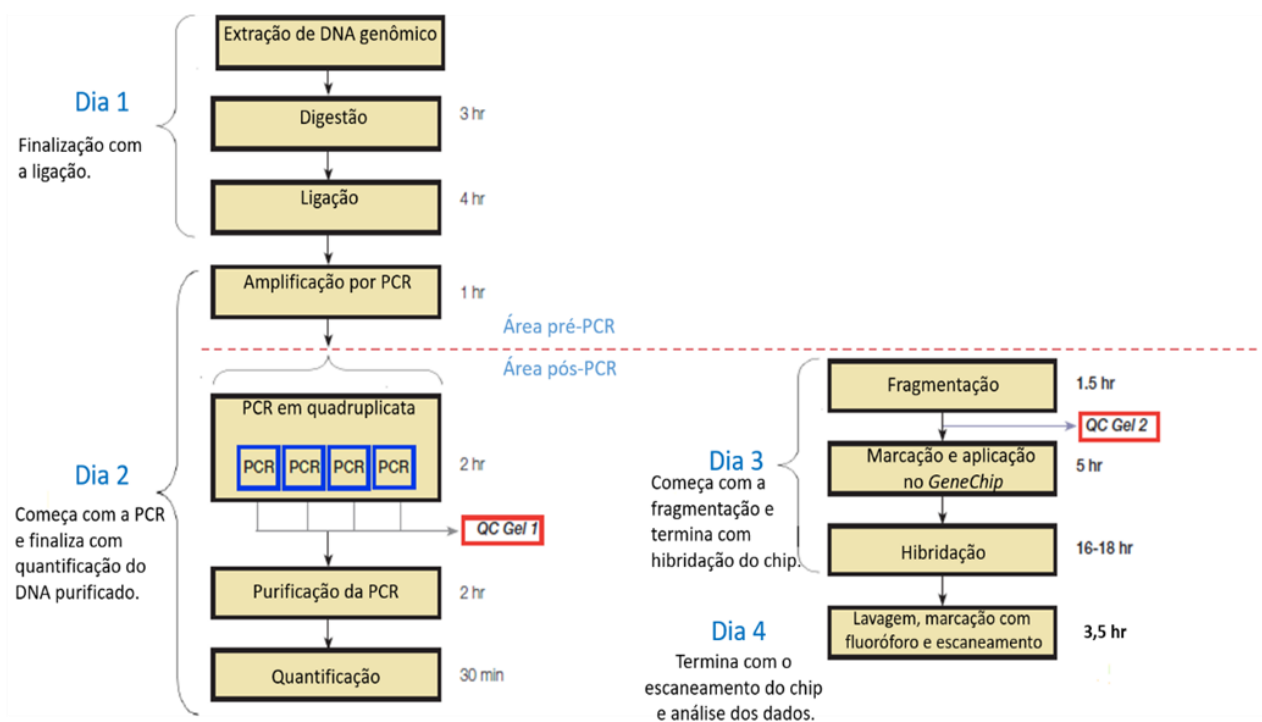


Figura 19. Protocolo resumido da plataforma *Affymetrix® CytoScan® 750k Array*, com o tempo aproximado de cada etapa.

10.5 Mapeamento Óptico Genômico

Para a investigação mais aprofundada das variações estruturais identificadas, foi realizado o mapeamento óptico genômico da *Bionano Genomics* (San Diego, CA, USA). A técnica baseia-se na leitura de moléculas longas de DNA nativo marcadas em motivos específicos (sequências CTTAAG). Os mapas ópticos gerados permitem a montagem *de novo* genoma e a identificação de todos os tipos de variações estruturais a partir de 500pb.

As reações foram realizadas no Laboratório da empresa Uniscience de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de sangue coletadas em tubo contendo EDTA foram armazenadas a -80°C . Para extração de DNA foi utilizado o kit *Sample Prep SP Blood and Cell Kit PN#80042*. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C e em seguida foi realizada a contagem de leucócitos pelo equipamento *Hemocue WBC DIFF*. O volume de sangue total que contém no mínimo $1,5 \times 10^6$ leucócitos foi centrifugado. Ao *pellet* formado contendo leucócitos foi adicionada a solução DNA *stabilizer* e proteinase K, seguido do tampão de lise e PMSF. Em seguida foi adicionado isopropanol e um disco *nanobind*, onde o DNA deve aderir. Os disco contendo DNA passou por etapas de lavagem seguido de eluição para obtenção do DNA livre.

O DNA extraído foi quantificado com um fluorímetro acoplado ao equipamento *DeNovix DS-11* utilizando o kit *dsDNA Broad Range*. A concentração ideal deve ficar entre 36–150 ng/ μL (coeficiente de variação $< 0,30$). Em seguida, 750 ng de DNA foram marcados utilizando *DLS kit PN#80005*, que contém um mix de enzima DLE-1, DLE Buffer e DL-Green (fluoróforo). Após a marcação o DNA foi quantificado no fluorímetro acoplado ao equipamento *DeNovix DS-11* com kit *dsDNA High Sensitivity*. A concentração ideal deve ficar entre 4-12 ng/ μL (coeficiente de variação $< 0,30$).

O material marcado foi carregado no *Saphyr Chip G2.3 PN#20366* para o processo de eletroforese e captura das imagens. Após a captura da quantidade de dados solicitada (450Gbp – 100X e 1800Gbp – 400X), foi criado um arquivo de moléculas. Os dados foram analisados no *Software* da *Bionano* com pipeline *De Novo Assembly*. A figura a seguir esquematiza de forma simplificada as etapas do Mapeamento Óptico Genômico (Figura 20).

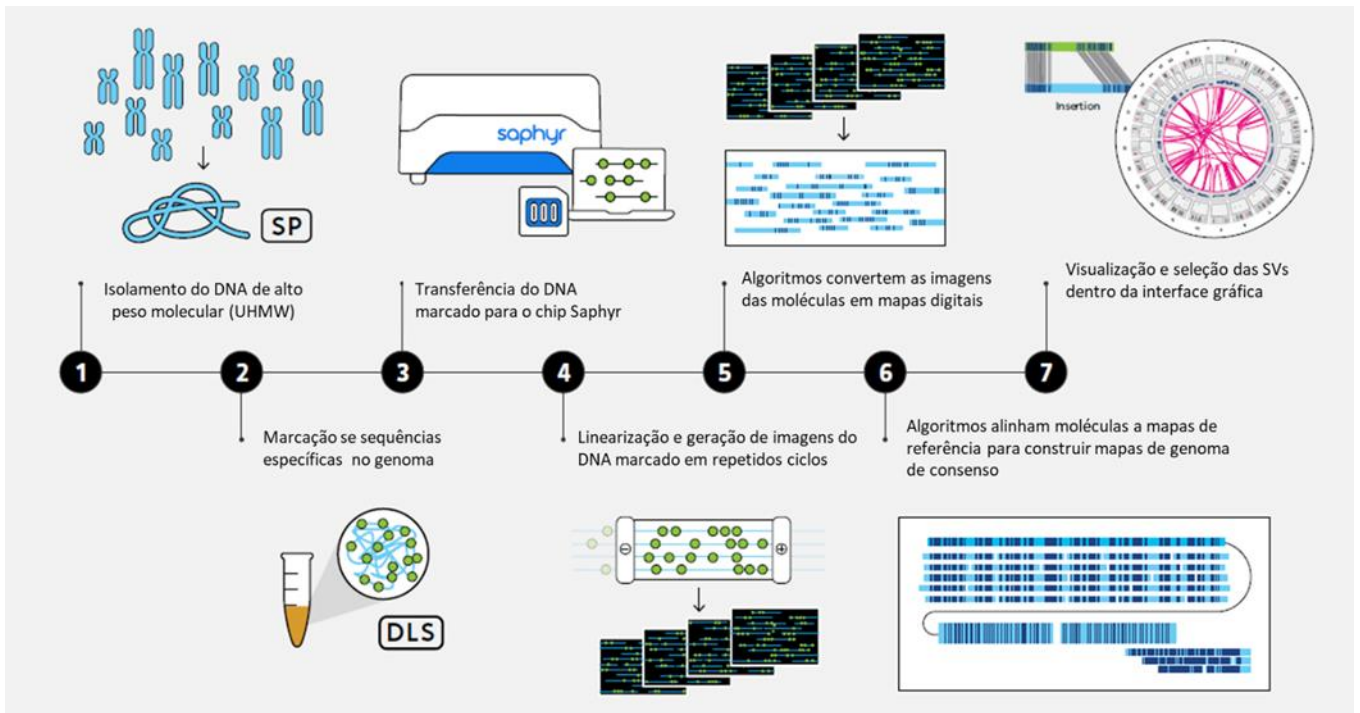


Figura 20. Protocolo resumido das etapas de processamento e análise do Mapeamento Óptico Genômico *Bionano Genomics*®.

10.6 Sequenciamento *Long-read PacBio*

Para uma análise mais detalhada das alterações estruturais, especificamente no caso 5, foi realizado o *Long-read sequencing SMRT (Single-molecule real-time)* da *Pacific Biosciences*. Essa metodologia promove a leitura de sequências longas, entre 15-20 Kb, permitindo não só análise da sequência, como também de variações estruturais no genoma.

A tecnologia *SMRTbell™* é um modelo de DNA de fita dupla coberto por alças em grampo em ambas as extremidades. O modelo *SMRTbell* é estruturalmente linear e topologicamente circular gerando sequências senso e anti-senso a partir de uma única molécula.

A primeira etapa consiste na preparação da amostra através da extração de DNA de alto peso molecular. O DNA genômico extraído passa por uma etapa de reparo, ligação dos adaptadores e limpeza por ação de nucleases. Com a biblioteca *SMRTbell* pronta foi realizado o anelamento dos primers e a ligação da polimerase. Então o DNA circularizado foi sequenciado repetidamente e cada leitura da sequência formou um *subread*. A partir do alinhamento dos *subreads* obteve-se a sequência final consenso (Figura 21). Todas as etapas do sequenciamento e análise foram realizadas segundo protocolo da *PacBio* no Laboratório *MrDNA* nos Estados Unidos.

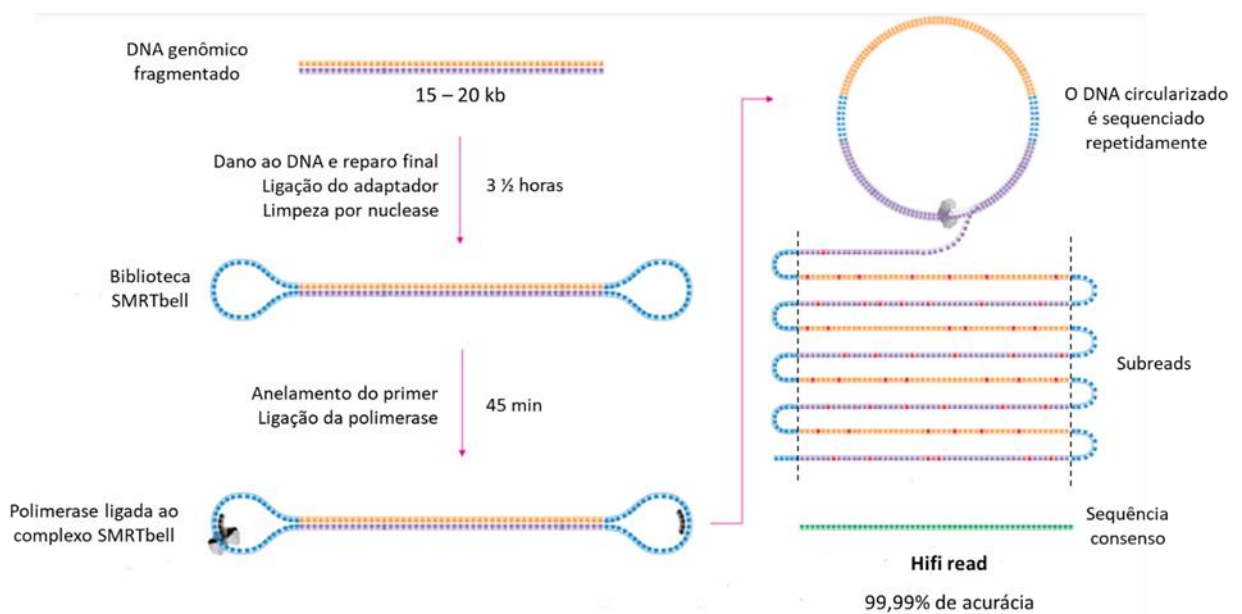


Figura 21. Protocolo resumido das etapas de processamento do sequenciamento *long-read* da *Pacific Biosciences*®.

10.7 Análise *in silico* dos domínios de associação topológica (TADs)

Nos casos em que não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo e/ou sugerir um gene candidato foi realizada a análise dos TADs na plataforma *TADeUS2* (<https://tadeus2.mimuw.edu.pl/>), que permite avaliar como SVs e CNVs podem afetar a conformação natural da cromatina, além de fornecer uma estrutura visual para a interpretação de SVs/CNVs que afetam as estruturas dos TADs.

Através da inserção das coordenadas dos pontos de quebra, previamente identificados, o programa analisa se há interrupção de TADs e gera um *score* de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo. Desse modo, é gerado um *ranking*

dos principais genes que podem estar com a expressão alterada e, portanto, contribuir para as manifestações fenotípicas.

Segundo descrito por Poszewiecka et al. (2022) o *score* de patogenicidade de um gene é calculado com base nos seguintes indicadores: *score* de haploinsuficiência/triplossensibilidade do *ClinGen*; o número de interrupções de interação potenciador-promotor preditas com base nos pontos de quebra; o número de nomes e links associados ao fenótipo descrito no *Human Phenotype Ontology* (HPO); e a distância dos pontos de interrupção do rearranjo.

11 Resultados e Discussão

Foram descritas 9 famílias portadoras de rearranjos cromossômicos estruturais. Além disso, o conhecimento prévio de um caso familiar de microduplicação, não vista ao cariótipo, foi adicionado e discutido em conjunto com uma das 9 famílias descritas. A priori as alterações foram investigadas com as metodologias de cariótipo, CMA e OGM, no entanto a utilização dessas metodologias de análise, ou outras adicionais, foram adequadas à necessidade de cada caso.

Tabela 1: Compilado dos resultados da investigação citogenética

FAMÍLIA	CARIÓTIPO	CMA	OGM
1	47,XY + mar	18p(136,227-15,170,636)x4	Não avaliado
2	46,XX,der(4)t(4;7)(p16;q32)mat	7q31.32(121,770,469-159,119,707)x3 37,2Mb 4p16.3(121,106-1,670,584)x1 1,5 Mb	Não avaliado
3	46,XX,t(1;10)(q32;p13)	Normal	t(1;10)(q31.3;p13)
4	46,XX,t(3;12)(q29;q14)	Normal	t(3;12)(q26.31;q14.3)
5	46,XY,t(5;8)(q33q21.2)	Normal	t(5;8)(q35.2;q22.2)
6	46,XY,inv3(p14p25)	Normal	inv(3;3)(p26.1;p14.1)
7	46,XY,inv(7)(p13q32)	Normal	inv(7;7)(p12.1;q31.32)
8	46,XY,inv(2)(p13p25.1)	2p22.3 (chr2:32,635,270-33,325,378) dup 690Kb	inv(2;2)(p24.1;p15) dup(2)(p22.3p22.3) 655Kb 2p11.2(87,295,858_88,057,222)x1 761Kb
9	t(9;20)(q22;q13.3),9qh+,9qh+	Normal	t(9;20)(q21.12;q11.23)
10	Normal	8p23.3p23.3(1,570,315-2,330,754)x3 dup 760Kb	8p23.3p23.2(1,565,872_2,273,570)x3 dup 707,6 Kb

Família 1

Descrição clínica

Paciente do sexo masculino, com dois meses de idade e filho de pais não consanguíneos. Encaminhado para a Genética por apresentar baixa estatura, baixo peso ao nascimento, malformação de orelha e discreta assimetria facial.

Ao exame físico foi identificado: aparente microssomia, fendas palpebrais discretamente oblíquas para baixo, raiz e ponte nasal altas, boca pequena, palato estreito e retrognatia. Assimetria facial mais evidente ao choro com lateralização da boca para a esquerda. Orelha direita: microtia, implantação baixa com presença de *pit* pré-auricular; orelha esquerda: sobredobramento da hélice.

Membros proporcionais e bem alinhados, pregas palmares normais, dedos alongados com presença de saliências nas falanges proximais. Genitália tipicamente masculina com discreta hipoplasia da bolsa escrotal. Comprimento de 46,5 cm (< 3º percentil) e perímetro cefálico de 31,5 cm (< 3º percentil).

Achados citogenéticos

Pela análise do cariótipo foi identificada a presença de um cromossomo marcador extranumerário (47,XY+mar). Os pais do probando foram testados e apresentaram cariótipo sem alterações, sendo, portanto, uma alteração cromossômica *de novo*.

Por meio do CMA foi identificada a presença de uma tetrassomia do braço curto do cromossomo 18 [18p(136,227-15,170,636)x4] (Figura 22), possível origem do cromossomo marcador observado ao cariótipo.

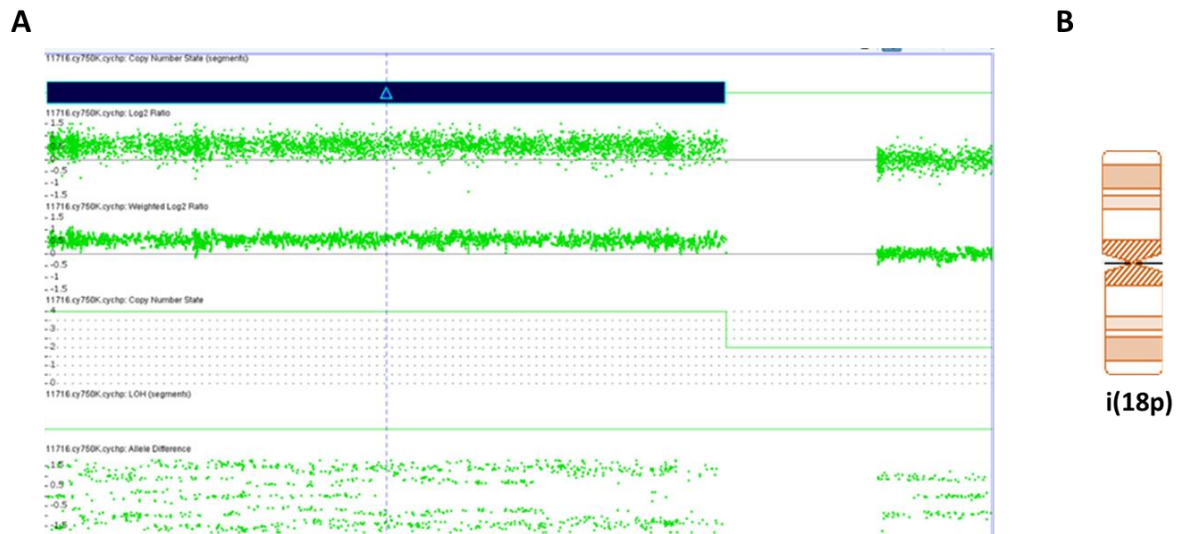


Figura 22. Tetrassomia de 18p no caso 1. (A) Resultado do CMA, o retângulo azul escuro indica a presença de quatro cópias do braço curto do cromossomo 18 [18p(136,227-15,170,636)x4]. (B) Representação esquemática do isocromossomo i(18p).

Discussão

O paciente descrito na família 1 apresenta como principais traços fenotípicos: baixa estatura, baixo peso ao nascimento, assimetria facial e malformação de orelha. O cromossomo marcador identificado no cariótipo tem origem no braço curto do cromossomo 18, identificado pela presença de quatro cópias desse segmento através do CMA.

A tetrassomia 18p ocorre devido a formação de um isocromossomo [i(18p) OMIM 614290], uma alteração cromossômica rara descrita em 1963 por Froland et al. A maior parte dos casos são *de novo*, como o paciente do caso 1, porém existem relatos de casos herdados (NUR et al., 2016).

Segundo Sebold et al. (2010) todos os casos relatados até aquele momento eram monocêntricos, indicando que o isocromossomo tem origem em dois eventos independentes: não disjunção e divisão incorreta do centrômero. A troca em formato de U também poderia levar a formação de um isocromossomo, contudo dicêntrico. Portanto, a hipótese mais provável é que o isocromossomo 18p seja de fato formado por esses dois eventos independentes. Além disso, a investigação da possível origem parental indicou que a não disjunção ocorre na meiose II materna, sugerindo que a idade materna pode ter influência na formação do isocromossomo.

A manifestação clínica é variável, porém os achados mais comuns são anormalidades craniofaciais, malformações esqueléticas e disfunção neuromuscular. Indivíduos portadores da tetrassomia 18p também apresentam atraso no desenvolvimento, alterações na fala e no comportamento (MOREIRA et al., 2019).

Sebold et al. (2010) avaliaram o fenótipo de 43 indivíduos com tetrassomia 18p em conjunto com 65 casos relatados na literatura previamente. A manifestação clínica prevalente em 100% dos casos analisados foi o atraso do desenvolvimento/deficiência intelectual, seguido de complicações neonatais como dificuldade de alimentação e hipoglicemia, tônus muscular anormal e microcefalia. O atraso do crescimento foi relatado em 30% dos casos.

As características físicas mais frequentes observadas foram filtro liso, anormalidades de palato e clinodactilia (SEBOLD et al., 2010). O paciente da família 1 apresenta boca pequena, malformação de orelha, falanges proximais proeminentes e hipoplasia da bolsa escrotal, todas manifestações observadas e relatadas por Sebold et al. (2010). Desse modo, pode-se concluir que a tetrassomia 18p é a causa das manifestações clínicas do paciente.

Família 2

Descrição

Paciente do sexo feminino com cinco meses de idade e filha de pais não consanguíneos. Foi encaminhada ao serviço de Genética aos dois meses de vida por apresentar dificuldade de sucção, hipoatividade, engasgos, clitoromegalia, displasia de quadril e pé torto congênito.

Ao exame físico foi também foi identificado: aparente macrocefalia, fronte ampla, pescoço curto, escleróticas azuladas, fendas palpebrais oblíquas para baixo, raiz nasal alta, ponte nasal larga, narinas antevertidas, palato estreito, filtro longo, orelhas rodadas para trás e com baixa implantação, pele marmorata, membros proporcionados, *dimple* sacral com pilificação fina e prega palmar única bilateral.

Achados citogenéticos

O cariótipo revelou a presença de um cromossomo derivativo ocasionando uma trissomia parcial de 7q e monossomia parcial de 4p [46,XX,der(4)t(4;7)(p16;q32)mat]. Os pais foram testados e o cariótipo materno revelou uma translocação balanceada entre os cromossomos 4 e 7 [46,XX,t(4;7)(p16;q32)], e o cariótipo paterno não apresentou alterações. Portanto, o rearranjo da probanda tem origem materna (Figura 23).

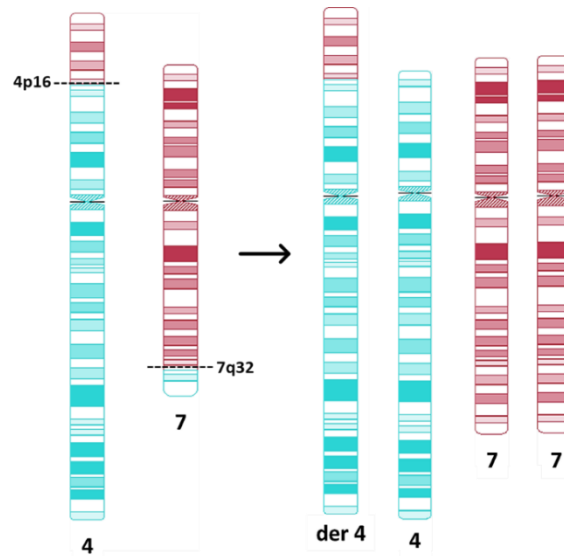


Figura 23. Representação esquemática do rearranjo no caso 2. Translocação materna balanceada que dá origem à translocação desbalanceada na probanda, representada pelo cromossomo 4 derivativo. As bandas sinalizadas indicam os pontos de quebra.

A análise de CMA da probanda mostrou uma duplicação de 37,2 Mb em 7q31.32 [(121,770,469-159,119,707)x3] (Figura 24) e uma deleção de 1,5 Mb em 4p16.3 [(121,106-1,670,584)x1] (Figura 25), confirmando o resultado do cariótipo e refinando o mapeamento do segmento alterado.

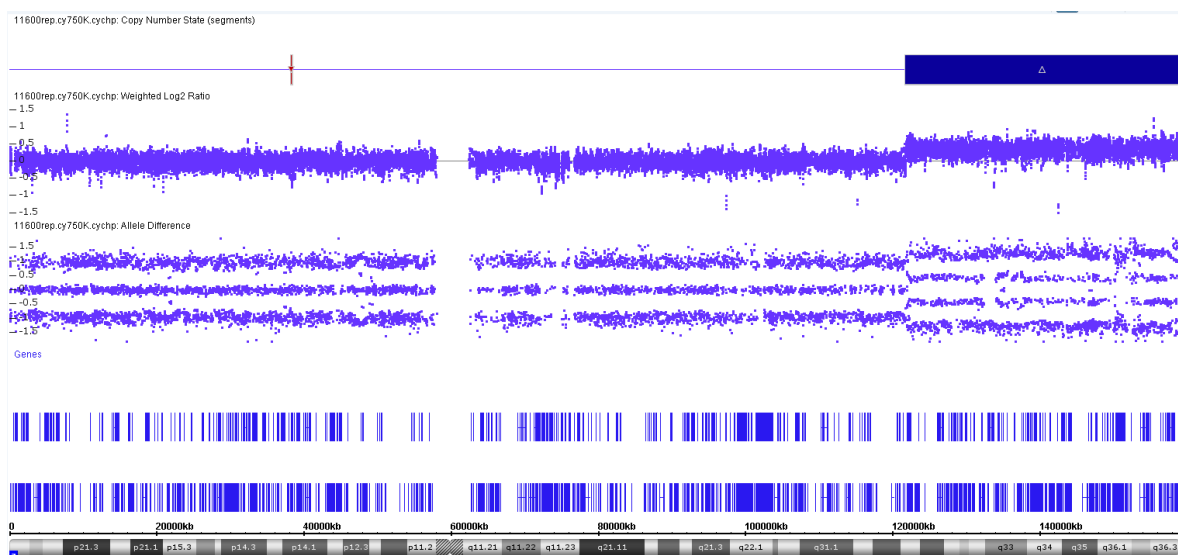


Figura 24. Duplicação de 37,2Mb em 7q31.32 no caso 2. O retângulo azul indica o segmento cromossômico duplicado [(121,770,469-159,119,707)x3].

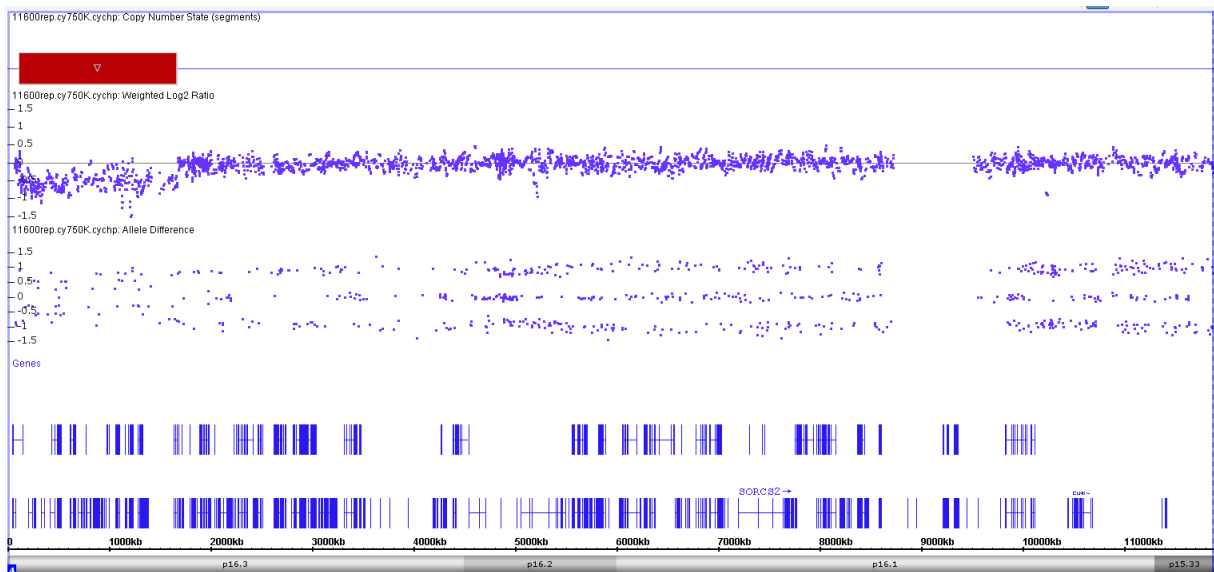


Figura 25. Deleção de 1,5Mb em 4p16.3 no caso 2. A barra vermelha superior indica o segmento cromossômico deletado [(121,106-1,670,584)x1].

Discussão

Como demonstrado na Figura, a probanda da família 2 apresenta um cromossomo 4 derivativo com origem em translocação balanceada materna. A investigação citogenética revelou uma monossomia parcial do cromossomo 4 (deleção de 1,5 Mb em 4p16.3) e uma trissomia parcial do cromossomo 7 (duplicação de 37,2 Mb em 7q31.32).

A deleção da porção terminal do braço curto do cromossomo 4 (4p16.3) está associada à síndrome Wolf-Hirschhorn (WHS, OMIM #194190), caracterizada fenotipicamente por dismorfias faciais, atraso de crescimento, convulsões e deficiência intelectual. Também pode haver presença de microcefalia, alterações cardíacas, hipotonia, anomalias renais e esqueléticas (CORRÊA et al., 2018).

Molecularmente a WHS é classificada como uma síndrome de genes contíguos em decorrência da deleção terminal ou intersticial de 4p. Inicialmente foram propostos dois genes candidatos para síndrome, *LEMT1* e *WHSC1*, que estão associados principalmente ao atraso do desenvolvimento. Contudo, não foi possível estabelecer uma correlação com a manifestação de convulsões e alterações craniofaciais. Portanto, outros genes deletados na mesma região poderiam contribuir para essas

manifestações, são eles: *PIGG*, *CPLX1*, *FGFRL1*, *CTBP1* (BATTAGLIA; CAREY; SOUTH, 2015).

A paciente descrita na família 2 apresenta uma deleção de 1,5 Mb que não inclui a região crítica para a síndrome, que contém os genes *LEMT1* e *WHSC1*, entretanto engloba todos os genes candidatos associados a malformações craniofaciais e convulsões. Além das malformações craniofaciais ela também apresentou alterações esqueléticas e atraso no desenvolvimento, que são características da síndrome.

Em cerca de 60% dos casos ocorre a deleção isolada de 4p16. Os outros 40% são decorrentes de translocação desequilibrada com monossomia parcial de 4p e trissomia parcial de um braço cromossômico diferente, geralmente proveniente de translocação materna balanceada (BATTAGLIA, 2002), assim como ocorre no caso 2. A translocação mais recorrente envolve o segmento distal do braço curto do cromossomo 8, entretanto outras regiões já foram relatadas (BATTAGLIA; CAREY; SOUTH, 2015).

Nessa paciente o rearranjo ocorre com o segmento distal do braço longo do cromossomo 7, não relatado previamente na literatura. A duplicação de 7q isolada é caracterizada por atraso global no desenvolvimento, dismorfias faciais, convulsões, alterações esqueléticas, defeitos cardíacos e anomalias geniturinárias (BOSFIELD; DIAZ; LEON, 2021).

Bosfield, Diaz e Leon (2021) descreveram um caso de duplicação de 30,8 Mb em 7q32.1q36.3 com quadro clínico de atraso global do desenvolvimento, tônus muscular anormal, convulsões, alterações geniturinárias, anormalidades cerebrais e defeitos cardíacos. Segundo os autores os principais genes implicados nas manifestações fenotípicas seriam: *CNTNAP2*, *DNAJB6*, *GALNTL5*, *GALNT11*, *KMT2C*, *NCAPG2*, *PAXIP1*, *PTPRN2*, *SHH* e *VIPR2*. Todos os genes listados também estão duplicados na paciente do caso 2.

A probanda apresenta um quadro clínico compatível com a monossomia de 4p e trissomia de 7q. Além disso, a partir do resultado de CMA pode-se inferir os pontos de quebra do rearranjo materno. No cromossomo 7 ocorre a interrupção do gene *AASS* associado a hiperlisinemia autossômica recessiva. Já o ponto de quebra no cromossomo 4 interrompe o gene *FAM53A* que não está associado a um fenótipo específico. Isso explica o fato de a mãe não apresentar manifestações clínicas, apesar de ser portadora da translocação equilibrada.

Indivíduos portadores de translocações balanceadas apresentam um maior risco de perda gestacional, infertilidade e de ter uma progênie com rearranjos desbalanceados assim como ocorre no caso em questão. Na meiose, os cromossomos translocados se associam ao seus homólogos durante a etapa de recombinação formando uma estrutura tetravalente. Na etapa seguinte de segregação cromossômica pode haver a formação de gametas normais, balanceados ou desbalanceados (WILCH; MORTON, 2018).

A proporção de embriões desequilibrados e o impacto fenotípico na progênie são variáveis, dependendo de fatores como origem parental, cromossomos envolvidos e se os pontos de quebra levam à interrupção de genes importantes. Desse modo, torna-se essencial a investigação desses casos e o aconselhamento genético orientando quanto à fertilidade, a possibilidade de filhos com alterações genéticas e avaliação do risco de recorrência (DAI et al., 2022).

Família 3

Descrição

Paciente do sexo feminino com 5 anos de idade e filha de pais não consanguíneos. Foi encaminhada para avaliação genética por estatura abaixo do limite inferior e dismorfias menores.

A paciente nasceu a termo, contudo apresentou desaceleração pôndero-estatural desde então. Ao nascimento foi identificado pé torto congênito unilateral à direita corrigido cirurgicamente aos dois meses de idade. Aos 4 anos apresentou quadro de vômitos e hipoglicemia, havendo a necessidade de internação.

Dois irmãos mais velhos, de 13 e 14 anos de idade, nasceram com pé torto congênito bilateralmente, também necessitando de correção cirúrgica. Além disso, eles apresentaram outras alterações esqueléticas como crescimento de estruturas ósseas e desvio de coluna, entretanto não apresentaram quadro de baixa estatura e/ou desaceleração pôndero-estatural.

Ao exame físico foi identificado: normocefalia, implantação alta da linha anterior dos cabelos, fendas palpebrais discretamente oblíquas para cima, esclera azulada, raiz e ponte nasal médias, filtro nasolabial pouco marcado, orelhas com implantação normal. Pregas palmares regulares, clinodactilia de 5º dedo bilateralmente, assimetria discreta de membros inferiores e frouxidão ligamentar. Apresentou ausculta pulmonar sem alterações e abdome flácido sem visceromegalias.

Achados citogenéticos

O exame de cariótipo revelou a presença de uma translocação aparentemente balanceada entre os cromossomos 1 e 10 [46,XX,t(1;10)(q32;p13)]. Os pais da probanda foram testados e apresentaram cariótipo sem alterações, sendo, portanto, uma alteração cromossômica *de novo*.

A análise cromossômica por *microarray* não identificou ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos, indicando que se trata de uma translocação balanceada.

Através da análise por OGM foi confirmada a presença da translocação [ogm[GRCh37] t(1;10)(q31.3;p13)] (Figura 26) com os respectivos pontos de quebra no cromossomo 1 (chr1:198,550,555-198,550,565) e no cromossomo 10 (chr10:13,603,206-13,603,216) (Figura 27). Apesar do rearranjo, não houve interrupção gênica nos pontos de quebra.

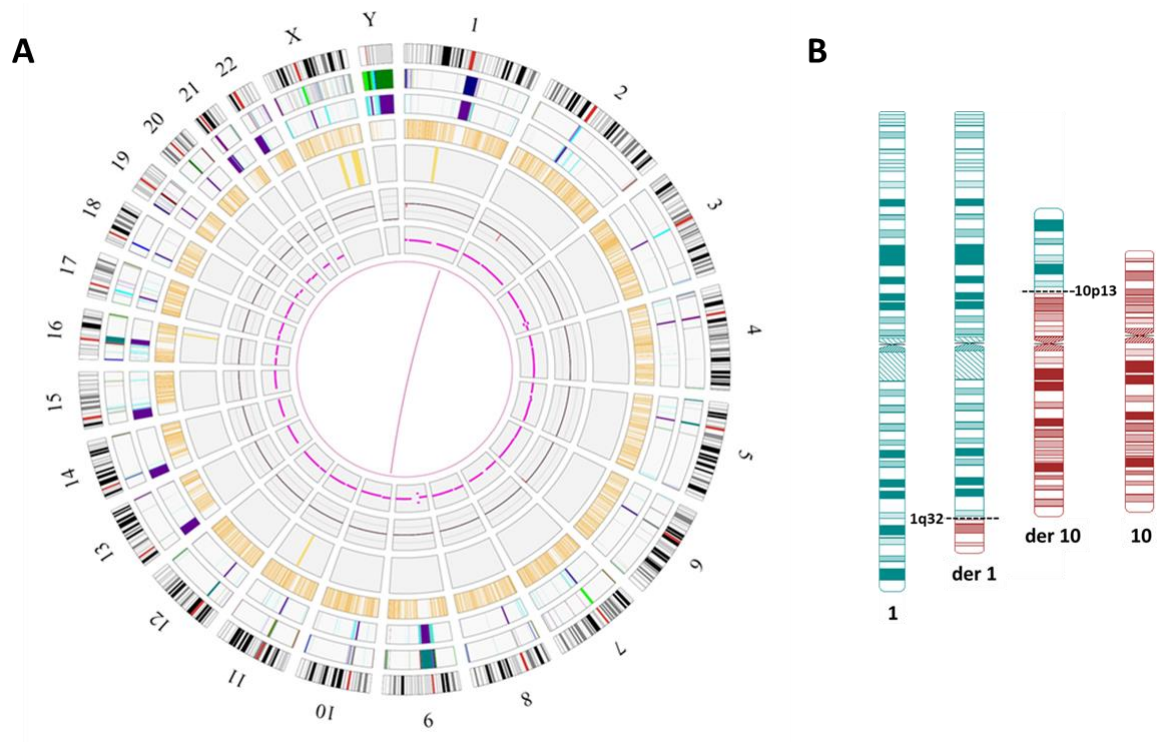


Figura 26. Translocação do caso 3. (A) *Circos plot*. A linha central que liga os cromossomos 1 e 10 indica a presença da translocação. (B) Representação esquemática da translocação $[t(1;10)(q32;p13)]$. As bandas destacadas indicam os pontos de quebra.

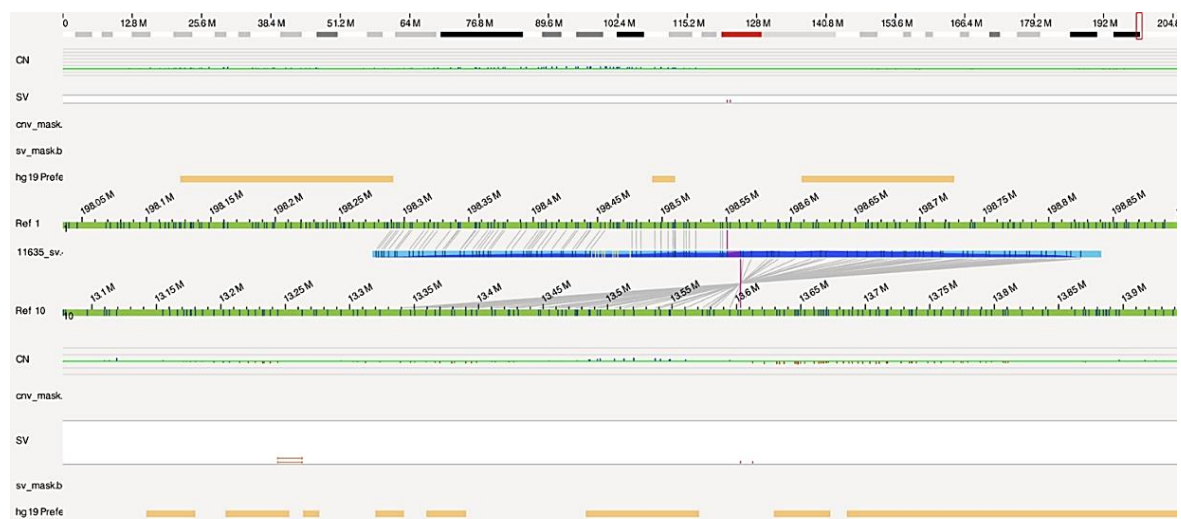


Figura 27. Pontos de quebra da translocação no caso 3. A barra azul central representa a amostra do paciente analisado. A barra verde superior representa o genoma de referência para o cromossomo 1 e a inferior a referência do cromossomo 10. Nota-se que parte da barra azul se alinha ao cromossomo 1 em sentido direto, e a outra parte se alinha ao cromossomo 10 em sentido invertido. A linha rosa vertical indica os pontos de quebra.

Através da análise na plataforma *TADeus2* foi identificada a interrupção dos TADs (Figura 28) e os genes que podem estar com a expressão gênica afetada de acordo com o ranking de patogenicidade, são eles: *PTPRC*, *ATP6V1G3*, *NEK7*, *ASPM* e *F13B* no cromossomo 1; *PHYH*, *FRMD4A*, *MCM10*, *BEND7*, *SEPHS1*, *PRPF18*, *UCMA*, *SNRPGP5*, *OPTN* e *DCLRE1C* no cromossomo 10 (Figura 29).

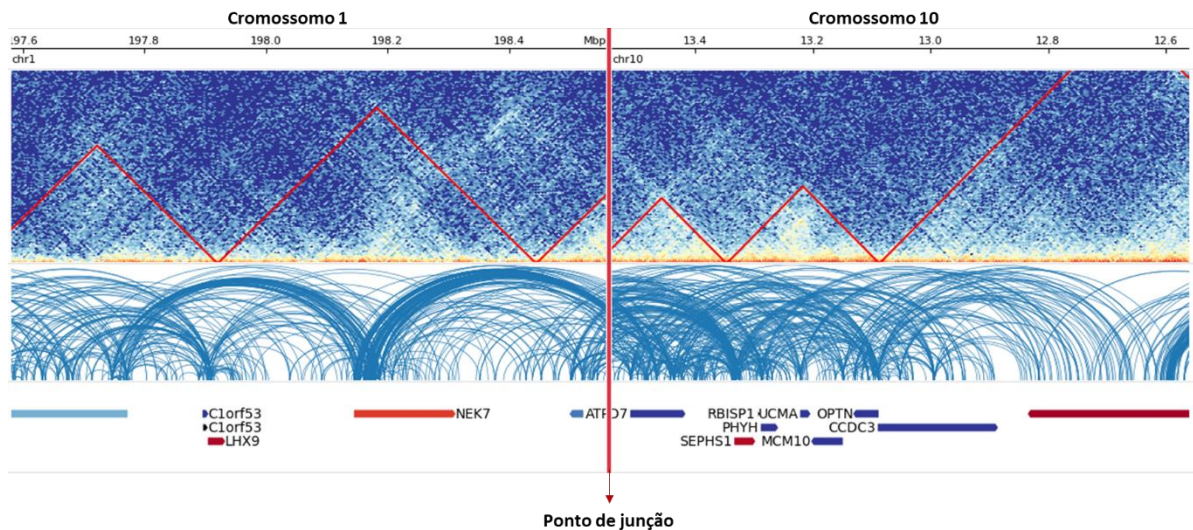


Figura 28. Análise *in silico* da translocação na plataforma TADeus2 no caso 3. Na primeira faixa os triângulos vermelhos representam os TADs. A segunda faixa mostra a interação entre promotores e *enhancers*. A faixa inferior mostra os genes presentes nas regiões analisadas. A linha vermelha vertical indica o ponto de junção dos cromossomos 1 e 10 devido a translocação.

Ponto de quebra cromossomo 1									
Gene symbol	pLI	ClinGen	ClinGen score	Enhancer-promoter interactions number	Enhancer-promoter interactions score	Phenotype score	Distance from breakpoints	Distance from breakpoints score (distance below 1Mb)	Total pathogenicity score
PTPRC	1.0000		0	170	1	1	57,032	1	3
ATP6V1G3	0.1075		0	10	1	0	40,480	1	2
NEK7	0.8802		0	4	1	0	259,005	1	2
ASPM	0.0000	30	1	0	0	1	1,434,731	0	2
F13B	0.0000	30	1	0	0	1	1,514,165	0	2
Ponto de quebra cromossomo 10									
PHYH	0.0000	30	1	11	1	1	258,804	1	4
FRMD4A	1.0000		0	25	1	1	82,490	1	3
MCM10	0.0000		0	1	1	1	350,106	1	3
BEND7	0.0061		0	70	1	0	32,242	1	2
SEPHS1	0.9764		0	56	1	0	212,918	1	2
PRPF18	0.0003		0	5	1	0	25,723	1	2
UCMA	0.0000		0	3	1	0	326,842	1	2
SNRPGP5			0	1	1	0	456,423	1	2
OPTN	0.0000		0	0	0	1	422,908	1	2
DCLRE1C	0.0000	30	1	0	0	1	1,336,143	0	2

Figura 29. Score de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 3. Lista de genes que potencialmente estão com a expressão alterada nos cromossomos 1 e 10.

Discussão

A paciente descrita na família 3 é uma menina de 5 anos com baixa estatura e dismorfias menores. Foi identificada uma translocação recíproca entre os cromossomos 1 e 10 que não leva a interrupção gênica.

Apesar das regiões de quebra cromossômica não conterem genes, somente a translocação em si pode levar a alterações patológicas tendo em vista que os cromossomos possuem organização e conformação pré-estabelecidas. O genoma é compactado e montado em estruturas tridimensionais que influenciam diretamente a expressão gênica através do controle espacial das interações entre regiões promotoras, *enhancers* e outros elementos reguladores (WILCH; MORTON, 2018). São os chamados domínios de associação topológica (TADs), regiões específicas e delimitadas que possuem elevada interação interna e são separadas por barreiras para impedir a interação entre domínios vizinhos (IBRAHIM; MUNDLOS, 2020).

Rearranjos cromossômicos estruturais podem modificar a arquitetura dos TADs seja deletando, duplicando, invertendo ou deslocando os seus limites. Desse modo, genes podem ser ativados de modo ectópico por *enhancers* de outros domínios, potencialmente levando a uma desregulação da expressão e ao estado de doença (LUPUÍÑEZ; SPIELMANN; MUNDLOS, 2016).

Apesar da translocação identificada na paciente descrita na família 3 não levar a interrupção gênica, houve uma mudança na configuração dos TADs que pode interferir na expressão dos genes vizinhos à translocação. Nota-se uma fusão de dois TADs diferentes que possuem distintas interações promotor-*enhancer*.

Através da análise da translocação na plataforma *TADeUS2* foi possível identificar genes que podem estar com a expressão alterada em função de alterações conformacionais dos TADs. De acordo com o *score* de risco gerado na plataforma os principais são: *PTPRC*, *ATP6V1G3*, *NEK7*, *ASPM* e *F13B* presentes no cromossomo 1; *PHYH*, *FRMD4A*, *MCM10*, *BEND7*, *SEPHS1*, *PRPF18*, *UCMA*, *SNRPGP5*, *OPTN* e *DCLRE1C* presentes no cromossomo 10. Isso não descarta a possibilidade de outros genes estarem com a expressão afetada pela translocação e não terem sido identificados pelo programa

Dentre os genes citados, o *NEK7* é um exemplo de possível candidato. Salem et al. (2010) silenciaram o gene *NEK7* em ratos e observaram morte prematura, baixo peso ao nascimento e retardo severo do ganho de peso. A paciente descrita nesse caso apresenta uma desaceleração do ganho pondêro-estatural pós-natal, o que se assemelha em parte com os efeitos do silenciamento do gene *NEK7* em modelo animal. Contudo, essa é apenas uma pequena evidência de que a desregulação da expressão desse gene pode estar relacionada com a manifestação fenotípica da paciente.

Considerando que houve a interrupção de dois domínios TADs, com consequente quebra das barreiras que os delimitam, diversos genes podem estar com a expressão alterada. Portanto, o fato de não haver nenhum gene diretamente afetado não descarta a possibilidade de a translocação ser a causa e/ou contribuir para o quadro clínico.

Família 4

Descrição clínica

A família 4 se refere a duas gêmeas monozigóticas com fenótipo de Síndrome de Silver Russell que foram previamente descritas por Wawruk (2019). As gêmeas são filhas de pais não consanguíneos e foram encaminhadas para o serviço de Genética com quadro de déficit de crescimento, macrocrania, vagina imperfurada e episódios convulsivos.

As irmãs nasceram com 36 semanas e 4 dias de gestação por via cesariana. Eram pequenas para a idade gestacional: 38 cm (< 3º percentil) e 1700g (< 3º percentil) (paciente 1); 39 cm e 1670g (< 3º percentil) (paciente 2). Ambas tinham perímetro cefálico de 31,5 cm (entre 10º e 25º percentis)

Na avaliação clínica, apresentavam macrocrania (observada desde os 6 meses de idade), fronte proeminente, atopia, dismorfismos faciais menores, queda de cabelo, dificuldade de alimentação e déficit de crescimento. Elas também apresentaram dificuldade de aprendizagem e crises convulsivas caracterizadas por paralisia do olhar e cianose perioral seguidas de síncope.

O eletroencefalograma realizado aos dois anos de idade revelou que a paciente 1 apresentava atividade irritativa focal na região occipital esquerda, enquanto a paciente 2 apresentava atividade irritativa generalizada. Elas não apresentaram alterações nas atividades intracranianas ou processos expansivos nos resultados da tomografia computadorizada. Ambas manifestaram infecções recorrentes das vias aéreas superiores.

Nova avaliação clínica foi realizada quando as gêmeas tinham 11 anos de idade. A paciente 1 apresentou estatura de 132,5 cm (entre 5º e 10º percentis) e peso de 26,800g (entre 3º e 5º percentis). A paciente 2 apresentou de 128cm de estatura (< 3º percentil) e 23,500g (< 3º percentil). Ambos os perímetros cefálicos mediam 51,8 cm (entre 2º e 50º percentis).

As gêmeas foram diagnosticadas clinicamente com SRS após análise de seu fenótipo pelos critérios NH-CSS, que incluem: baixo peso e/ou comprimento ao nascer; restrição de crescimento pós-natal; macrocefalia relativa ao nascimento; fronte proeminente; assimetria corporal; dificuldades de alimentação e/ou baixo IMC (WAKELING et al., 2016).

Achados citogenéticos

Através do exame de cariótipo foi identificada uma translocação entre os cromossomos 3 e 12 [46,XX,t(3;12)(q29;q14)]. A análise do cariótipo dos pais não revelou alterações, sendo, portanto, uma alteração *de novo*. A análise de CMA não detectou perda ou ganho de material genético, indicando que a translocação é equilibrada.

Os pontos de quebra da translocação foram descritos previamente por Wawruk (2019) através da técnica de sequenciamento Mate-Pair, uma adaptação do sequenciamento *short-read* (Illumina) para sequencias maiores. Pontos de quebra identificados: região 3q26.31 (chr3:174,961,172-174,963,250), que interrompe o gene *NAALADL2*; região 12q14.3 (chr12:65,849,728-65,851,528) que interrompe o gene *HMGA2*.

A análise por OGM confirmou a presença da translocação [ogm[GRCh37]t(3;12)(q26.31;q14.3)] (Figura 30) levando a interrupção do gene *NAALADL2* em 3q26.31 (chr3:174,684,770-174,684,780) e do gene *HMGA2* em 12q14.3 (chr12:66,243,601-66,243,611) (Figura 31).

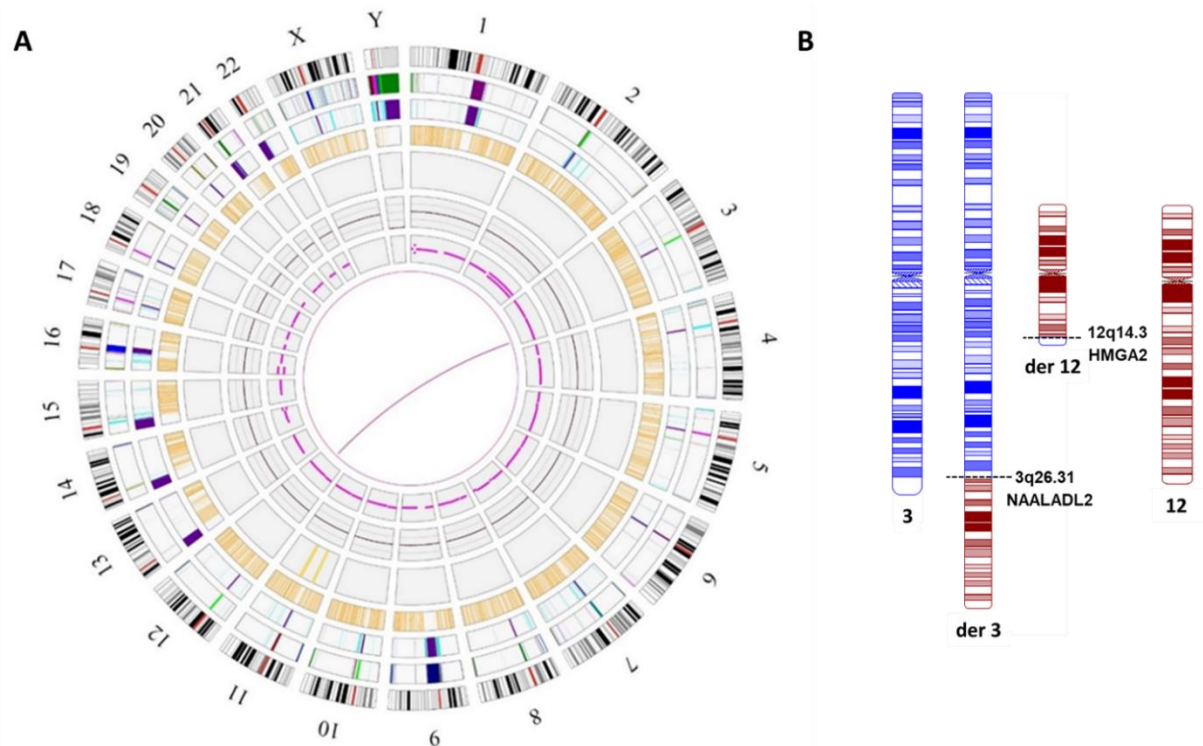


Figura 30. Translocação do caso 4. (A) *Circos plot*. A linha central que liga os cromossomos 3 e 12 indica a presença da translocação. (B) Representação esquemática da translocação $[t(3;12)(q26.31;q14.3)]$ com indicação dos pontos de quebra.

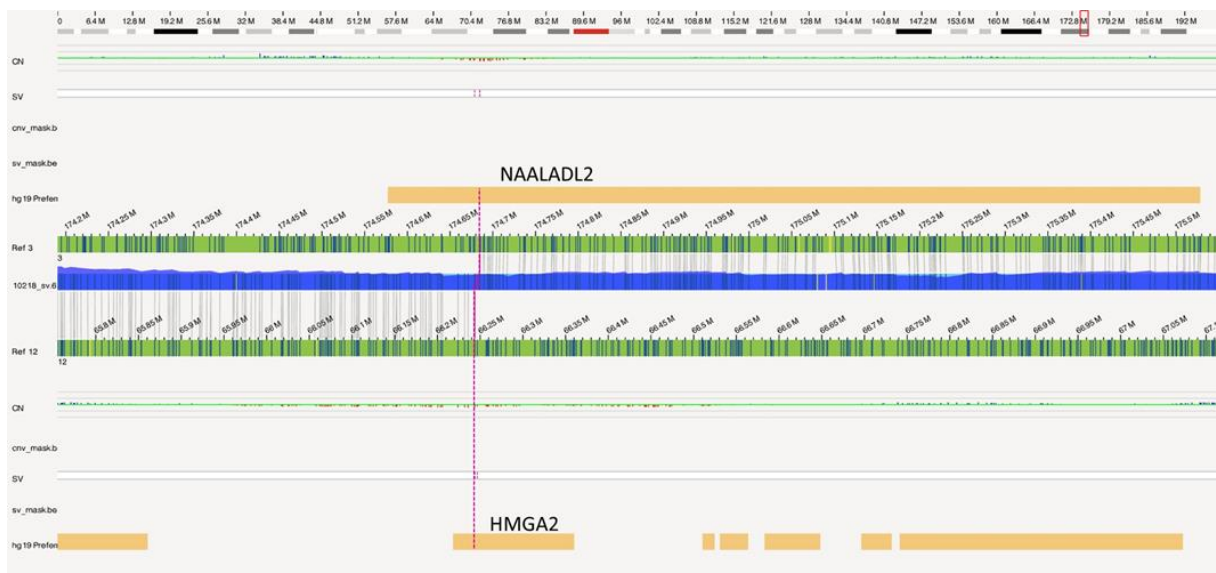


Figura 31. Pontos de quebra da translocação no caso 4. A barra azul central representa a amostra do paciente analisado. A barra verde superior representa o genoma de referência para o cromossomo 3 e a inferior a referência do cromossomo 12. Nota-se que parte da barra azul se alinha ao cromossomo 3 parte se alinha ao cromossomo 12. A linha rosa vertical tracejada indica os pontos de quebra.

Discussão

Foi identificada na família 4 uma translocação entre os cromossomos 3 e 12 em gêmeas com diagnóstico clínico de Síndrome de Silver Russell (SRS). A translocação leva a interrupção dos genes *NAALADL2* e *HMGA2*.

A síndrome de Silver-Russell (SRS) é um distúrbio de *imprinting* genômico raro, que se caracteriza por restrição do crescimento intrauterino e pós-natal com perímetro cefálico normal. A maioria dos casos diagnosticados de SRS tem ocorrência esporádica, no entanto um padrão de herança mendeliana e recorrência familiar já foram descritos na literatura (SPITERI; STAFRACE; CALLEJA-AGIUS, 2017).

A SRS tem duas etiologias principais bem conhecidas: a hipometilação paterna da *Imprinted Control Region 1* (ICR1) localizada 11p15.5, a causa de cerca de 50% dos casos; e a dissomia uniparental materna do cromossomo 7, responsável por cerca de 10% dos acometimentos (ISHIDA, 2016).

A SRS apresenta um espectro fenotípico que pode variar de leve a grave, o que dificulta o diagnóstico clínico. Nesse sentido, o sistema de pontuação clínica *Netchine-Harbison* (NH-CSS) é altamente aplicado para o diagnóstico clínico da síndrome. O sistema considera a presença de seis sinais clínicos: nascer pequeno para a idade gestacional, restrição de crescimento pós-natal, fronte proeminente, macrocefalia relativa ao nascimento, assimetrias corporais, dificuldade de alimentação ou baixo índice de massa corporal. A presença de quatro ou mais sinais sugere o diagnóstico clínico de SRS (SAAL et al., 2002).

A translocação das pacientes do caso 4 leva a interrupção de dois genes: *NAALADL2* e *HMGA2*. O gene *N-acetil-L-aspartil-L-glutamato peptidase-like 2* (*NAALADL2*) é um membro da família glutamato carboxipeptidase II (SIMPSON et al., 2020). A função do *NAALADL2* ainda precisa ser elucidada, mas alguns estudos sugerem seu papel na via do glutamato, no sistema nervoso (BORG et al., 2005). Até o momento não há evidências de que o *NAALADL2* desempenhe papel nos casos de SRS.

O gene *HMGA2* (*High-Mobility-Group Protein AT-hook 2*) é um fator de transcrição que pertence à família das proteínas nucleares não histonas que se ligam ao sulco menor do DNA, regiões ricas em AT. Dessa forma ele atua na modulação da expressão gênica influenciando diretamente no estado conformacional da cromatina (VIGNALI; MARRACCI, 2020).

Também é reconhecido que o *HMGA2* é altamente expresso e desempenha um papel importante durante o desenvolvimento embrionário regulando processos como crescimento e proliferação celular (LESZINSKI et al., 2018). Em tecidos adultos sua expressão não é normalmente detectada, exceto pela superexpressão descrita em vários tipos de câncer (PARISI et al., 2020).

Este gene apresenta 5 éxons, 4 íntrons e cobre uma região genômica em torno de 160 Kb. Aproximadamente 110 Kb correspondendo apenas ao íntron 3, que separa os motivos de ligação ao DNA (AT-hook) e a região C-terminal (SU; DENG; LENG, 2020). Rearranjos envolvendo a mesma região foram previamente relatados.

Panagopoulos et al. (2015b) relataram um caso de translocação que resultou na fusão *HMGA2-SETB1* levando ao fenótipo de lipoma e osteocondrolipoma. Outro caso também envolvendo fusão gênica por inversão foi descrito em um indivíduo com osteocondroma (PANAGOPOULOS et al., 2015a). Ligon et al. (2005) relataram um caso de fenótipo de supercrescimento somático extremo devido à inversão envolvendo o íntron 3.

A translocação identificada neste estudo envolve o rompimento do *HMGA2* no íntron 3 em gêmeas com SRS. Porém, apesar dos rearranjos descritos envolvendo a mesma região, o fenótipo apresentado pelas pacientes possivelmente está associado à haploinsuficiência do *HMGA2*, com perda da função do alelo interrompido.

Embora a dissomia uniparental do cromossomo 7 ou a hipometilação de ICR1 na região 11p15 sejam as principais alterações relacionadas com a SRS, diferentes mecanismos têm sido descritos em associação com a síndrome (HABIB et al., 2018).

Hübner et al. (2020) relataram três novas variantes patogênicas no *HMGA2* em pacientes diagnosticados clinicamente com SRS. Dessa forma, os autores sugerem que a investigação do *HMGA2* deve ser incluída no diagnóstico molecular e pode ser considerada como um gene causador da SRS.

Outro estudo realizado por Heldt et al. (2018), descreveu uma família (mãe e dois filhos) que tinham uma deleção em heterozigose de 1,67 Mb em 12q14.3 que incluía 6 genes, *HMGA2*, *LLPH*, *TMBIM4*, *IRAK3*, *HELB*, *GRIP1* e o pseudogene *RPSAP52*. Os autores concluíram que a haploinsuficiência de *HMGA2* levou a baixa estatura na família por eles estudada.

A perda de função de *HMGA2* foi associada à restrição de crescimento e resistência ao ganho de peso em camundongos, sugerindo um papel na adipogênese e resultando em um fenótipo pigmeu (HELDT et al., 2018). Por outro lado, sua

superexpressão levou a um supercrescimento, indicando que a desregulação da expressão do *HMGA2* durante o desenvolvimento embrionário impacta no tamanho corporal (VIGNALI; MARRACCI, 2020).

Essa desregulação ocorre porque o *HMGA2* atua como um regulador positivo do *IGF2*, um fator de crescimento fetal que foi identificado como um gene causador do fenótipo *SRS-like* (VADO et al., 2020). Conseqüentemente, a haploinsuficiência de *HMGA2* reduz a ativação da expressão de *IGF2* e têm sido associados a restrição de crescimento pré-natal e pós-natal, baixo peso e déficit de crescimento em humanos, achados comuns da SRS (MARI et al., 2009).

Segundo Saal, Harbison e Netchine (2002) o *HMGA2* deve ser considerado como um gene causador da SRS após os resultados usuais dos testes moleculares não explicarem o fenótipo do paciente.

De acordo com os casos relatados na literatura e considerando a função do gene *HMGA2* na regulação de um importante fator de crescimento, a interrupção desse gene é a provável causa da manifestação da SRS nas pacientes da família 4. Este estudo fornece, portanto, mais evidências do papel do *HMGA2* gene na etiologia da síndrome de Silver-Russell.

Família 5

Descrição clínica

Paciente do sexo masculino com 13 anos de idade e primeiro filho de pais não consanguíneos. Foi encaminhado para a Genética por apresentar disfonia com alteração laríngea das pregas vocais, hiperqueratose palmo-plantar e dificuldade leve de aprendizado.

Mãe do probando refere gestação saudável sem intercorrências e que o paciente apresentou desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) adequado para a idade. Paciente nasceu com hiperqueratose plantar e pé torto congênito corrigido cirurgicamente aos seis meses de vida. Apresentava choro fraco, semelhante ao miado de gato. Aos quatro anos de idade foi encaminhado ao otorrinolaringologista em função da alteração da voz e aos 7 anos iniciou acompanhamento na fonoaudiologia. Apesar do tratamento e do avanço da idade não houve melhora da disfonia.

Ao exame físico foi observado: fronte estreita, fendas palpebrais retas, sinófre, olhos profundamente situados com excesso de pele na pálpebra superior, raiz nasal e dorso nasal altos, filtro nasolabial curto, lábios grossos, palato alto e orelhas normoimplantadas. Aparelho cardiovascular sem sopro e abdome sem visceromegalias. Testículos tópicos e pênis com 8cm de comprimento. Apresenta pequenas calosidades na base plantar dos dedos das mãos e placas ceratóticas na planta dos pés.

Achados citogenéticos

Através do exame de cariótipo foi identificada uma translocação entre os cromossomos 5 e 8 [46,XY,t(5;8)(q35q22)]. Os pais do paciente também foram testados e não foram identificadas alterações em ambos, portanto, trata-se de uma alteração *de novo*. A análise por CMA não detectou ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos, indicando que a translocação é balanceada.

A partir da análise por OGM foi possível confirmar a presença da translocação [ogm[GRCh37]t(5;8)(q35.2;q22.2)] (Figura 32), que leva a interrupção do gene *VPS13B* no cromossomo 8 (chr8:100,074,252-100,074,262). Não há interrupção gênica no cromossomo 5 (chr5:172,913,152-172,913,162) (Figura 33).

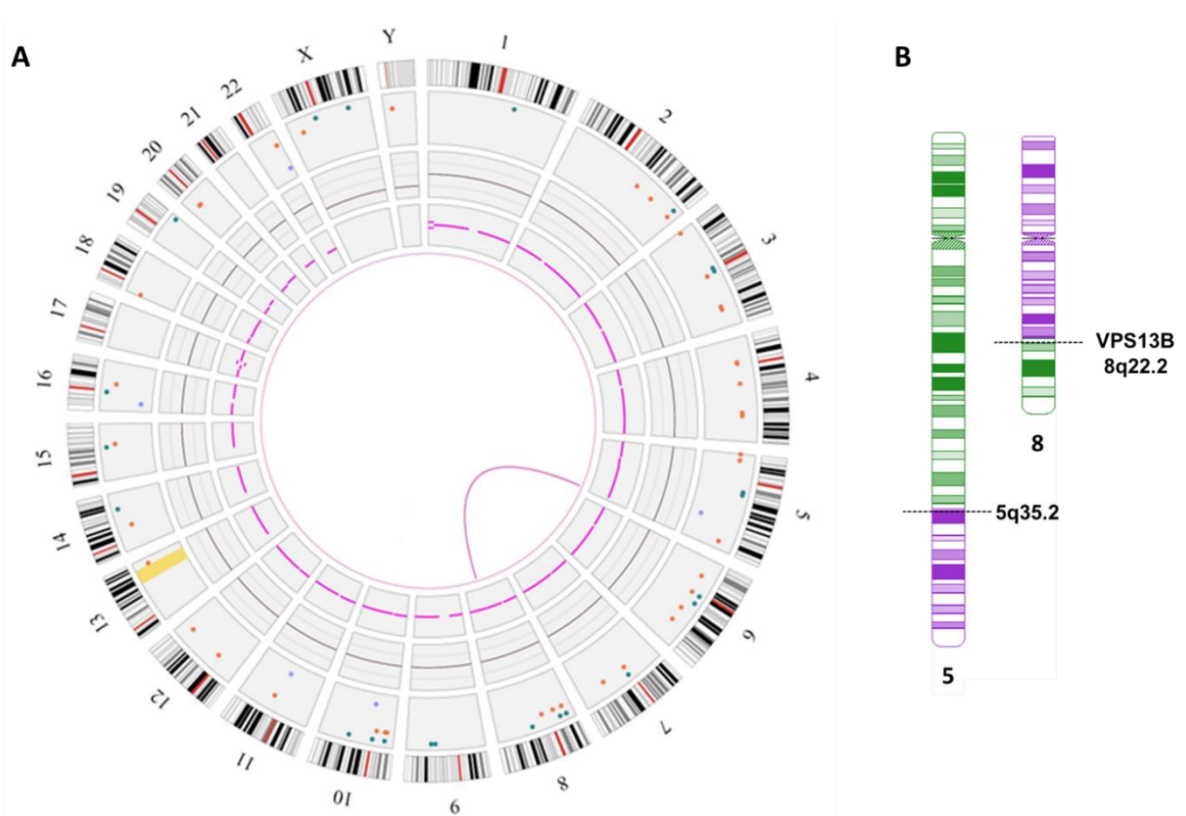


Figura 32. Translocação do caso 5. (A) *Circos plot*. A linha central que liga os cromossomos 5 e 8 indica a presença da translocação. (B) Representação esquemática da translocação [t(5;8)(q35.2;q22.2)] com indicação dos pontos de quebra.

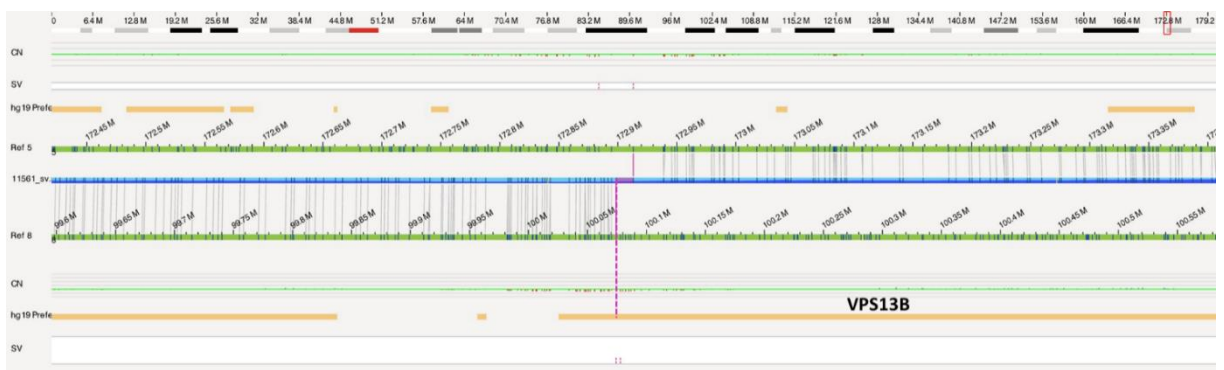


Figura 33. Pontos de quebra da translocação no caso 5. A barra azul central representa a amostra do paciente analisado. A barra verde superior representa o genoma de referência para o cromossomo 5 e a inferior a referência do cromossomo 8. Nota-se que parte da barra azul se alinha ao cromossomo 5 parte se alinha ao cromossomo 8. A linha rosa vertical tracejada indica os pontos de quebra.

Pela análise na plataforma *TADeus2* foi identificada a interrupção dos TADs (Figura 34) e os genes que podem estar com a expressão gênica afetada de acordo com o ranking de patogenicidade, são eles: *NKX2-5*, *BOD1*, *STC2*, *BNIP5* e *ERGIC1* no cromossomo 5; *VPS13B*, *OSR2*, *STK3*, *RPL19P14* e *POP1* no cromossomo 8 (Figura 35).

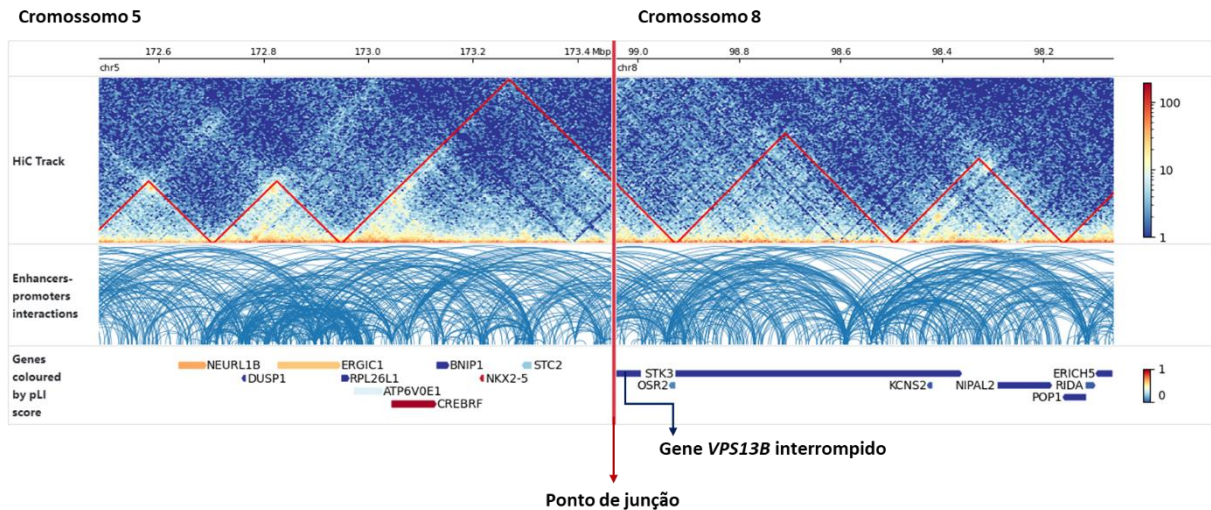


Figura 34. Análise *in silico* da translocação na plataforma *TADeus2* no caso 5. Na primeira faixa os triângulos vermelhos representam os TADs. A segunda faixa mostra a interação entre promotores e *enhancers*. A faixa inferior mostra os genes presentes nas regiões analisadas. A linha vermelha vertical indica o ponto de junção dos cromossomos 5 e 8 devido a translocação.

Ponto de quebra cromossomo 5									
Gene symbol	pLI	ClinGen	ClinGen score	Enhancer-promoter interactions number	Enhancer-promoter interactions score	Phenotype score	Distance from breakpoints	Distance from breakpoints score (distance below 1Mb)	Total pathogenicity score
NKX2-5	0.9453	3	1	7	1	1	250,838	1	4
BOD1	0.2485		0	15	1	0	120,996	1	2
STC2	0.2659		0	4	1	0	157,702	1	2
BNIP1	0.0000		0	1	1	0	321,762	1	2
ERGIC1	0.6475		0	0	0	1	533,466	1	2
Ponto de quebra cromossomo 8									
VPS13B	0.0000	30	1	59	1	1	48,768	1	4
OSR2	0.1305		0	3	1	0	109,930	1	2
STK3	0.0000		0	2	1	0	119,207	1	2
RPL19P14			0	1	1	0	279,406	1	2
POP1	0.0000		0	0	0	1	902,199	1	2

Figura 35. Score de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 5. Lista de genes que potencialmente estão com a expressão alterada nos cromossomos 5 e 8.

Discussão

O paciente da família 5 apresenta uma translocação t(5;8) com um quadro clínico de disfonia, hiperqueratose palmo-plantar e dificuldade de aprendizado. A translocação leva a interrupção do gene *VPS13B* no cromossomo 8.

Alterações em homozigose no gene *VPS13B* são reconhecidamente a causa da Síndrome Cohen (OMIM 216550) caracterizada por dismorfias faciais, microcefalia, retinopatia progressiva, deficiência intelectual e neutropenia intermitente (RODRIGUES et al., 2018).

O gene *VPS13B* possui 62 éxons e codifica uma proteína transmembrana anexa ao complexo de Golgi potencialmente envolvida no tráfego vesicular. O complexo de Golgi é onde ocorre a glicosilação de proteínas e lipídeos recém-

sintetizados (DUPLOMB et al., 2014). A glicosilação, adição enzimática de glicanos às proteínas, é uma modificação pós-traducional importante que regula a estabilidade e o dobramento de proteínas, além do seu transporte por via secretora (FRAPPAOLO et al., 2020).

Evidências sugerem que alterações na estrutura e distúrbios funcionais do complexo de Golgi estão envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças, como acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, hipertensão arterial pulmonar e câncer. No entanto ainda é necessário compreender como o aparelho de Golgi pode impactar na progressão dessas doenças (LIU et al., 2020).

O estudo conduzido por Duplomb et al. (2014) teve por objetivo avaliar a função do gene *VPS13B*, e como a deficiência dele poderia influenciar na fisiopatologia da Síndrome Cohen. Foi identificado que o estado de glicosilação das proteínas séricas apresentavam um padrão incomum em pacientes portadores da síndrome, indicando uma alteração importante na maturação dos glicanos. Além disso, também foram encontradas alterações endossomais e lisossomais, indicando que o gene *VPS13B* possui uma função crucial no tráfego endossomo-lisossomo.

Os autores concluem que o gene *VPS13B* desempenha um papel importante na função no complexo de Golgi, e que pacientes portadores da Síndrome Cohen com mutações nesse gene apresentaram importantes alterações no padrão de glicosilação de proteínas. Portanto, a deficiência da proteína *VPS13B* pode levar ao mau funcionamento da organela, podendo assim impactar em diversas funções celulares (DUPLOMB et al., 2014).

Entretanto, como já mencionado, a Síndrome Cohen apresenta padrão de herança autossômico recessivo e é caracterizada clinicamente por sinais e sintomas que não estão presentes no paciente descrito no caso 5, tendo em vista que ele apresenta interrupção de apenas um alelo.

Existem poucos trabalhos na literatura que exploram alterações em heterozigose no gene *VPS13B*. O estudo conduzido por Bacchelli et al. (2020) que tinha por objetivo avaliar CNVs e SNVs em uma coorte de 127 família com TEA identificou 24 CNVs raras que sobrepujam a genes candidatos para o TEA. Uma dessas CNVs identificadas levou a deleção parcial do gene *VPS13B* em heterozigose em um indivíduo que apresenta dificuldade na função adaptativa e trigonocefalia. Através da análise de expressão foi possível identificar uma redução significativa da

isoforma completa. Os autores então concluíram que a haploinsuficiência do gene *VPS13B* pode levar a manifestação de um fenótipo leve de TEA.

Outros genes podem estar com a expressão alterada, em decorrência do rearranjo, e contribuir para a manifestação clínica. Dentre os genes ranqueados através da análise na plataforma *TADeus2*, o *BOD1* (*Biorientation Defective 1*) é um gene candidato que pode contribuir para a dificuldade de aprendizado observada no paciente da família 5.

O gene *BOD1* codifica uma proteína do cinetocoro que atua como um importante regulador da molécula de sinalização PP2A durante a divisão celular. Essa molécula é uma proteína fosfatase que controla a fosforilação de diversas proteínas do cinetócoro influenciando no estabelecimento de conexões cromossômicas para a separação precisa das cromátides-irmãs na mitose. Além disso, possui função específica no sistema nervoso central, porém ainda não muito bem compreendida (SCHLEICHER et al., 2017).

Esmaeeli-Nieh et al. (2016) relataram um caso familiar de DI com deleção do gene *BOD1* em homozigose. Através da análise de expressão e testes funcionais para avaliar o gene ortólogo em *Drosophila*, os autores concluíram que o gene *BOD1* é essencial para a função cognitiva, sendo, portanto, a causa do quadro clínico de DI na família descrita.

O paciente descrito neste caso possui uma dificuldade de aprendizado que pode estar relacionada a interrupção do gene *VPS13B* e à alteração da expressão do gene *BOD1*. Não foi possível correlacionar a hiperkeratose e a disфонia com alguma alteração em específico, o que não descarta a possibilidade de que os múltiplos genes próximos ao rearranjo possam contribuir para essas manifestações clínicas.

Família 6

Descrição

Paciente do sexo masculino com 10 anos de idade e filho de pais não consanguíneos. Foi encaminhado para o serviço de Genética por déficit de aprendizagem e alterações comportamentais. Apresenta dificuldade de socialização, agressividade e não aceita regras. Foi alfabetizado e sabe fazer operações matemáticas.

O probando tem uma irmã mais nova com dificuldade de fala, e que aos 8 anos de idade ainda não havia sido alfabetizada. A mãe, na ocasião da consulta, estava em acompanhamento psiquiátrico por transtorno depressivo e de ansiedade. Ela referiu que sempre foi ansiosa e que na infância apresentava distúrbio do comportamento, semelhante ao do probando. Além disso, segundo o relato da mãe outros membros da família têm diagnóstico de TEA, esquizofrenia e comportamento agressivo/agitado.

Ao exame físico foi identificado: fendas palpebrais retas, cílios longos, resquílios de epicanto bilateral, raiz nasal média, palato sem anormalidades, orelhas normo-implantadas. Mamilos pequenos, aparelho cardiovascular sem anormalidades, abdome sem visceromegalias, testículos tópicos, mãos com hiperextensibilidade das articulações.

Achados citogenéticos

A análise do cariótipo revelou uma inversão pericêntrica no cromossomo 3 [46,XY,inv(3)(p14p25)]. Os pais foram testados e foi identificado que a mãe apresenta a mesma alteração, sendo, portanto, uma variante herdada.

A análise por CMA não identificou ganhos ou perdas de segmentos cromossômicos, indicando um rearranjo equilibrado. Através da análise por OGM foi confirmada a presença da inversão paracêntrica no cromossomo 3 [ogm[GRCh37] inv(3;3)(p26.1;p14.1)] (Figura 36) que leva a interrupção dos genes *LMCD1* (chr3:8,523,529-8,523,539) e *TAF4* (chr3:68,959,677-68,959,687) (Figura 37)

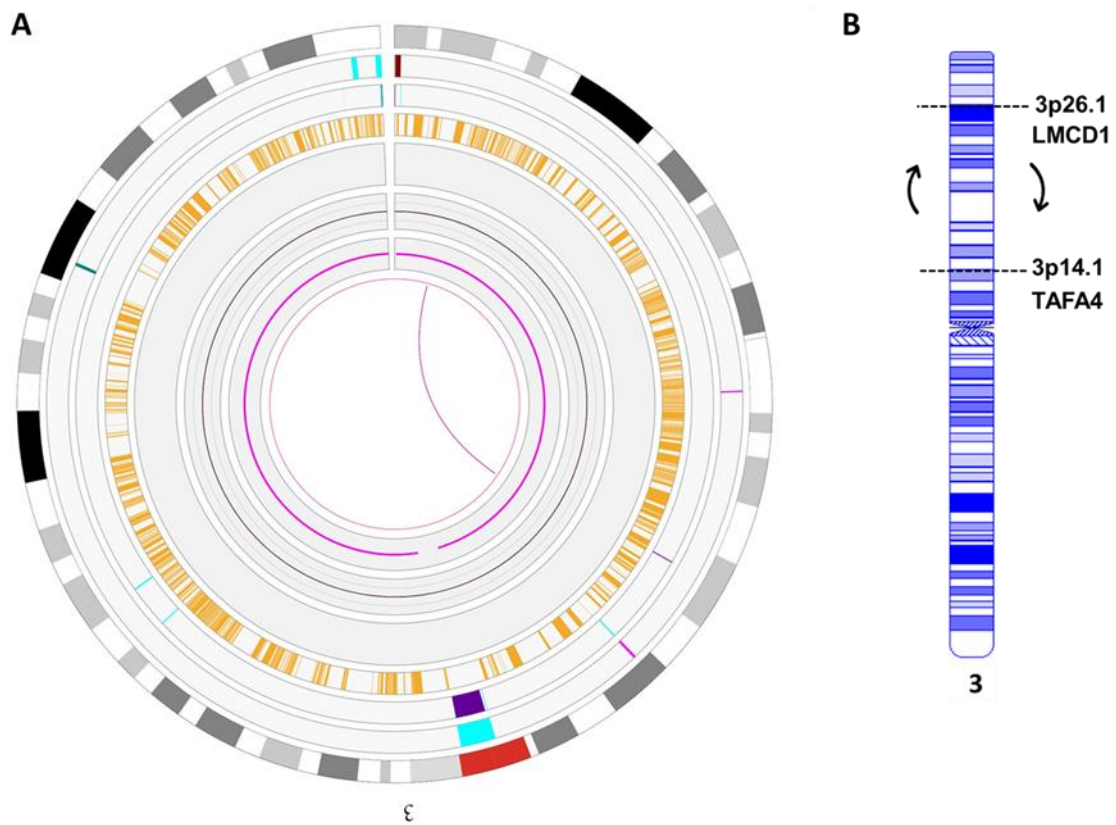


Figura 36. Inversão do caso 6. (A) *Circos plot* mostrando somente o cromossomo 3. A linha rosa no centro do gráfico representa a inversão no braço curto do cromossomo 3. (B) Representação esquemática da inversão [inv(3;3)(p26.1;p14.1)] com indicação dos pontos de quebra.



Figura 37. Pontos de quebra da translocação no caso 6. A barra azul central representa a amostra do paciente analisado. As barras verdes, superior e inferior, representam o genoma de referência para o cromossomo 3. Nota-se que parte da barra azul se alinha a diferentes segmentos do cromossomo 3. As linhas tracejadas na cor rosa (vertical) indicam os pontos de quebra.

Pela análise na plataforma *TADeus2* foi identificada a interrupção dos TADs (Figura 38) e os genes que podem estar com a expressão gênica afetada de acordo com o ranking de patogenicidade, são eles: *CAV3*, *SETD5*, *OXTR*, *RAD18*, *GRM7*, *CIDEC*, *FANCD2*, *VHL* e *SLC6A1* no ponto de quebra 1; *LMOD3*, *MITF*, *FRMD4B*, *UBA3*, *ARL6IP5*, *EOGT* e *FOXP1* no ponto de quebra 2 (Figura 39).

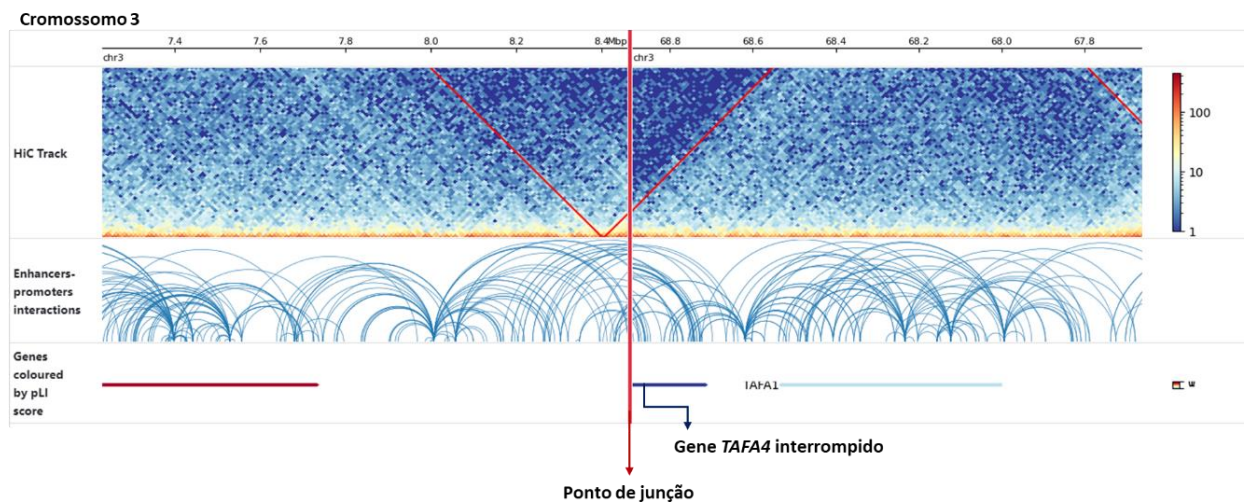


Figura 38. Análise *in silico* da inversão na plataforma *TADeus2* no caso 6. Na primeira faixa os triângulos vermelhos representam os TADs. A segunda faixa mostra a interação entre promotores e *enhancers*. A faixa inferior mostra os genes presentes nas regiões analisadas. A linha vermelha vertical indica o ponto de junção devido a inversão.

Ponto de quebra 1									
Gene symbol	pLI	ClinGen	ClinGen score	Enhancer-promoter interactions number	Enhancer-promoter interactions score	Phenotype score	Distance from breakpoints	Distance from breakpoints score (distance below 1Mb)	Total pathogenicity score
CAV3	0.0055		0	3	1	1	251,949	1	3
SETD5	1.0000	3	1	0	0	1	915,762	1	3
OXTR	0.0007		0	7	1	0	268,528	1	2
RAD18	0.0000		0	2	1	0	293,549	1	2
LMCD1	0.0012		0	1	1	0	19,954	1	2
GRM7	0.9990		0	0	0	1	740,320	1	2
CIDEC	0.0090	30	1	0	0	1	1,384,858	0	2
FANCD2	0.0000	30	1	0	0	1	1,544,517	0	2
VHL	0.0795	3	1	0	0	1	1,659,925	0	2
SLC6A1	0.9999	3	1	0	0	1	2,510,333	0	2
Ponto de quebra 2									
LMOD3	0.0000		0	22	1	1	195,529	1	3
MITF	0.9812	3	1	0	0	1	828,928	1	3
FRMD4B	0.4539		0	7	1	0	258,246	1	2
UBA3	0.5041		0	3	1	0	144,194	1	2
ARL6IP5	0.1038		0	1	1	0	174,401	1	2
EOGT	0.0000		0	0	0	1	64,681	1	2
FOXP1	1.0000	3	1	0	0	1	2,044,172	0	2

Figura 39. Score de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 6. Lista de genes que potencialmente estão com a expressão alterada nos pontos de quebra do cromossomo 3.

Discussão

O paciente da família 6 apresenta déficit de aprendizagem e alterações comportamentais, como dificuldade de socialização e agressividade. A mãe do probando apresentava quadro clínico semelhante na infância, acrescido de transtorno ansioso-depressivo na idade adulta. Foi identificado em ambos uma inversão paracêntrica no braço curto do cromossomo 3, que leva a interrupção dos genes *LMCD1* e *TAF4*.

O gene *LMCD1* foi descrito por Bernalova e Burmeister (2000) como um novo membro da família de proteínas de domínio LIM com dois domínios ricos em cisteína. As proteínas dessa família estão implicadas em diversas funções e são reconhecidas como componentes-chave da regulação da maquinaria celular tendo importante função no crescimento e diferenciação celular, além da remodelação do citoesqueleto (BIAN et al., 2010).

Estudos indicam que o gene *LMCD1* atua na regulação da hipertrofia do músculo esquelético (FERREIRA et al., 2019) e do músculo cardíaco (BIAN et al., 2010). Contudo, até o momento não existem evidências de função do gene *LMCD1* no sistema nervoso central, nem de associação com alterações comportamentais ou desordens neuropsiquiátricas. Portanto, a princípio a interrupção do *LMCD1* não tem correlação com o quadro clínico do paciente apresentado na paciente da família 6.

O gene *TAF4* pertence à família de proteínas semelhantes a quimiocinas TFA composta por cinco genes homólogos (*TFA1-5*), que são predominantemente expressos no sistema nervoso central. As quimiocinas são pequenas proteínas secretadas que tem função na regulação da resposta imune atuando em processos como quimiotaxia e degranulação de leucócitos, ativação de integrinas e angiogênese (TOM TANG et al., 2004).

A proteína TFA4 se liga ao receptor transmembrana FPR1 ativando diferentes vias de sinalização celular que tem função na excitabilidade neuronal, alívio da dor, migração de macrófagos e ação anti-inflamatória. Além disso, a TFA4 se liga à neuroxina de superfície celular e medeia a homeostase das sinapses (ZHU et al., 2022).

O receptor FPR1 atua diretamente na regulação de processos inflamatórios, podendo atuar tanto na via inflamatória como na via anti-inflamatória dependendo do ligante com qual ele está interagindo. Portanto, os FRPs são considerados importantes biomarcadores de doenças neurológicas devido a regulação da ativação das células da glia, diferenciação neuronal, angiogênese e a permeabilidade da barreira hematoencefálica influenciando na progressão de doenças neurológicas (ZHU et al., 2021).

Desse modo, a ligação TFA4-FRP1 parece mediar diversos processos fisiológicos como aprendizagem, memória, comportamento, alívio da dor, atividade locomotora e homeostase das sinapses. Além disso, outros genes da família TFA já foram ligados a desordens neurológicas: *TFA1*, regulação da alimentação e

comportamento; *TAF2*, possivelmente envolvido com quadro de deficiência intelectual; *TAF5*, associado à progressão do comprometimento cognitivo em indivíduos com demência vascular e pode ser um regulador importante na depressão (ZHU et al., 2022).

A quebra do gene *TAF4*, em decorrência da inversão paracêntrica presente no cromossomo 3, leva a perda da função do alelo afetado. Portanto, de acordo com os dados apresentados, a haploinsuficiência do gene *TAF4* pode interferir na regulação da resposta inflamatória no sistema nervoso central contribuindo assim para a dificuldade de aprendizado e alterações comportamentais observadas no paciente analisado no caso 6.

Além da interrupção do *TAF4*, outros genes próximos à região do rearranjo podem contribuir para as manifestações fenotípicas observadas devido a possíveis alterações no padrão de expressão.

O gene *CAV3* codifica uma proteína que funciona como canal de cálcio ativado por baixa voltagem tipo T. Os canais Cav3 estão envolvidos em diversas funções fisiológicas, especialmente no sistema nervoso central, como regulação da excitabilidade neuronal, processamento sensorial e liberação de neurotransmissores. Variantes nesse gene já foram associadas a ataxia cerebelar, esquizofrenia, autismo e epilepsia (LORY; NICOLE; MONTEIL, 2020).

O gene *SETD5* atua como um regulador da cromatina e variantes em heterozigose, que levam a perda de função, têm sido relatadas como uma das causas mais frequentes de DI e TEA. Estudos em modelo animal sugerem que a haploinsuficiência do gene *Setd5* prejudica a expressão de genes que atuam no neurodesenvolvimento podendo levar a um fenótipo semelhante ao TEA, que inclui déficit cognitivo, dificuldade de interação social e no comportamento adaptativo (GABELLINI et al., 2022).

Assim como os genes *CAV3* e *SETD5*, alterações nos genes *GRM7* e *FOXP1* também já foram associadas a desordens do neurodesenvolvimento. O *GRM7* codifica um receptor inibitório acoplado à proteína G que atua na modulação de neurotransmissores e na plasticidade sináptica (SONG et al., 2021). Variantes nesse gene já foram associadas a DI, atraso global do desenvolvimento, epilepsia e microcefalia (FISHER et al., 2021).

O gene *FOXP1* é um fator de transcrição e sua haploinsuficiência gera um quadro sindrômico com sinais clínicos como DI, déficit de linguagem, TEA, hipotonia

e anomalias congênitas, incluindo características dismórficas leves e anormalidades cerebrais (LOZANO et al., 2021).

Ademais, o gene *OXTR* codifica o receptor de ocitocina, neuro-hormônio que desempenha importante função no comportamento social. O sistema ocitocinérgico responde diretamente a estímulos ambientais e sobretudo interações interpessoais. Perturbações no equilíbrio desse sistema, seja por alterações genéticas ou epigenéticas, têm sido associadas a transtornos neurológicos e prejuízos sociais, como o TEA (TOPS; HABEL; RADKE, 2019).

Em suma, todos os genes supracitados possuem função no sistema nervoso central e já foram previamente associados a transtornos do neurodesenvolvimento. Portanto, a interrupção do gene *TAF4* e a possível desregulação de diversos genes próximos a região do rearranjo poderiam explicar as alterações fenotípicas observadas nos pacientes da família 6.

Família 7

Descrição clínica

Paciente do sexo masculino com 11 anos de idade, filho de pais não consanguíneos. Foi encaminhado ao serviço de genética por quadro de ansiedade, disartria, dificuldade de fluência e diurese noturna. Pai e irmãos apresentam histórico de dificuldade de aprendizado, o que levou a investigação de uma possível causa genética em toda família (Figura 40).

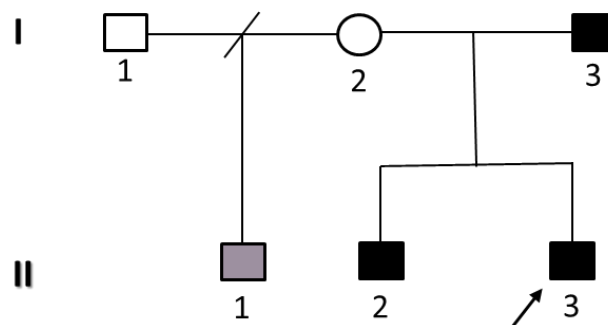


Figura 40. Heredograma representativo da família investigada no caso 7. A seta indica o probando. Os retângulos pretos representam os indivíduos que são portadores da inversão. O retângulo cinza representa um indivíduo afetado que não é portador da inversão.

Ao exame físico do probando (II-3) foi identificado: frente ampla com implantação alta dos cabelos. Fendas palpebrais retas, raiz nasal média, palato sem anormalidades e orelhas normo-implantadas. Aparelho cardiovascular sem sopro, abdome sem visceromegalias, testículos tópicos e membros sem anormalidades.

II-1 tem 18 anos e é filho do primeiro casamento, também não consanguíneo. Apresenta quadro de distúrbio de ansiedade e transtorno do aprendizado da leitura e escrita. Tem diagnóstico de ceratocone e está a espera pelo transplante de córnea. Tinha dificuldades de interação social e aos 8 anos de idade teve episódio depressivo.

Ao exame físico de II-1 foi identificado: fendas palpebrais retas, hipoplasia de face média, prognatismo e palato sem anormalidades. Pectus excavatum discreto, Aparelho cardiovascular sem sopro, abdome sem visceromegalias e membros sem anormalidades.

O indivíduo II-2 tem 14 anos e é filho da segunda união da mãe, assim como o probando. Possui importante dificuldade de aprendizado sendo alfabetizado somente

aos 9 anos de idade, além de atraso no desenvolvimento da fala. Tem diagnóstico de hipotireoidismo subclínico.

Ao exame físico de II-3 foi observado: fendas palpebrais retas, raiz nasal média com dorso alto e ponta bulbosa, palato alto e orelhas normo-implantadas. Aparelho cardiovascular sem sopro e abdome sem visceromegalias. Dolicoestenomelia discreta sem outras alterações de membros.

O indivíduo I-2 refere ter hiperplasia adrenal congênita, diagnosticada na infância, e hipertensão arterial sistêmica e relata não ter tido dificuldade de aprendizado. I-3 refere dificuldades de aprendizado, contudo terminou o ensino médio e atualmente trabalha com manutenção de equipamentos de solda.

Achados citogenéticos

A avaliação do cariótipo de todos os membros da família revelou que o probando, I-3 e II-3 possuem uma inversão pericêntrica do cromossomo 7 [46,XY,inv(7)(p13q32)]. Os indivíduos I-2 e II-1 apresentaram cariótipo sem alterações. Portanto, o probando e II-3 herdaram a inversão de I-3 (pai).

A análise por CMA não detectou ganho ou perda de segmentos cromossômicos, indicando que o rearranjo é equilibrado.

Pela análise do mapeamento óptico genômico paterno foi confirmada a presença da inversão pericêntrica no cromossomo 7 [inv(7;7)(p12.1;q31.32)] (Figura 41) levando a quebra do gene *PTPRZ1* [chr7:121,623,191-121,623,201]. O segundo ponto de quebra ocorreu em uma região intergênica [chr7:52,441,462-52,441,472] (Figura 42).

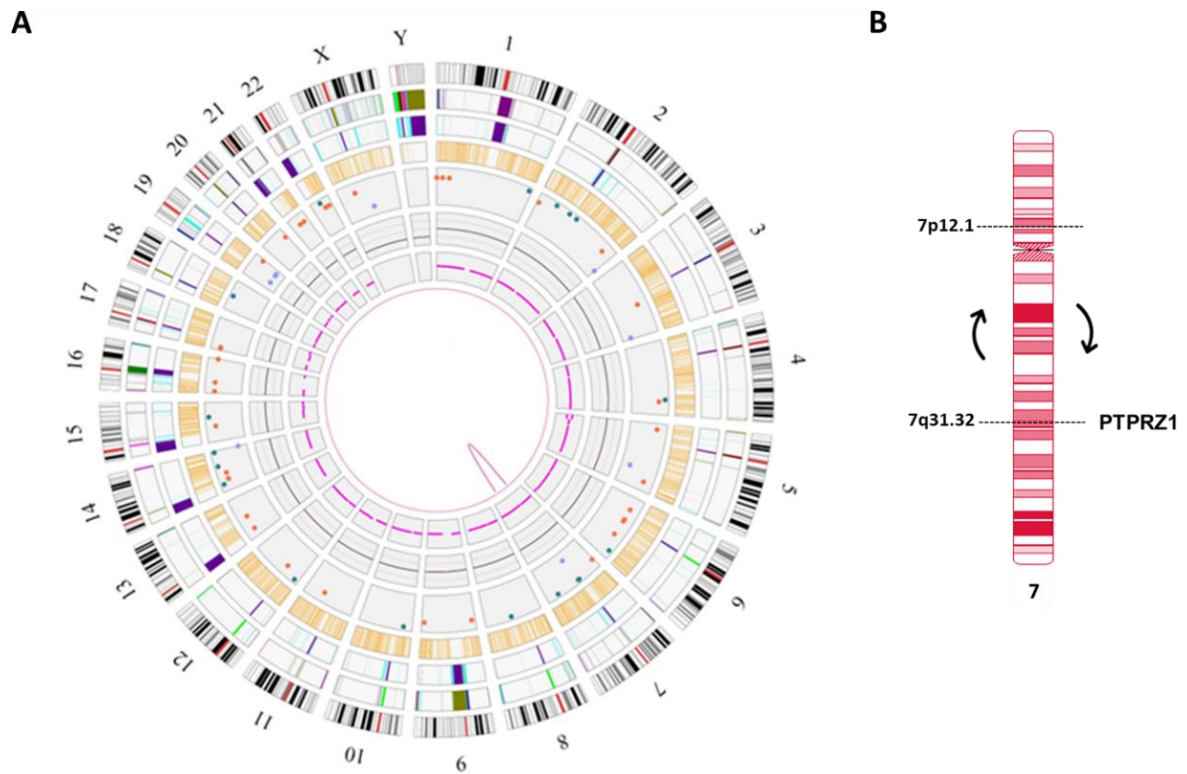


Figura 41. Inversão do caso 7. (A) *Circos plot*. A linha central indica a inversão no cromossomo 7. (B) Representação esquemática da inversão $inv(7;7)(p12.1;q31.32)$ com indicação dos pontos de quebra.

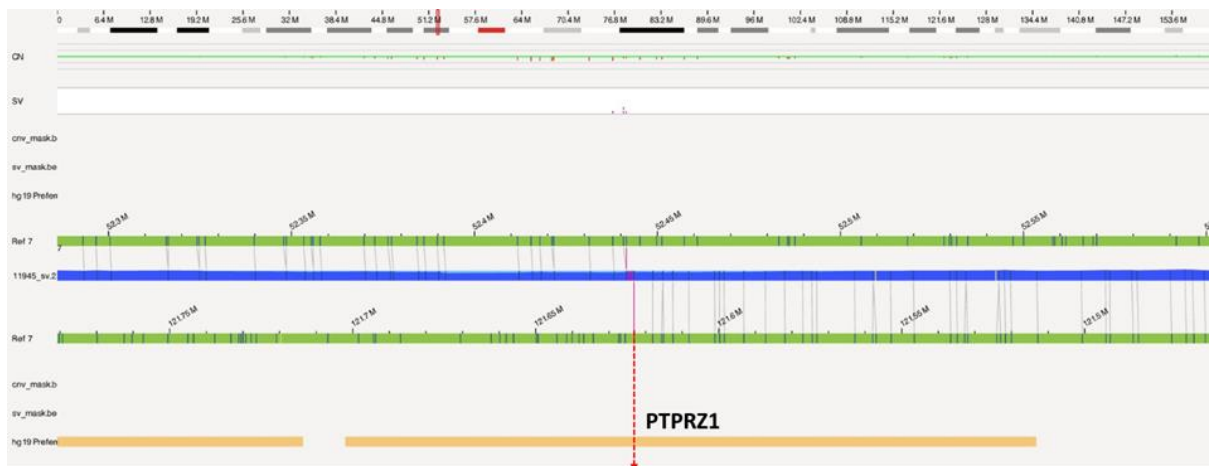


Figura 42. Pontos de quebra da translocação no caso 7. A barra azul central representa a amostra do paciente analisado. As barras verdes, superior e inferior, representam o genoma de referência para o cromossomo 7. Nota-se que parte da barra azul se alinha a diferentes segmentos do cromossomo 7. A linha vermelha tracejada (vertical) indica o ponto de quebra.

A análise dos TADs revelou que os genes *AASS*, *FEZF1*, *PTPRZ1* e *CADPS2* podem estar com a expressão alterada no primeiro ponto de quebra, de acordo com o *score* de patogenicidade da plataforma *TADeus2* (Figuras 43 e 44). No segundo ponto de quebra não há genes com *score* de patogenicidade significativo.

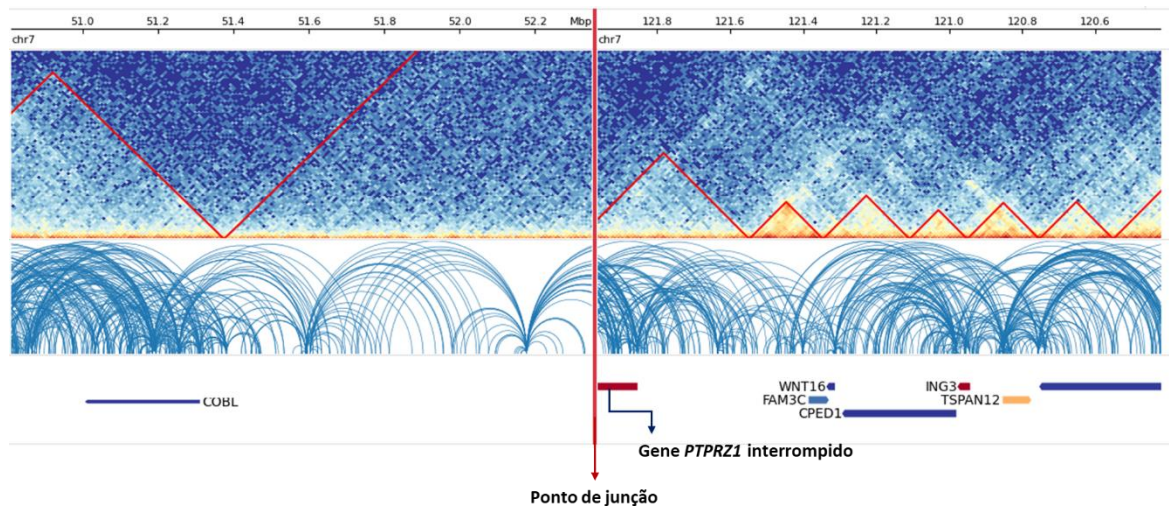


Figura 43. Análise *in silico* da inversão na plataforma *TADeus2* no caso 7. Na primeira faixa os triângulos vermelhos representam os TADs. A segunda faixa mostra a interação entre promotores e *enhancers*. A faixa inferior mostra os genes presentes nas regiões analisadas. A linha vermelha vertical indica o ponto de junção devido a inversão.

Ponto de quebra 1 – cromossomo 7

Gene symbol	pLI	ClinGen	ClinGen score	Enhancer-promoter interactions number	Enhancer-promoter interactions score	Phenotype score	Distance from breakpoints	breakpoints score (distance below 1Mb)	Total pathogenicity score
AASS	0.0000	30	1	41	1	1	81,436	1	4
FEZF1	0.9504		0	26	1	1	318,156	1	3
PTPRZ1	0.9900		0	46	1	0	78,889	1	2
CADPS2	0.3679	0	0	3	1	0	335,264	1	2

Figura 44. *Score* de patogenicidade dos genes próximos ao rearranjo no caso 7. Lista de genes que potencialmente estão com a expressão alterada nos pontos de quebra do cromossomo 7.

Discussão

O caso 7 se refere a uma família com inversão pericêntrica do cromossomo 7 com decorrente interrupção do gene *PTPRZ1* (identificada no pai pelo OGM), levando a sua haploinsuficiência. Os indivíduos afetados compartilham alguns sinais clínicos como dificuldade de aprendizado e alterações na fala.

O gene *PTPRZ1* codifica um receptor transmembrana com função tirosina fosfatase em sua porção citoplasmática. Esse gene é altamente expresso durante o desenvolvimento embrionário, enquanto na vida adulta apresenta expressão restrita ao sistema nervoso central, mais especificamente nas células da glia, astrócitos, oligodendrócitos e suas células precursoras (OPCs) (PAPADIMITRIOU; KANELLOPOULOU, 2023).

O *PTPRZ1* medeia processos adesão e sinalização celular durante o desenvolvimento (BOUYAIN; WATKINS, 2010) e está associado a maturação de OPCs em oligodendrócitos, células que atuam na mielinização dos axônios oferecendo suporte para a função neuronal. O que é crucial para a propagação do impulso nervoso e a integridade do sistema nervoso ao longo da vida (LAMPRIANOU et al., 2011).

Alguns trabalhos evidenciam que alterações nesse receptor podem estar associadas a doenças do sistema nervoso central, contudo os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão claros (NAGAI; FUJII; KITAZUME, 2022). Além disso, as proteínas da família PTPRZ se ligam com elevada afinidade e especificidade às conectinas, família de moléculas de adesão celular que já foram associadas a diversas condições neuropsiquiátricas, incluindo o transtorno do espectro autista (CRESSANT et al., 2017).

O gene *PTPRZ1* possui três diferentes isoformas que foram avaliadas por três grupos independentes. Todos os grupos realizaram o silenciamento do *PTPRZ1* em modelos animais, seja de uma linhagem específica ou de todas as linhagens. Em termos gerais os camundongos testados não apresentaram anormalidades morfológicas e eram aparentemente saudáveis. Contudo, diversas alterações funcionais foram identificadas como diferenciação precoce de oligodendrócitos e uma fragilidade na mielina do SNC. Além disso, camundongos que tiveram o gene *PTPRZ1* silenciados apresentaram anormalidades comportamentais e de aprendizado, alterações neurológicas e déficit no aprendizado espacial e contextual (TANGA et al., 2019).

A partir dessas análises prévias, Tanga et al. (2019) realizaram um estudo comportamental em duas linhagens diferentes de camundongos com o objetivo de investigar se as isoformas do *PTPRZ1* desempenham funções fisiológicas distintas. A partir dos resultados obtidos os autores sugerem que a região extracelular do receptor Ptpz1 é fundamental para a resposta comportamental à novidade e à formação de memórias aversivas.

Além da interrupção do gene *PTPRZ1*, a expressão dos genes *FEZF1* e *CADPS2* podem estar alteradas devido a inversão. O gene *FEZF1* atua na padronização do diencéfalo, sendo um regulador da neurogênese em humanos (LIU et al., 2018). Segundo Chapman et al. (2015) o gene *FEZF1* é um potencial candidato para o desenvolvimento de TEA de acordo com evidências funcionais e estatísticas, e pela região em que o gene está inserido (AUST1), primeira região relacionada ao TEA em estudos de associação.

O gene *CADPS2* codifica uma proteína ativadora de secreção dependente de cálcio, que regula a liberação de vesículas em neurônios. A proteína *CADPS2* atua em conjunto com o BDNF na regulação da diferenciação celular no desenvolvimento do cerebelo (PAVONE et al., 2019). Alterações nesse gene já foram relatadas em indivíduos com DI e TEA (BONORA et al., 2014).

A presença de CNVs na região 7q31.32 em indivíduos com DI, TEA e TDAH (Pavone et al., 2019) indicam que os genes presentes nessa região podem de fato contribuir no desenvolvimento de doenças neurológicas e psiquiátricas. O que corrobora com as manifestações fenotípicas apresentadas pelos três familiares: dificuldade de aprendizado, atraso no desenvolvimento da fala, dificuldade de fluência e ansiedade.

Portanto, é plausível concluir que a haploinsuficiência do gene *PTPRZ1* e a possível alteração da expressão dos genes *FEZF1* e *CADPS2* podem ser a causa das manifestações fenotípicas observadas nos pacientes do caso 7.

Família 8

Descrição clínica

Paciente do sexo masculino com 14 anos de idade e filho único de pais não consanguíneos. Possui diagnóstico clínico de deficiência intelectual e apresenta discretas dismorfias faciais.

Inicialmente foi encaminhado para atendimento no serviço de genética por atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, andou com um ano e meio e falou somente aos quatro anos. Teve episódios de crises convulsivas na vigência de febre entre o primeiro e o quarto ano de vida. Apresenta traço comportamental retraído, fala pouco e desvia o olhar.

Ao exame físico foi identificada sinofre discreta, sobrancelhas retas, fendas palpebrais retas e estreitas, excesso de pele suprapalpebral, prega infraorbitária, raiz nasal média, ponta nasal quadrada, filtro pouco marcado, lábio superior fino e palato alto não ogival. Possui orelhas normoimplantadas com desdobramento da hélice vertical e queixo quadrado. Apresenta prega palmar única bilateralmente, dedos afilados, pectus excavatum, lipomastia, e pés com dedos compridos e afilados.

A mãe do probando relata gestação de alto risco em função da idade, 41 anos ao nascimento do filho, além de hipertensão e diabetes gestacional. Ao exame físico a mãe apresenta: fendas palpebrais retas, excesso de pele suprapalpebral, prega infraorbitária, raiz nasal média, dorso curvo, ponta nasal quadrada, queixo quadrado, desdobramento vertical da hélice, orelhas com baixa implantação, ausência de pectus excavatum e pés com dedos compridos e afilados.

Achados citogenéticos

Pela análise de cariótipo foi identificada uma inversão paracêntrica no braço curto do cromossomo 2 [46,XY,inv(2)(p13p25.1)] no probando. Em seguida os pais foram testados, revelando que a mãe é portadora da mesma alteração [46,XX,inv(2)(p13p25.1)]. O cariótipo paterno não apresentou alterações. Portanto, trata-se de uma inversão herdada de origem materna.

A análise por CMA detectou uma duplicação de 690 Kb em 2p22.3 [(chr2:32,635,270-33,325,378)x3] (Figura 45), levando a interrupção dos genes

BIRC6 e *LTBP1*. Entretanto, através da análise por OGM foi possível identificar um rearranjo complexo no braço curto do cromossomo 2.

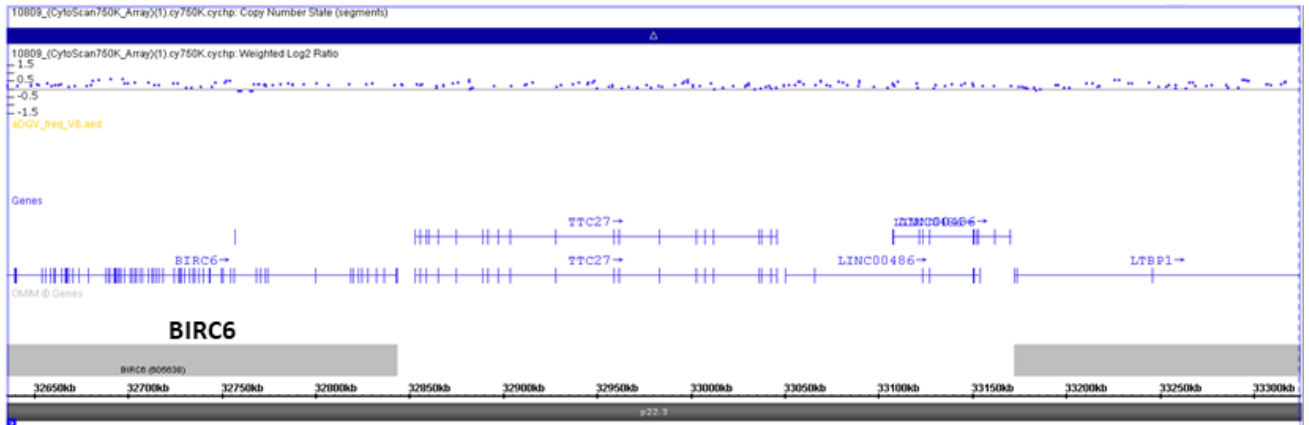


Figura 45. Duplicação de 690 Kb em 2p22.3 no caso 8. O retângulo azul indica o segmento cromossômico duplicado. A duplicação leva a interrupção dos genes *BIRC6* e *LTBP1*.

Pelo OGM foi confirmada a presença da inversão [ogm[GRCh37] inv(2;2)(p24.1;p15)] (Figura 46). Além disso, foram identificados dentro do segmento invertido uma duplicação em ordem direta de 655Kb (chr2:32,624,557-33,280,372). O paciente ainda apresenta uma deleção de 761Kb (chr2:87,295,858-88,057,222) próxima a região pericentromérica (Figuras 47 e 48).

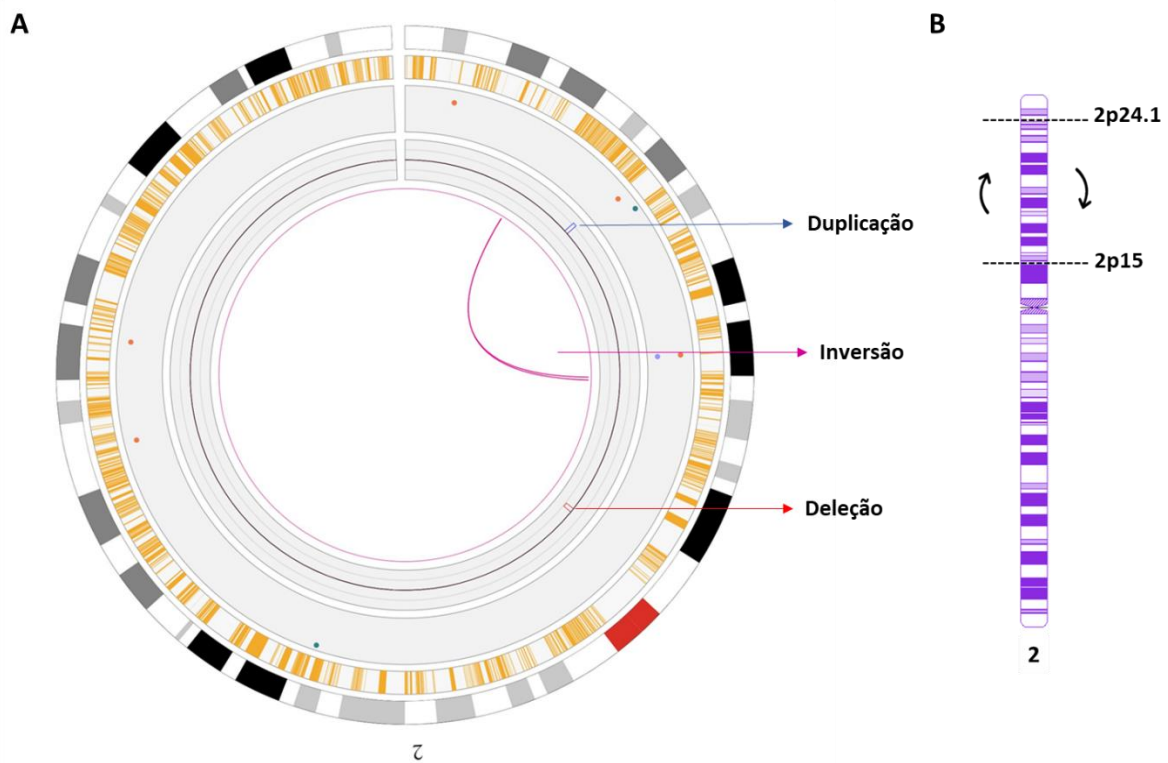


Figura 46. Inversão do caso 8. (A) *Circos plot* conjunto do probando e de sua progenitora mostrando somente do cromossomo 2. Nota-se que há dois traços (rosa) no centro da imagem indicando a inversão em ambos. Também é possível visualizar a duplicação presente apenas no probando e a deleção próxima ao centrômero presente nos dois. (B) Representação esquemática da inversão [inv(2;2)(p24.1;p15)] com indicação dos pontos de quebra.

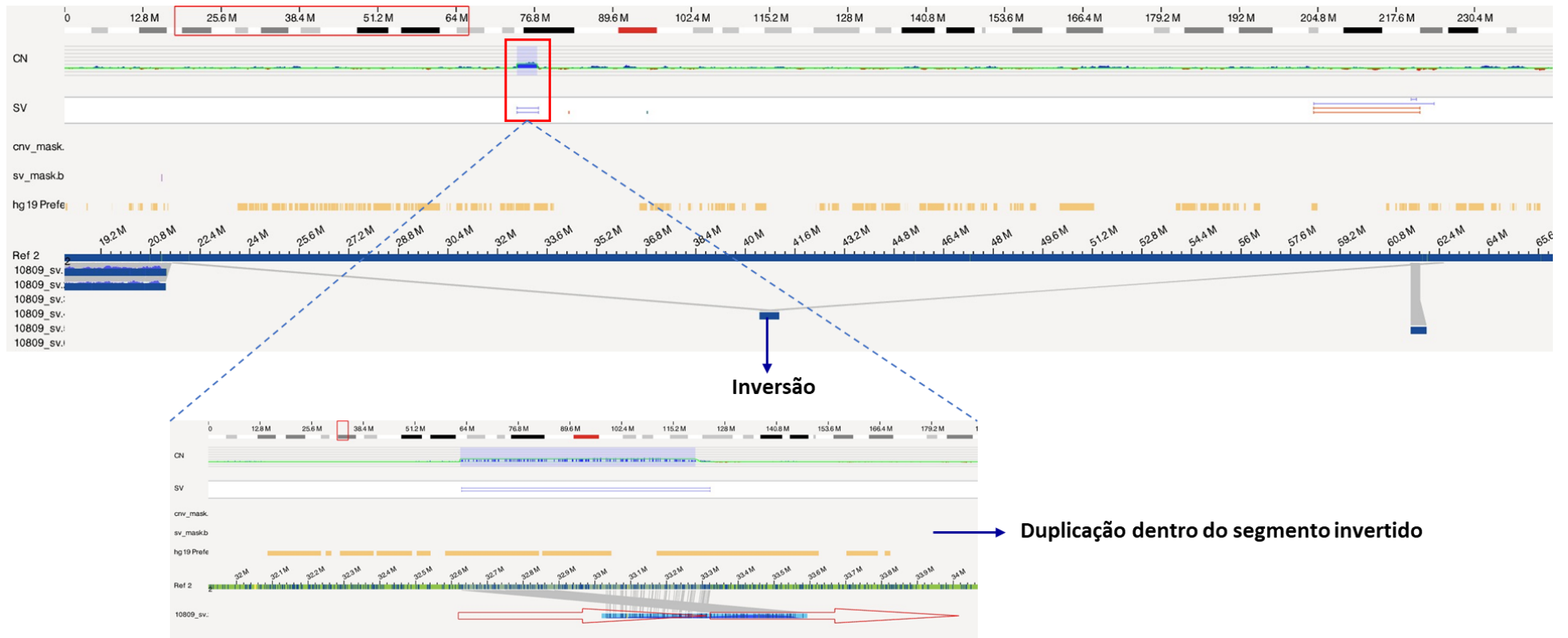


Figura 47. Análise por OGM na plataforma Acces do caso 8. O traço azul central com alinhamento em dois pontos distantes representa a inversão. Dentro do segmento invertido há uma duplicação que pode ser visualizada na barra de CNVs, que está ampliada abaixo.

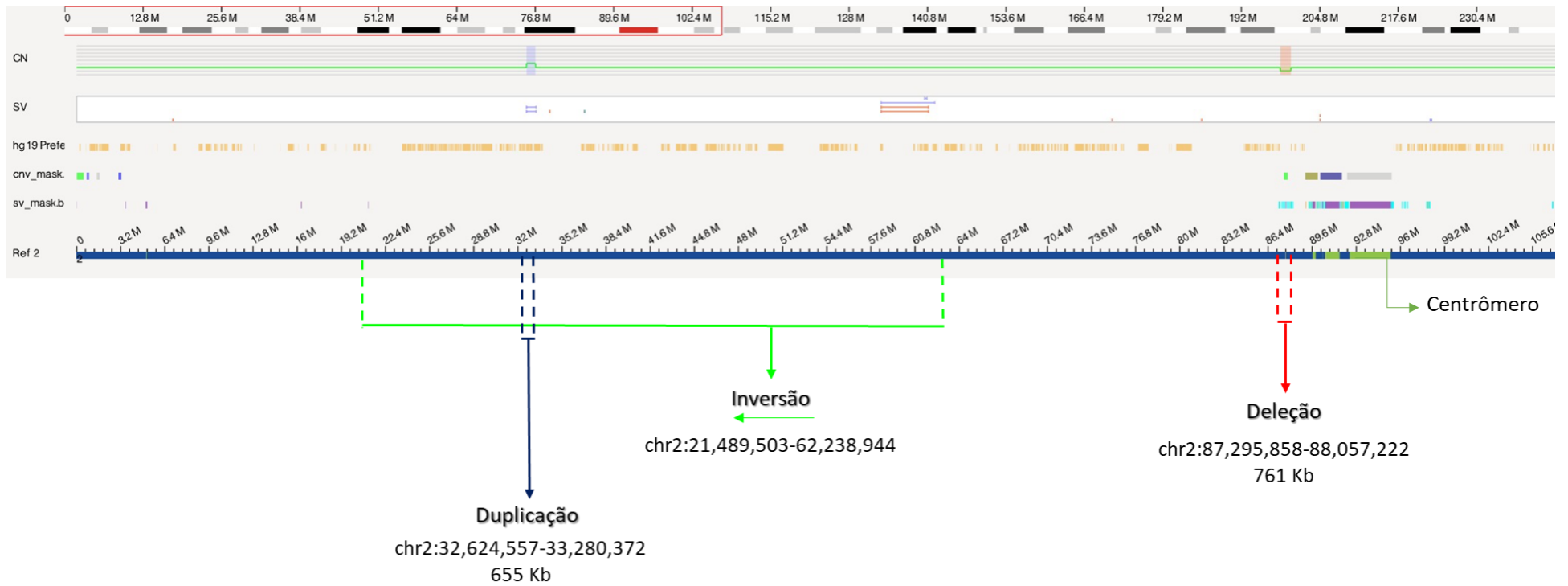


Figura 48. Representação esquemática do rearranjo no braço curto do cromossomo 2 do probando do caso 8. A barra azul escuro na região superior representa o braço curto do cromossomo 2. A linha verde representa o segmento invertido, com orientação modificada em relação à referência (seta verde). A linha azul indica a duplicação de 655Kb. E o traço vermelho próximo ao centrômero representa a deleção de 761Kb. As linhas tracejadas representam os pontos de quebra.

A análise materna revelou a presença da inversão [ogm[GRCh37] inv(2;2)(p24.1;p15)], com os mesmo pontos de quebra do probando, e da deleção próxima a região pericentromérica, porém de 805Kb (chr2:87,253,768-88,059,339) (Figura 49).

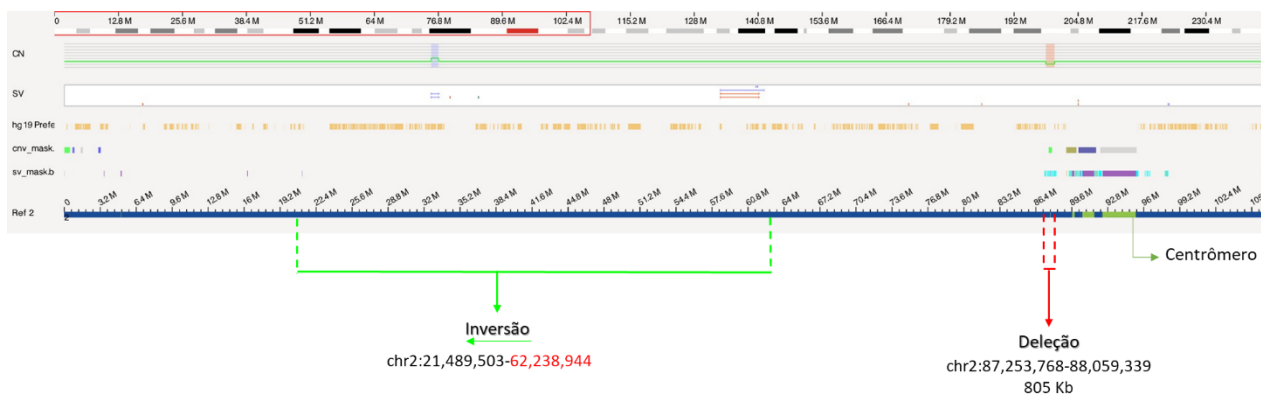


Figura 49. Representação esquemática do rearranjo no braço curto do cromossomo 2 na progenitora do probando do caso 8. A barra azul escuro na região superior representa o braço curto do cromossomo 2. A linha verde representa o segmento invertido, com orientação modificada em relação à referência (seta verde). O traço vermelho, próximo ao centrômero, representa a deleção de 805Kb. As linhas tracejadas representam os pontos de quebra.

Portanto, o probando apresenta um rearranjo cromossômico mais complexo do que o materno com a presença de uma duplicação dentro do segmento invertido.

Discussão

O probando da família 8 apresenta deficiência intelectual com presença de discretas dismorfias faciais. Pelo cariótipo foi identificada uma inversão no braço curto do cromossomo 2, herdada da mãe.

A análise por CMA revelou apenas a duplicação de 690Kb em 2p22.3. Entretanto, a análise conjunta por OGM do probando e de sua mãe revelou a presença de um rearranjo complexo, com algumas diferenças entre os dois.

A mãe do probando, que não apresenta manifestações fenotípicas, também apresenta uma deleção de 805 Kb próxima a região pericentromérica. O probando possui as mesmas variações estruturais da mãe acrescido de uma duplicação de 655 Kb dentro do segmento invertido, que apresenta orientação direta.

Inversão

A inversão no braço curto do cromossomo 2 leva a interrupção do gene *COMMD1* (*Copper Metabolism Domain Containing 1*). O gene *COMMD1* possui na homeostase do metabolismo do cobre, atuando na excreção do cobre intracelular. Foi identificado que as variantes patogênicas no gene *Commd1* em cães estão associadas à toxicidade por cobre (FEDOSEIENKO et al., 2014).

Além disso, o *COMMD1* interage com diversas proteínas influenciando em diferentes processos como transporte na membrana plasmática do complexo de Golgi, regulação do processo metabólico de proteínas celulares, e na regulação negativa do fator de transcrição NF-KB, diminuindo assim a reação inflamatória (WEISKIRCHEN; PENNING, 2021).

Alguns trabalhos sugerem que a manifestação do TEA pode estar associada à interrupção de uma via glutamatérgica excitatória devido ao desequilíbrio de íons metálicos no cérebro. Baecker et al. (2014) avaliaram expressão do gene *COMMD1* em modelo animal e constataram que alteração do padrão de expressão do gene *COMMD1* afeta os níveis intracelulares de cobre e conseqüentemente de zinco (seu antagonista).

Contudo, esses dados não são suficientes para estabelecer uma correlação entre a interrupção do gene *COMMD1* e as manifestações fenotípicas observadas no probando. Ademais, a genitora também possui a interrupção desse gene e não apresenta manifestação fenotípica.

Duplicação dentro do segmento invertido

A principal diferença entre o rearranjo do probando e o rearranjo materno é a presença da duplicação de 655 Kb (chr2:32,624,557-33,280,372) dentro da região invertida, que leva a interrupção de dois genes: *LTBP1* e *BIRC6*.

O gene *LTBP1* codifica uma glicoproteína extracelular que atua em conjunto com a fibrilina-1 na ativação e regulação do *TGFβ*, um fator de crescimento envolvido na proliferação e diferenciação celular. A desregulação da via do *TGFβ* já foi relacionada à patogênese de doenças autossômica dominantes que predisõem a aneurismas da aorta torácica incluindo a síndrome de Marfan e a síndrome de Loey-Dietz (QUIÑONES-PÉREZ et al., 2018).

A interrupção do gene *LTBP1* foi investigada em modelo animal por Drews et al. (2007). Os camundongos que tiveram o gene ortólogo silenciado foram viáveis e férteis, contudo apresentaram um fenótipo facial modificado. Além disso eles também identificaram que a ausência do *LTBP1* reduziu a atividade biológica do *TGF β* .

Pottie et al. (2021) relataram variantes truncadas em homozigose no gene *LTBP1* em oito indivíduos de quatro famílias não relacionadas. Os pacientes afetados apresentaram fenótipo de Cutis Laxa com dismorfias craniofaciais, alterações cardíacas e esqueléticas. Através dos resultados obtidos de experimentos *in vitro* com fibroblastos provenientes dos pacientes afetados, os autores sugerem que o gene *LTBP1* possui função dupla, afetando não só o desenvolvimento cutâneo como também esquelético.

A deleção em heterozigose foi relatada em apenas um caso familiar de aneurisma da aorta torácica (Quiñones-Pérez et al., 2017) e a deleção em homozigose está associada a manifestação de Cutis Laxa (POTTIE et al., 2021). Consequentemente, a interrupção do gene *LTBP1* parece não ser muito relevante no quadro clínico do paciente, exceto pela presença de dismorfias faciais.

Já o gene *BIRC6*, inibidor baculoviral da proteína contendo repetição de apoptose 6, é membro da família de inibidores de apoptose (IAPs) que contém o domínio BIR, que se liga as caspases impedindo a ativação da apoptose (OKUMU et al., 2017). O *BIRC6* também atua na mediação da citocinese e na restauração do DNA através do relaxamento da cromatina e do reparo da quebra da dupla fita ocasionado por erros na recombinação homóloga (GE; CHE; DU, 2015).

A desregulação do gene *BIRC6* já foi associado ao processo de tumorigênese sendo implicado em diversos tipos de câncer (CHEUNG et al., 2020), reflexo de sua função na regulação do ciclo celular. No entanto, a depleção do *BIRC6* interfere no acúmulo de proteínas de reparo essenciais no local da cromatina danificada, levando a elevados níveis de quebra da dupla fita e múltiplas anormalidades cromossômicas (GE et al., 2015).

O relato de CNVs ou variantes da sequência que afetam o gene *BIRC6* e que podem ter correlação o fenótipo do paciente do caso 8 são escassos na literatura. Keimishima et al. (2018) analisaram CNVs em uma coorte de pacientes

com TEA e esquizofrenia. Foram identificados 29 loci comuns ao TEA e a esquizofrenia, e 8 CNVs relevantes, entre as quais encontra-se a deleção do gene *BIRC6*.

Chang et al. (2019) avaliaram a presença de CNVs em pacientes com TEA e identificaram uma variante *de novo* no gene *BIRC6*. Os autores concluíram que o gene é um possível candidato na manifestação do TEA. Wu et al. (2019) investigaram uma coorte de 67 famílias com TEA, contudo realizaram análise de sequenciamento de exoma. Foram encontradas variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas em 23,9% dos casos, e um dos genes identificados como candidato foi o *BIRC6*.

Conclusão

O probando manifestou na infância um quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. O traço fenotípico mais evidente foi o atraso na fala, que se desenvolveu apenas aos 4 anos idade. Aos 14 anos o paciente apresenta um quadro de deficiência intelectual, um traço comportamental retraído e dismorfias faciais.

Diante dos dados apresentados é provável que a interrupção do gene *BIRC6* seja a causa manifestação fenotípica no probando, levando em consideração as variantes relatadas em indivíduos com TEA e esquizofrenia (KEIMISHIMA et al., 2018; CHANG et al., 2019; WU et al., 2019).

Além disso, a haploinsuficiência do *BIRC6* pode contribuir para a formação de novos rearranjos cromossômicos, tendo em vista que ele possui uma importante função no reparo da quebra da dupla fita de DNA (GE et al., 2015).

Contudo, não se pode descartar que a interrupção do gene *COMMD1* possa influenciar no quadro clínico. Ademais, a presença de mais de três pontos de quebra caracteriza um rearranjo complexo o que pode contribuir para perturbação da expressão de muitos genes próximos ao rearranjo.

Família 9

Descrição clínica

O caso 9 se refere a gêmeas monozigóticas com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor descritas previamente por Wawruk (2019). As gêmeas são filhas de pais consanguíneos, primos em terceiro grau. A família possui um longo histórico de consanguinidade. Ambas apresentaram atraso na fala e no desenvolvimento da marcha compatíveis tendo sido diagnosticadas com Transtorno do Espectro Autista (TEA).

Iniciaram acompanhamento na Genética aos 3 anos de idade com quadro de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Nos anos seguintes apresentaram alterações comportamentais e foram diagnosticadas com Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH). Aos 10 anos prosseguiram com quadro de deficiência intelectual leve, dificuldade de dicção, transtorno de ansiedade e compulsão.

Ao exame físico foi identificado: bossa frontal, olhos com fendas oblíquas para cima, filtro médio, pés planos. Além disso, uma das gêmeas apresentava estrabismo e miopia.

Achados citogenéticos

Através do exame de cariótipo foi detectada uma translocação entre os cromossomos 9 e 20 e um aumento expressivo da região de heterocromatina em ambos os cromossomo 9 [t(9;20)(q22;q13.3),9qh+,9qh+] (Figura 50). Os pais foram testados e foi identificado em ambos genitores o aumento da heterocromatina do cromossomo 9 em heterozigose ([46,XX,9qh+] e [46,XY,9qh+]) sem a presença de translocação. Portanto, trata-se de um rearranjo *de novo*.

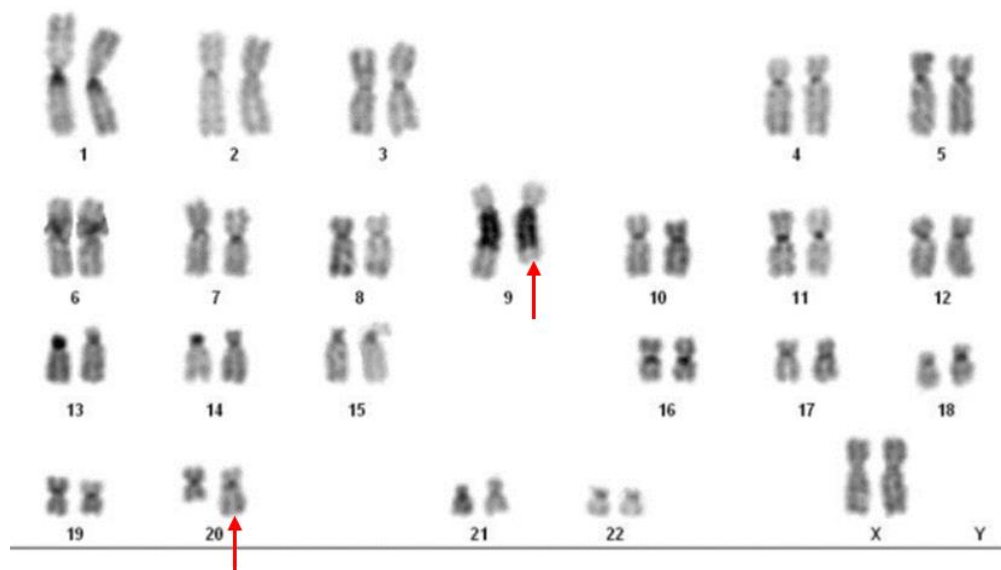


Figura 50. Cariótipo resultado da técnica de bandeamento C mostrando a translocação entre os cromossomos 9 e 20 (setas vermelhas) e o aumento da heterocromatina pericentromérica do cromossomo 9.

A análise por CMA não detectou perda ou ganho de material genético, contudo foi identificada ausência heterozigose no cromossomo 7.

Em análise prévia, realizada por Wawruk (2019), foram identificados os pontos de quebra pela metodologia de sequenciamento *Mate-Pair*: região 9q21.12 (chr9:70,379,607-70,379,994); e região 20q11.23 (chr20:36,440,488-36,440,653), que interrompe o gene *DLGAP4*.

Através da análise por OGM foi confirmada a presença da translocação [ogm[GRCh38] t(9;20)(q21.12;q11.23)] (Figura 51) e o respectivos pontos de quebra no cromossomo 9 (chr9:70,373,793-70,373,803) e no cromossomo 20 (chr20:36,446,524-36,446,534), que leva a interrupção do gene *DLGAP4* (Figura 52).

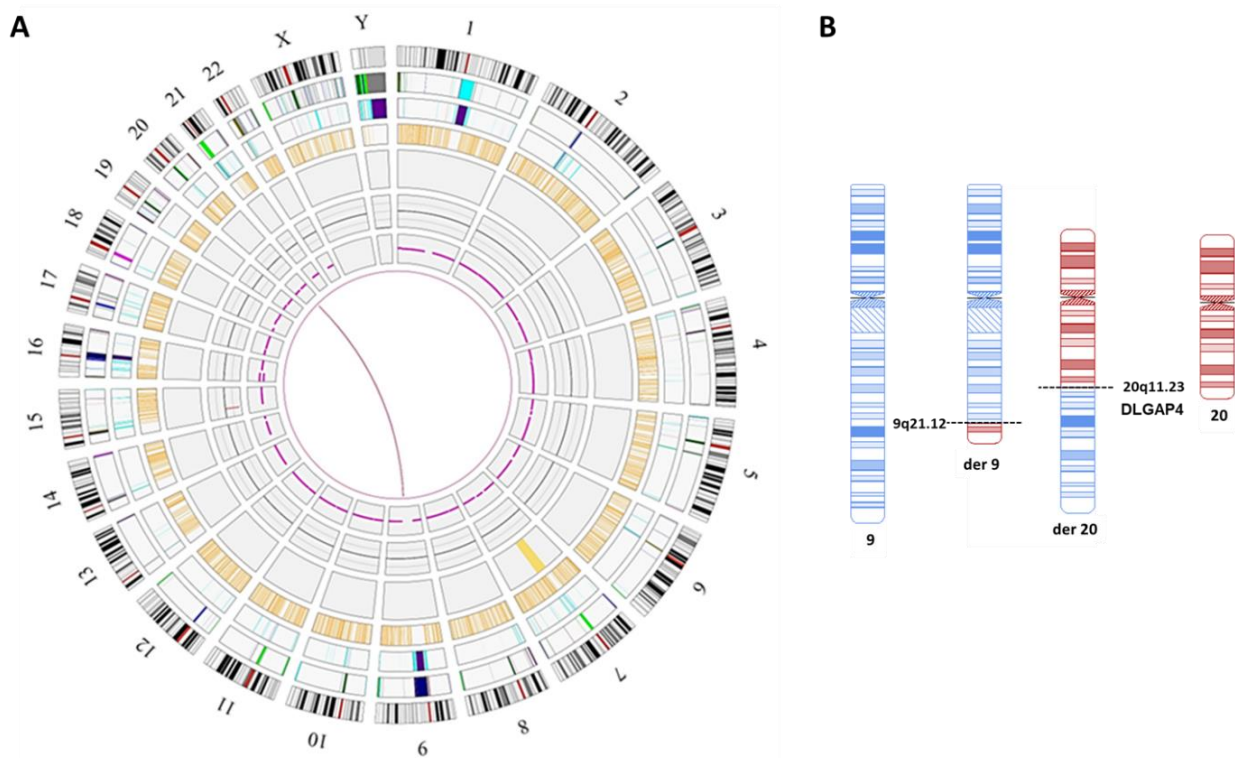


Figura 51. Translocação do caso 9. (A) *Circos plot*. A linha central que liga os cromossomos 9 e 20 indica a presença da translocação. (B) Representação esquemática da translocação $[t(9;20)(q21.12;q11.23)]$ com indicação dos pontos de quebra.

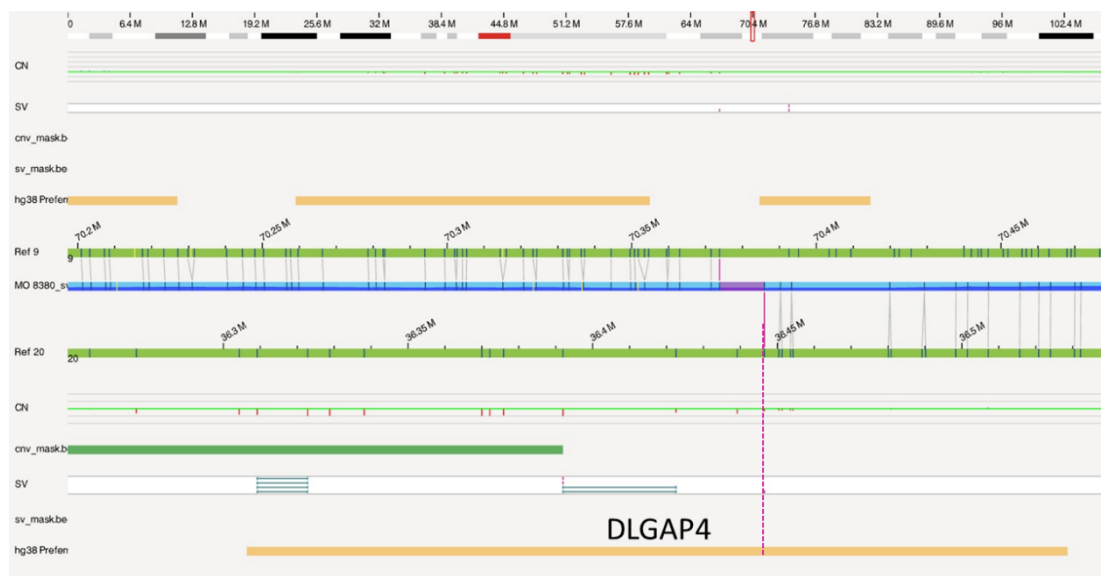


Figura 52. Pontos de quebra da translocação no caso 9. A barra azul central representa a amostra do paciente analisado. A barra verde superior representa o genoma de referência do cromossomo 9 e a inferior a referência do cromossomo 20. Nota-se que parte da barra azul se alinha ao cromossomo 9 e parte ao cromossomo 20. A linha rosa tracejada (vertical) indica o ponto de quebra.

Através do sequenciamento *long-read* da PacBio foi possível confirmar as coordenadas dos pontos de quebra do cromossomo 9 (chr9:70,379,829-70,379,891) e do cromossomo 20 (chr20:36,396,300-36,396,750), e determinar suas respectivas sequências (Figuras 53 e 54). Foi identificada a inserção de uma sequência de 383 pb no ponto de quebra do cromossomo 20, que diverge da sequência do genoma de referência.

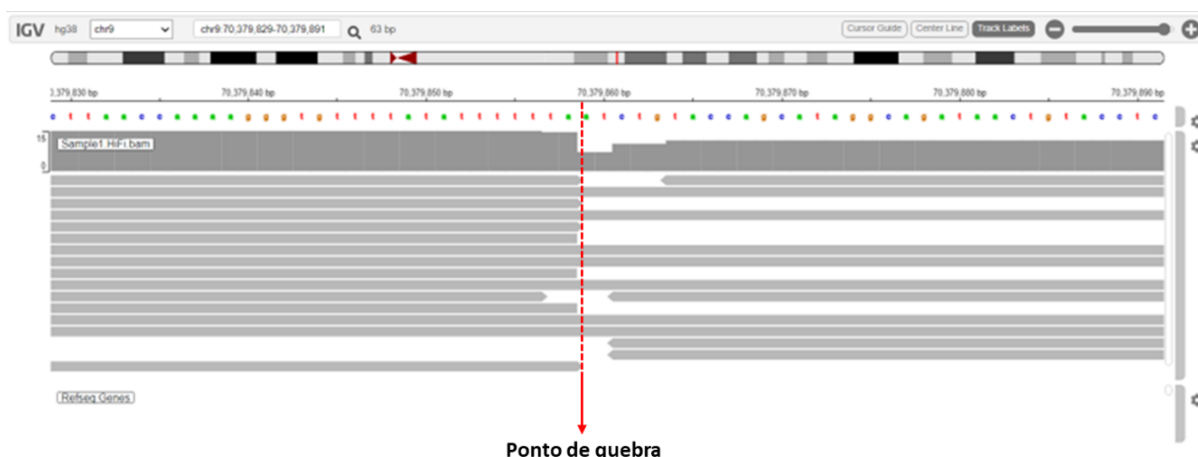


Figura 53. Ponto de quebra cromossomo no cromossomo 9. As linhas na cor cinza claro apresentam os *reads* sequenciados. É possível notar uma interrupção da leitura em cerca de metade dos *reads*, indicado pela linha tracejada vermelha.

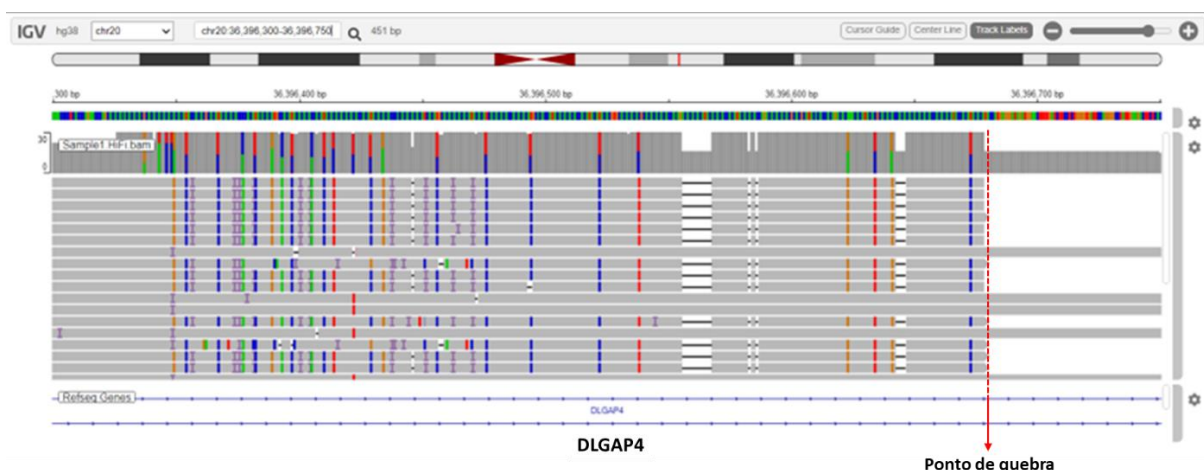


Figura 54. Ponto de quebra no cromossomo 20. As linhas na cor cinza claro representam os *reads* sequenciados. É possível notar uma interrupção da leitura em cerca de metade dos *reads*, indicado pela linha tracejada vermelha. Os pontos coloridos e espaços em branco nos *reads* indicam variações na sequência em relação a referência, que representa a sequência inserida no ponto de quebra.

A seguir será descrita a família 9B que foi adicionada ao estudo devido ao conhecimento prévio do resultado da análise por CMA, que foi realizado em laboratório privado. Foi identificada uma microduplicação de 760Kb (8p23.3) que sobrepõe o gene *DLGAP2*. Os genes *DLGAP2* e *DLGAP4* (descrito no caso 9) compõe a mesma família de genes e serão discutidos em conjunto.

Família 9B

Descrição clínica

A família 9B se refere a dois irmãos com diagnóstico de transtorno do espectro autista. Uma paciente do sexo feminino com 13 anos de idade e um sexo masculino com 11 anos de idade. Os irmãos apresentam quadro clínico semelhante de atraso na fala, dificuldade de aprendizado e dificuldade de interação social.

Ao exame físico da paciente do sexo feminino foi observado: rosto largo, sobranceiras arqueadas, discreta assimetria da fenda palpebral (esquerda mais elevada), raiz e ponte nasal altas, nariz com ponta bulbosa, filtro nasolabial curto, rima bucal reta, lábios grossos em arco de cupido, queixo pequeno com reentrância mediana, orelhas normoimplantadas. Não apresenta deformidades torácicas, membros proporcionados, discreta escoliose, pregas palmares normais e pés estreitos.

Ao exame físico do paciente do sexo masculino foi observado: testa ampla, glabella bem-marcada, discreta proptose ocular, raiz nasal alta, ponte nasal globosa, filtro nasolabial curto, incisivo lateral esquerdo apinhado. Possui mancha hipocrômica de bordas irregulares no processo xifoide e leve depressão no externo. Membros alinhados e proporcionados com hiper extensibilidade articular, mancha café com leite no braço direito, pregas palmares normais e pés estreitos com arco plantar baixo.

Tanto o pai quanto a mãe referem ter dificuldade importante de aprendizado.

Achados citogenéticos

O cariótipo de ambos os irmãos não revelou alterações. Através da análise por CMA foi possível identificar uma microduplicação de 760Kb em 8p23.3 [arr[GRCH]8p23.3p23.3(1,570,315-2,330,754)x3], que leva a interrupção do gene *DLGAP2*. Essa análise foi realizada em laboratório privado. Uma vez que já estávamos investigando o papel do gene *DLGAP4* na etiologia da DI (caso 9) decidimos prosseguir com a análise dessa família.

A análise por CMA dos pais revelou que a duplicação foi herdada da mãe [8p23.3p23.3(1,570,315-2,330,754)x3], que apresenta a mesma duplicação observada nos dois filhos (Figura 55). O *microarray* paterno não apresentou perda ou ganho de segmentos cromossômicos.



Figura 55. Duplicação de 760Kb em 8p23.3 do caso 10. A faixa azul parte superior indica o segmento duplicado. A linha vermelha tracejada mostra o ponto de quebra que lava a interrupção do gene *DLGAP2*.

A análise por OGM confirmou a presença da microduplicação de 707,6 Kb em 8p23.3 [ogm[GRCh37] 8p23.3p23.2(1,565,872_2,273,570)x3], que leva a interrupção do gene *DLGAP2* e a duplicação dos genes *CNL8*, *ARHGEF10*, *KBTBD11* e *MYOM2* (Figuras 56 e 57).

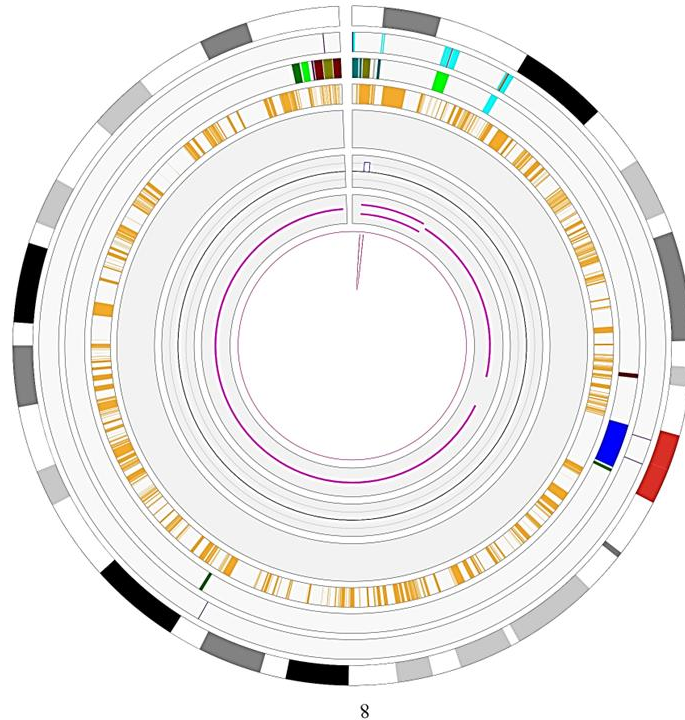


Figura 56. Duplicação do caso 10. *Circos plot* do cromossomo 8, o pico no centro do gráfico representa a duplicação.

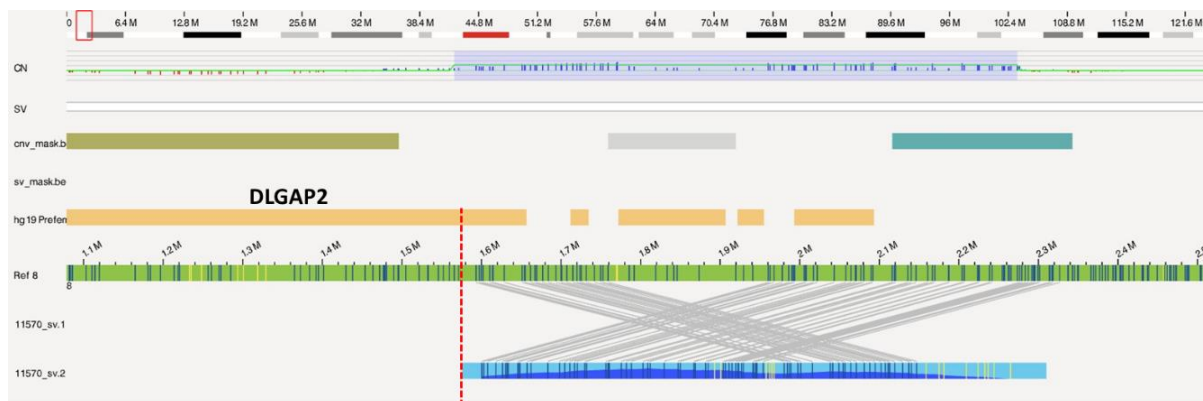


Figura 57. Análise por OGM na plataforma Acces do caso 10. A faixa azul na região superior indica a duplicação. A linha vermelha tracejada mostra o ponto de quebra que interrompe o gene *DLGAP2*.

Discussão gene DLGAP

Apesar das famílias 9 e 9B não serem relacionados e apresentarem alterações estruturais diferentes, os pacientes descritos apresentam traços fenotípicos semelhantes, compatíveis com características do transtorno do espectro autista (TEA), tendo a deficiência intelectual como traço mais marcante em ambos os casos.

A incapacidade de atingir marcos de desenvolvimento, seja cognitivo, motor ou emocional, é o que caracteriza amplamente os distúrbios do neurodesenvolvimento (NDDs). Os NDDs geralmente estão associados a alterações no desenvolvimento do cérebro e podem afetar a cognição, a comunicação, o comportamento e as habilidades motoras.

NDDs incluem deficiência intelectual (DI), transtorno do espectro autista (TEA), transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e epilepsia. Portanto, são um grupo heterogêneo de distúrbios que possivelmente compartilham vias moleculares, o que explica a sobreposição de fenótipos e o diagnóstico de mais de um tipo de NDD no mesmo indivíduo (PARENTI et al., 2020).

Um exemplo de comorbidade comum é a ocorrência simultânea de DI e TEA. A DI é caracterizada por 3 características: comprometimento cognitivo, déficit na função adaptativa e início durante o período de desenvolvimento. O TEA é caracterizado por dificuldade de interação social e comportamento estereotipado; no entanto, o espectro de alterações também inclui outras manifestações neurológicas, como deficiência intelectual, epilepsia e sinais motores neurológicos leves (RAMASWAMI; GESCHWIND, 2018).

Os NDDs têm etiologia multifatorial com contribuição de anormalidades genéticas e fatores ambientais. Milhares de genes codificam proteínas que são necessárias para uma função cerebral eficiente, resultando em diversas possíveis causas genéticas. Genes da família DLGAP (*Discs Large Associated Proteins*) fazem parte da lista de candidatos que podem contribuir para a patogênese da DI, assim como de outros transtornos do neurodesenvolvimento (RASMUSSEN; SILAHTAROGLU, 2017).

As proteínas DLGAP são codificadas por quatro genes homólogos (*DLGAP1-4*) que apresentam expressão diferencial e simultânea no cérebro.

Elas desempenham uma importante função na densidade pós-sináptica (PSD), além de atuarem de modo cooperativo nas sinapses excitatórias (BAI; WANG; LI, 2022).

A PSD é uma estrutura carregada de elétrons que fica abaixo da membrana pós-sináptica sendo composta por um complexo de milhares de proteínas densamente empacotadas em formato de disco. Alterações nessas proteínas vêm sendo associado a doenças neurológicas e psiquiátricas. Além disso, as proteínas DLGAP2 e DLGAP4 estão listadas entre as principais proteínas que compõe a PSD (KAIZUKA; TAKUMI, 2018).

A *Simons Foundation Autism Research Initiative* (SFARI) (<https://www.sfari.org/>) faz uma curadoria periódica de genes implicados no autismo de acordo com os trabalhos científicos publicados. Essa lista inclui diversos genes que codificam proteínas típicas da PSD, como os genes *DLGAP1*, *DLGAP2* e *DLGAP3*. A revisão sistemática de Soler et. al (2018), que teve por objetivo avaliar a relação de variantes nas proteínas Dlgap e o risco de desenvolver autismo e esquizofrenia, identificou o gene *DLGAP2* como candidato mais promissor nessa correlação.

Atualmente há na literatura o relato de somente três casos de duplicação em 8p23.3 que levam a quebra do *DLGAP2*, assim como ocorre no caso 10. Marshall et al. (2008) avaliaram 427 indivíduos com TEA e variações cromossômicas estruturais, e foi identificado um caso com duplicação de 791 Kb. Pinto et al. (2010) pesquisaram a presença de CNVs raras em 1275 casos de TEA (análise do trio) e identificaram um caso com duplicação de 817 Kb. E Woodbury-Smith et al. (2019) relataram um caso familiar de TEA em que foi identificado uma duplicação de 355 Kb em 8p23.3. Em todos os trabalhos a interrupção do gene *DLGAP2* foi sugerida como a causa para explicar o quadro clínico dos pacientes analisados.

A deleção da porção final do braço curto do cromossomo 8, que inclui o gene *DLGAP2*, também já foi relatada em casos de TEA. Chien et al. (2010) que reportaram um caso de TEA com deleção de 2,4 Mb. Shi et al. (2017) descreveram um caso de deleção de ~6 Mb em um paciente com TEA em associação com deficiência intelectual, TDAH, microcefalia e pequenas dismorfias faciais. Os autores sugerem que além do gene *DLGAP2*, as deleções

dos genes *CLN8*, *ARHGEF10* e *CSMD1* sejam a causa do quadro clínico (SHI; SUN; HE, 2017).

Em 2021, Catusi et al. descreveram 7 casos de deleção terminal em 8p23.2 que variava de 71,79 Kb a 4,55 Mb. Através da análise comparativa dos casos, os autores sugerem que a região crítica deletada para o desenvolvimento de alterações do comportamento e doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento incluía apenas os genes *DLGAP2*, *CLN8* e *ARHGF10*, sendo *DLGAP2* o gene candidato mais forte entre os três.

Os pacientes descritos na família 9B têm o diagnóstico clínico inicial de TEA com atraso no desenvolvimento da fala, deficiência intelectual leve e interação social. A quebra do gene *DLGAP2* devido a duplicação é uma alteração rara, contudo os dados presentes na literatura mostram que alterações nesse gene podem de fato contribuir para a manifestação do TEA e da DI. Além disso, têm-se demonstrado que o *DLGAP2* é o gene candidato mais promissor da família DLGAP envolvido no desenvolvimento de transtornos do neurodesenvolvimento.

Em relação ao gene *DLGAP4*, não existem relatos na literatura que associem diretamente alterações no gene com fenótipo de doenças do neurodesenvolvimento. Entretanto, já foi relatado um caso familiar de ataxia cerebelar possivelmente ocasionado por uma translocação entre os cromossomos 8 e 20 [t(8;20)(p12;q11.23)]. O ponto de quebra no cromossomo 20 está localizado 820pb *downstream* do primeiro éxon não transcrito do gene *DLGAP4*. Segundo os autores, o truncamento da região promotora do *DLGAP4*, rica em ilhas CpGs, perturbaria a expressão monoalélica do gene contribuindo assim para quadro de ataxia cerebelar (MINOCHERHOMJI et al., 2012).

Estudos em modelo animal sugerem que alterações no *DLGAP4* também estão associadas ao desenvolvimento do TEA e outros transtornos do neurodesenvolvimento. Schob et al. (2019), silenciaram o gene *Sapa4*, ortólogo do *DLGAP4* em ratos, o que levou a anormalidades comportamentais profundas, déficit cognitivo, comprometimento da função vocal e da interação social, semelhante ao que é visto em indivíduos com TEA.

Romero et al. (2022) descreveram um caso de heterotopia subcortical associado à epilepsia e deficiência intelectual. Este tipo de heterotopia geralmente está relacionado a alterações no gene *EML-1*, que codifica uma

proteína de ligação aos microtúbulos. Contudo, neste caso eles identificaram uma nova variante no gene *DLGAP4*. Neste mesmo estudo, foi realizada uma análise funcional e foi constatado que a proteína Dlgap4 tem função pleotrópica nas sinapses, influenciando na integridade do córtex cerebral em desenvolvimento.

As evidências em modelo animal demonstram que a perda de função ou alterações na expressão do gene *DLGAP4* também podem estar relacionadas ao desenvolvimento do TEA. As pacientes da família 9 apresentam um quadro clínico um pouco mais complexo, com uma sobreposição de fenótipos: TEA, TDAH, deficiência intelectual, ansiedade e compulsão.

Segundo Bai, Wang e Li (2022), alterações patológicas na estrutura ou na função da transmissão do sinal neuronal é a base para o desenvolvimento de diversos distúrbios neuropsiquiátricos como TEA, Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), esquizofrenia, transtornos cognitivos e de humor. Os dados da literatura mostram que diversos genes implicados no TEA se conectam com outras condições clínicas, o que pode justificar essa sobreposição de fenótipos.

As evidências demonstram a quebra do gene *DLGAP2*, que codifica uma das principais proteínas do complexo da densidade pós-sináptica, pode contribuir para a manifestação de TEA na família 9B. Além disso, o fato do gene *DLGAP2* ser um forte candidato na manifestação do TEA, reforça a hipótese de que alterações no *DLGAP4* também possa contribuir para a manifestação do transtorno. Levando em consideração que eles devem exercer funções semelhantes, pois são genes homólogos que compõe a mesma família de genes.

Particularidades da família 9

Além da translocação entre os cromossomos 9 e 20 e a interrupção do gene *DLGAP4*, as gêmeas descritas na família 9 apresentam um aumento expressivo da região de heterocromatina centromérica do cromossomo 9 em homozigose, ausência de heterozigose no cromossomo 7 e a inserção de uma sequência de 383 pb no ponto de quebra do cromossomo 20.

O cromossomo 9 possui naturalmente um centrômero maior que os demais cromossomos, contudo a extensão dessa região (9qh+) já foi relatada em diversos trabalhos. Por se tratar de uma região de heterocromatina constitutiva, acreditava-se que essas variações não teriam impacto fenotípico.

Essa percepção se deu principalmente pela limitação de análise dessas regiões. Os centrômeros são organizados em grandes matrizes de DNA em *tandem* e a montagem de leituras longas era limitada pela tecnologia de sequenciamento *short-read* (MIGA, 2020). Entretanto com o avanço das tecnologias de leitura longa (PacBio e ONT) foi possível sequenciar todas as regiões de heterocromatina de forma fidedigna (NURK et al., 2022).

O sequenciamento do genoma completo (T2T), publicado por Nurk et al. (2022), adicionou ou corrigiu 238 Mb de sequência que não se alinhavam corretamente na última versão do genoma humano (Hg38). 182 Mb não tinham alinhamento primário, levando a um aumento no número de genes conhecidos e identificação de novas sequências de repetição do genoma. Surpreendentemente o cromossomo 9 foi o que teve o maior número de bases novas adicionadas sobretudo nas regiões centromérica e pericentromérica, sendo que nesta última foi identificado uma densidade gênica relevante desconhecida anteriormente.

Os centrômeros são essenciais para a montagem cromossômica adequada e alterações em sua estrutura ou em vias que o regulam podem levar a segregação incorreta dos cromossomos, resultando em alterações estruturais (SCELFO et al., 2018). Além disso, o rearranjo pode afetar o próprio DNA satélite do centrômero, que podem estar susceptíveis a: duplicação segmentar, deleção de transposons, inversões hemicêntricas e inserções. Acredita-se que esses eventos resultam da quebra da dupla fita e são mediados por micro-homologia (TALBERT; HENIKOFF, 2020).

Portanto, esse aumento da heterocromatina do cromossomo 9 pode contribuir para as manifestações fenotípicas apresentadas no caso 9, considerando que novos genes foram identificados nessa região. Esse aumento pode também ter influenciado o desenvolvimento do rearranjo [t(9;20)], tendo em vista que alterações no centrômero podem contribuir para defeitos de segregação cromossômica.

Ademais, estudos anteriores identificaram uma frequência maior de aumento da heterocromatina do 9 em casos de esquizofrenia (DEMIRHAN; TAŞTEMIR, 2003) e TEA (VORSANOVA et al., 2007), o que corrobora os achados clínicos das pacientes da família 9. Contudo, uma investigação mais aprofundada é necessária para poder correlacionar esses eventos.

Outro achado que pode influenciara manifestação fenotípica é ausência de heterozigose no cromossomo 7. O fato de as gêmeas serem filhas de um casal consanguíneo aumenta o risco da manifestação de doenças com padrão de herança autossômico recessivo (VORSANOVA et al., 2007).

Portanto, além da translocação que leva a quebra do gene *DLGAP2*, um forte candidato para doenças do neurodesenvolvimento, o aumento da heterocromatina do cromossomo 9 e a ausência de heterozigose no cromossomo 7 também podem contribuir para as manifestações fenotípicas identificadas nas gêmeas descritas na família 9.

Inserção no ponto de quebra do cromossomo 20

Através da análise do sequenciamento *long-read* da PacBio foi identificada a inserção de um segmento de 383 bp no ponto de quebra do cromossomo 20. O alinhamento dessa sequência com o genoma de referência revelou identidade com diversas regiões do genoma, demonstrando ser um segmento oriundo de uma região de repetição. Entretanto, não houve identidade de 100% em nenhum dos alinhamentos, não sendo possível determinar com precisão a origem da sequência inserida.

Apesar da ausência de homologia completa, duas regiões do genoma demonstraram ter um bom alinhamento com pequenas variações de sequência. Uma região no cromossomo 9 (Figura 57) e outra região no cromossomo 5 (Figura 58) com 89,7% e 83,3% de homologia, respectivamente.

O fato de o segmento inserido ser longo, estar presente no ponto de quebra e o rearranjo ocorrer em uma região de repetição sustenta a hipótese de que o mecanismo envolvido na translocação, e conseqüentemente na inserção, é a recombinação homóloga não alélica (NAHR).

A NAHR ocorre por um desalinhamento durante a recombinação homóloga durante a meiose ou mitose. Quando esse desalinhamento ocorre entre cromossomos diferentes leva a formação de translocações (ESCARAMÍS; DOCAMPO; RABIONET, 2015).

Na família 9 a translocação ocorre entre os cromossomos 9 e 20, e seria plausível concluir que a sequência inserida no ponto de quebra do cromossomo 20 tenha origem no 9, o que corrobora com o resultado do alinhamento com o genoma de referência. Contudo, como já citado, não há 100% de homologia e houve um bom alinhamento com um segmento do cromossomo 5.

Portanto, não é possível determinar a origem da sequência inserida, mas a hipótese mais provável é que ela tenha origem no cromossomo 9 como consequência da NAHR, que levou a formação da translocação.

Discussão geral

Ao todo foram analisadas 10 famílias que incluem diversos tipos de rearranjos cromossômicos estruturais: 4 translocações, 2 inversões, 1 duplicação, 1 cromossomo marcador, 1 cromossomo derivativo de origem materna e 1 rearranjo complexo (Figura 59). Na tabela 1 consta o resumo dos achados citogenéticos de todos os casos.

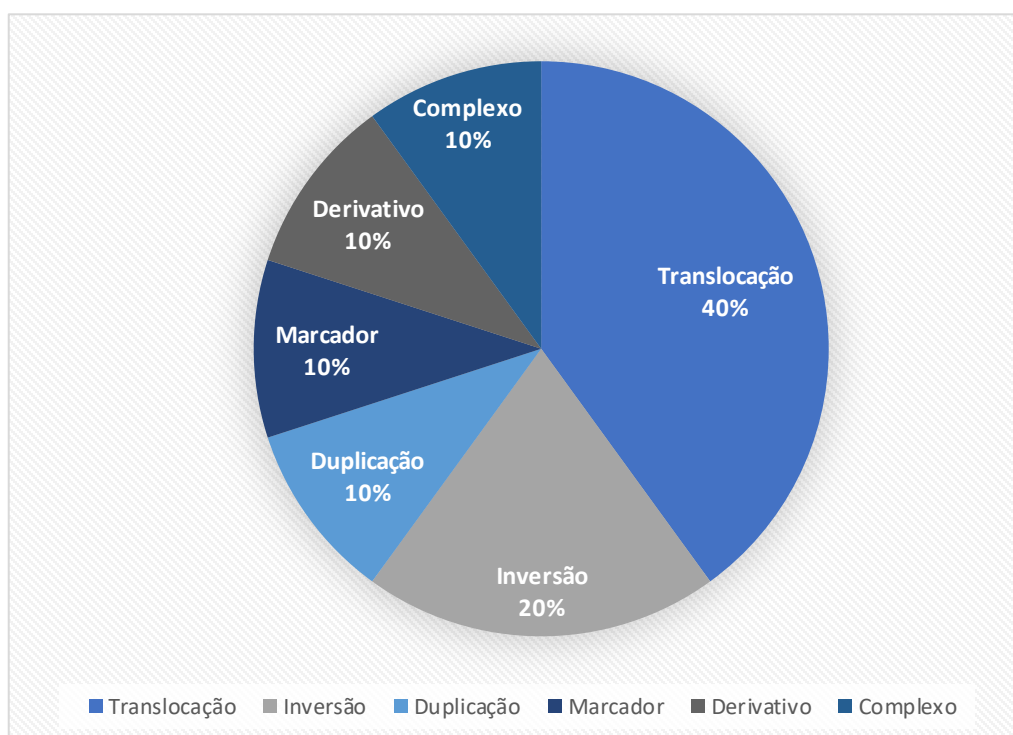


Figura 59. Gráfico com as porcentagens dos tipos de rearranjos cromossômicos investigados e caracterizados neste estudo.

Através da metodologia de cariótipo foi possível identificar 90% dos rearranjos, com exceção do caso de microduplicação (Família 9B), que foi incluído no estudo devido ao conhecimento prévio da interrupção do gene *DLGAP2*.

Apesar da identificação de quase todas as variações cromossômicas estruturais, a técnica não oferece dados refinados que permitam caracterizar com precisão os rearranjos

Neste trabalho, a análise de cariótipo foi eficaz na identificação inicial dos rearranjos cromossômicos, contudo não foi possível estabelecer o diagnóstico ou suspeita diagnóstica em nenhum dos casos analisados havendo a necessidade de prosseguir com a investigação citogenética.

Pelo CMA foi possível identificar CNVs em somente quatro casos, indicando a princípio que a maioria dos rearranjos avaliados eram balanceados. Através da análise por CMA foram identificados:

- A tetrassomia de 18p na família 1, o que permitiu determinar a origem do cromossomo marcador e que se trata de um isocromossomo [i(18p)].
- A deleção (4q) e duplicação (7p) na probanda da família 2. Dessa forma foi confirmada a presença de uma translocação não balanceada de origem materna com identificação dos pontos de quebra.
- A microduplicação de 690 Kb em 2p no probando da família 8.
- A microduplicação de 760 Kb em 8p na família 9B, com a determinação dos pontos de quebra.

Nos casos 1 e 2 as metodologias de cariótipo e CMA foram suficientes para concluir a investigação citogenética e fechar o diagnóstico dos pacientes. No caso da família 9B somente a análise por CMA bastaria para determinar um desfecho. Portanto, com os resultados da análise por CMA houve uma taxa de 30% de resolução dos casos, próximo ao encontrado na literatura, que é em torno de 20% (MANTERE et al., 2021).

A técnica de CMA possui uma resolução muito maior que o cariótipo, que pode variar entre 1Mb e 100 Kb dependendo da plataforma. No entanto não é possível identificar rearranjos balanceados (SHINAWI; CHEUNG, 2008).

Dos dez casos inicialmente selecionados, oito prosseguiram para análise por OGM. Os resultados obtidos previamente, por cariótipo e CMA, foram 100% confirmados com dados mais refinados. Mantere et al (2021) investigaram 85 indivíduos com diferentes variações cromossômicas estruturais, identificadas previamente por outras técnicas e obtiveram 100% de concordância, o que corrobora com os dados obtidos neste estudo.

A técnica permitiu a identificação de todos os tipos de variações estruturais, balanceadas e não balanceadas: deleções, duplicações, inversões, translocações, e um rearranjo complexo, que inicialmente foi classificado como um rearranjo simples e balanceado.

Ademais, foi possível detectar com precisão os pontos de quebra, o que possibilitou a identificação de interrupções gênicas em sete dos oito casos analisados. Desse modo, foi viável estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo e sugerir genes candidatos para as manifestações fenotípicas descritas nos pacientes.

O OGM tem resolução dez mil vezes maior que o cariótipo, no entanto a técnica não é capaz de detectar rearranjos equilibrados dentro de regiões de repetição não mapeáveis, como centrômero, braço curto dos cromossomos acrocêntricos e regiões de heterocromatina constitutiva (MANTERE et al., 2021).

Com o sequenciamento *long-read*, realizado no caso 9, foi possível confirmar a translocação[t(9;20)] e obter as sequências dos pontos de quebra. Os segmentos envolvidos estão localizados em regiões de repetição que não são bem sequenciadas pelas metodologias de *short-read* (YANG; WU; YAN, 2019). Estes dados confirmam a eficiência dos sequenciamentos de leitura longa na análise de regiões de repetição do genoma.

Além disso, esse resultado permite a montagem do centrômero do cromossomo 9, o que não foi explorado neste trabalho. Desse modo, será possível compreender a sua estrutura e como o aumento da heterocromatina constitutiva pode contribuir para o rearranjo e, conseqüentemente, para as manifestações fenotípicas no caso 9.

As variações estruturais têm o potencial de perturbar a complexa organização da cromatina levando ao reposicionamento de genes, promotores, *enhancers* e fronteiras de seus domínios de associação. Já é reconhecido que a desconexão de regiões regulatórias podem ser a causa de transtornos do desenvolvimento (SPIELMANN, 2018).

Neste trabalho, a análise *in silico* dos TADs forneceu uma perspectiva de como os genes vizinhos aos rearranjos podem ter a expressão afetada, e conseqüentemente contribuir para manifestação fenotípica. Sob essa ótica, a utilização de metodologias que avaliam a organização 3D do genoma pode contribuir para elucidar como um rearranjo “linear” pode impactar na organização da cromatina (HU et al., 2020).

12 Considerações finais

- O cariótipo foi um excelente método de triagem das variações cromossômicas estruturais, apesar da baixa resolução.
- A técnica de CMA foi efetiva na identificação de CNVs, contudo a maior parte dos casos eram de rearranjos balanceados que não são detectados pela técnica.
- Com a análise por OGM foi possível identificar todos os tipos de rearranjos, definir os pontos de quebra e ter um refinamento de dados a respeito dos segmentos cromossômicos envolvidos.
- O OGM demonstrou ser uma ótima ferramenta na investigação de SVs, sobretudo de rearranjos balanceados, com potencial de futuramente substituir o uso outras metodologias.
- Em casos de rearranjos cromossômicos não balanceados a investigação citogenética por cariótipo e CMA demonstrou ser suficiente para se chegar a uma conclusão.

13 Referências

ALDRUP-MACDONALD, M. E. et al. Genomic variation within alpha satellite DNA influences centromere location on human chromosomes with metastable epialleles. **Genome Research**, v. 26, n. 10, p. 1301–1311, 1 out. 2016.

ALVES, J. M. et al. On the Structural Plasticity of the Human Genome: Chromosomal Inversions Revisited. **Current Genomics**, v. 13, p. 623-632, 2012.

ARMANET, N. et al. Small supernumerary marker chromosomes in human infertility. **Cytogenetic and Genome Research**. Karger AG, dez. 2015.

AZIZ, N. A.; VAN BELZEN, M. J.; ROOS, R. A. C. Intergenerational CAG repeat instability is highly heritable in Huntington's disease. **Journal of Medical Genetics**, v. 45, n. 11, p. 766–766, nov. 2008.

BACCHELLI, E. et al. An integrated analysis of rare CNV and exome variation in Autism Spectrum Disorder using the Infinium PsychArray. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3198, 21 fev. 2020.

BAGHERI, H. et al. Identifying candidate genes for 2p15p16.1 microdeletion syndrome using clinical, genomic, and functional analysis. **JCI Insight**, v. 1, n. 3, 17 mar. 2016.

BAI, Y.; WANG, H.; LI, C. SAPAP Scaffold Proteins: From Synaptic Function to Neuropsychiatric Disorders. **Cells MDPI**, dez. 2022.

BAIRD, D. M.; HENDRICKSON, E. A. Telomeres and chromosomal translocations: There's a ligase at the end of the translocation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2018. v. 1044p. 89–112.

BARRA, V.; FACHINETTI, D. The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. **Nature Communications**, dez. 2018.

BATTAGLIA, A.; CAREY, J. C.; SOUTH, S. T. Wolf-Hirschhorn syndrome: A review and update. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 169, n. 3, p. 216–223, set. 2015.

BAECKER, T. et al. Loss of COMMD1 and copper overload disrupt zinc homeostasis and influence an autism-associated pathway at glutamatergic synapses. **BioMetals**, v. 27, n. 4, p. 715–730, 2014.

BESPALOVA, I. N.; BURMEISTER, M. Identification of a Novel LIM Domain Gene, LMCD1, and Chromosomal Localization in Human and Mouse. **Genomics**, v. 63, n. 1, p. 69–74, jan. 2000.

BIAN, Z.-Y. et al. LIM and Cysteine-Rich Domains 1 Regulates Cardiac Hypertrophy by Targeting Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T Cells Signaling. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 257–263, fev. 2010.

BISHOP, R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. **Bioscience Horizons**, mar. 2010.

BOCKLANDT, S.; HASTIE, A.; CAO, H. Bionano Genome Mapping: High-Throughput, Ultra-Long Molecule Genome Analysis System for Precision Genome Assembly and Haploid-Resolved Structural Variation Discovery. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2019. v. 1129p. 97–118.

BOMPADRE, O.; ANDREY, G. Chromatin topology in development and disease. **Current Opinion in Genetics and Development** Elsevier Ltd, 1 abr. 2019.

BONORA, E. et al. Maternally inherited genetic variants of *CADPS2* are present in Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disability patients. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 6, p. 795–809, 14 jun. 2014.

BORG, K. et al. Molecular analysis of a constitutional complex genome rearrangement with 11 breakpoints involving chromosomes 3, 11, 12, and 21 and a ~0.5-Mb submicroscopic deletion in a patient with mild mental retardation. **Human Genetics**, Springer Verlag, 2005.

BOSFIELD, K.; DIAZ, J.; LEON, E. Pure Distal 7q Duplication: Describing a Macrocephalic Neurodevelopmental Syndrome, Case Report and Review of the Literature. **Molecular Syndromology**, v. 12, n. 3, p. 159–168, 2021.

BOUYAIN, S.; WATKINS, D. J. The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition

molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 6, p. 2443–2448, 9 fev. 2010.

CARVALHO, C. M. B.; LUPSKI, J. R. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. **Nature Reviews**, 1 abr. 2016.

CATUSI, I. et al. 8p23.2-pter microdeletions: Seven new cases narrowing the candidate region and review of the literature. **Genes**, v. 12, n. 5, 2021.

CHAN, S. et al. Structural variation detection and analysis using bionano optical mapping. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018a. v. 1833p. 193–203.

CHANG, Y. et al. Chromosomal microarray and whole-exome sequence analysis in Taiwanese patients with autism spectrum disorder. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 7, n. 12, 8 dez. 2019.

CHAPMAN, N. H. et al. Whole exome sequencing in extended families with autism spectrum disorder implicates four candidate genes. **Human Genetics**, v. 134, n. 10, p. 1055–1068, 24 out. 2015.

CHEN, L. et al. Genome Architecture and Its Roles in Human Copy Number Variation. **Genomics & Informatics**, v. 12, n. 4, p. 136, 2014.

CHEUNG, C. H. A. et al. Anti-apoptotic proteins in the autophagic world: an update on functions of XIAP, Survivin, and BRUCE. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 31, 5 dez. 2020.

CHEUNG, S. W.; BI, W. Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Taylor and Francis Ltd, 3 jun. 2018.

CHIEN, W. H. et al. Identification and molecular characterization of two novel chromosomal deletions associated with autism. **Clinical Genetics**, v. 78, n. 5, p. 449–456, nov. 2010.

CORRÊA, T. et al. Cytogenomic Integrative Network Analysis of the Critical Region Associated with Wolf-Hirschhorn Syndrome. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

CRESSANT, A. et al. Loss-of-function of PTPR γ and ζ , observed in sporadic schizophrenia, causes brain region-specific deregulation of monoamine levels and altered behavior in mice. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 4, p. 575–587, 26 fev. 2017.

DAI, P. et al. Evaluation of optical genome mapping for detecting chromosomal translocation in clinical cytogenetics. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 10, n. 6, 6 jun. 2022.

DANG, V. T. et al. Identification of human haploinsufficient genes and their genomic proximity to segmental duplications. **European Journal of Human Genetics**, v. 16, n. 11, p. 1350–1357, 2008.

DEMIRHAN, O.; TAŞTEMİR, D. Chromosome aberrations in a schizophrenia population. **Schizophrenia Research**, v. 65, n. 1, p. 1–7, dez. 2003.

DOLAN, M. The role of the giemsa stain in cytogenetics. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 86, n. 2, p. 94–97, abr. 2011.

DUPLOMB, L. et al. Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 9, p. 2391–2399, 1 maio 2014.

DREWS, F. et al. Disruption of the latent transforming growth factor- β binding protein-1 gene causes alteration in facial structure and influences TGF- β bioavailability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 1, p. 34–48, jan. 2008.

ESMAEELI-NIEH, S. et al. BOD1 Is Required for Cognitive Function in Humans and Drosophila. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 5, p. e1006022, 11 maio 2016.

ESCARAMÍS, G.; DOCAMPO, E.; RABIONET, R. A decade of structural variants: Description, history and methods to detect structural variation. **Briefings in Functional Genomics**, v. 14, n. 5, p. 305–314, 1 set. 2015.

FANNEMEL, M. et al. Haploinsufficiency of XPO1 and USP34 by a de novo 230 kb deletion in 2p15, in a patient with mild intellectual disability and cranio-facial dysmorphisms. **European Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 9, p. 513–519, set. 2014.

FERREIRA, D. M. S. et al. LIM and cysteine-rich domains 1 (LMCD1) regulates skeletal muscle hypertrophy, calcium handling, and force. **Skeletal Muscle**, v. 9, n. 1, p. 26, 31 dez. 2019.

FISHER, N. M. et al. A GRM7 mutation associated with developmental delay reduces mGlu7 expression and produces neurological phenotypes. **JCI Insight**, 21 jan. 2021.

FEDOSEIENKO, A.; BARTUZI, P.; VAN DE SLUIS, B. Functional understanding of the versatile protein copper metabolism MURR1 domain 1 (COMMD1) in copper homeostasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1314, n. 1, p. 6–14, 2014.

FRØLAND, A.; HOLST, G.; TERSLEV, E. Multiple Anomalies Associated with an Extra Small Autosome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 2, n. 2–3, p. 99–106, 1963.

GABELLINI, C. et al. CRISPR/Cas9-Induced Inactivation of the Autism-Risk Gene *setd5* Leads to Social Impairments in Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 167, 22 dez. 2022.

GE, C.; CHE, L.; DU, C. The UBC Domain Is Required for BRUCE to Promote BRIT1/MCPH1 Function in DSB Signaling and Repair Post Formation of BRUCE-USP8-BRIT1 Complex. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144957, 18 dez. 2015.

GOLDENBERG, P. An update on common chromosome microdeletion and microduplication syndromes. **Pediatric Annals**, v. 47, n. 5, p. e198–e203, maio 2018.

GORDEEVA, V.; SHAROVA, E.; ARAPIDI, G. Progress in Methods for Copy Number Variation Profiling. *International Journal of Molecular Sciences*, fev. 2022.

GRANADA, I. et al. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, set. 2020.

GRAVHOLT, C. H. et al. Turner syndrome: mechanisms and management. **Nature Reviews Endocrinology**, out. 2019.

HABIB, W. A. et al. Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-IGF2 pathway causes fetal growth restriction. **Genetics in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 250–258, 1 fev. 2018.

HAREL, T.; LUPSKI, J. R. Genomic disorders 20 years on—mechanisms for clinical manifestations. **Clinical Genetics**, mar. 2018.

HAREWOOD, L.; FRASER, P. The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. R1, 2014.

HASHEMZADEH-CHALESHTORI, M. et al. Small supernumerary marker chromosomes and their correlation with specific syndromes. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, n. 1, p. 140, 2015.

HASTINGS, P. J.; IRA, G.; LUPSKI, J. R. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. **PLoS Genetics**, jan. 2009.

HELDT, F. et al. 12q14 microdeletion syndrome: A family with short stature and Silver-Russell syndrome (SRS)-like phenotype and review of the literature. **European Journal of Medical Genetics**, v. 61, n. 8, p. 421–427, 1 ago. 2018.

HOCHSTENBACH, R. et al. Multiple Small Supernumerary Marker Chromosomes Resulting from Maternal Meiosis I or II Errors. **Molecular Syndromology**, v. 6, n. 5, p. 210–211, 1 dez. 2015.

HU, Q.; MAURAI, E. G.; LY, P. Cellular and genomic approaches for exploring structural chromosomal rearrangements. **Chromosome Research** mar. 2020.

HUANG, H.; CHEN, J. Chromosome bandings. **Methods in Molecular Biology**, v. 1541, p. 59–66, 2017.

HÜBNER, C. et al. HMGA2 variants in Silver-Russell syndrome: homozygous and heterozygous occurrence. 2020.

IBRAHIM, D. M.; MUNDLOS, S. Three-dimensional chromatin in disease: What holds us together and what drives us apart? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 64, p. 1–9, jun. 2020.

ISHIDA, M. New developments in Silver–Russell syndrome and implications for clinical practice. **Epigenomics**, v. 8, n. 4, p. 563–580, abr. 2016.

JACKSON, M. et al. **The genetic basis of disease. Essays in Biochemistry** Portland Press Ltd, , 3 dez. 2018.

KAIZUKA, T.; TAKUMI, T. Postsynaptic density proteins and their involvement in neurodevelopmental disorders. **Journal of Biochemistry**, v. 163, n. 6, p. 447–455, 1 jun. 2018.

KANG, Z. J. et al. **The philadelphia chromosome in leukemogenesis. Chinese Journal of Cancer** BioMed Central Ltd., , 27 maio 2016.

KASER, D. The Status of Genetic Screening in Recurrent Pregnancy Loss. **Obstetrics and Gynecology**, mar. 2018.

LAMPRIANOU, S. et al. A complex between contactin-1 and the protein tyrosine phosphatase PTPRZ controls the development of oligodendrocyte precursor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 42, p. 17498–17503, 18 out. 2011.

LAUER, S.; GRESHAM, D. An evolving view of copy number variants. **Current Genetics** Springer Verlag, dez. 2019.

LEIBOWITZ, M. L.; ZHANG, C. Z.; PELLMAN, D. Chromothripsis: A New Mechanism for Rapid Karyotype Evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 49, p. 183–211, 23 nov. 2015.

LESZINSKI, G. S. et al. A case report and review of the literature indicate that HMGA2 should be added as a disease gene for Silver-Russell syndrome. **Gene**, v. 663, p. 110–114, 15 jul. 2018.

LÉVY, J. et al. Molecular and clinical delineation of 2p15p16.1 microdeletion syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 173, n. 8, p. 2081–2087, ago. 2017.

LIEHR, T. et al. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, abr. 2013.

LIEHR, T.; CLAUSSEN, U.; STARKE, H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. **Cytogenetic and Genome Research**, 2004.

LIU, T. et al. Fetus of 8q22.2q24.3 duplication and 13q33.2q34 deletion derived from a maternal balanced translocation. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 46, n. 9, p. 1900–1906, 8 set. 2020.

LIU, X. et al. Function of FEZF1 during early neural differentiation of human embryonic stem cells. **Science China Life Sciences**, v. 61, n. 1, p. 35–45, 2 jan. 2018.

LOGSDON, G. A.; VOLLGER, M. R.; EICHLER, E. E. Long-read human genome sequencing and its applications. **Nature Reviews Genetics**, out. 2020.

LORY, P.; NICOLE, S.; MONTEIL, A. Neuronal Cav3 channelopathies: recent progress and perspectives. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 472, n. 7, p. 831–844, 7 jul. 2020.

LOZANO, R. et al. FOXP1 syndrome: a review of the literature and practice parameters for medical assessment and monitoring. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 13, n. 1, p. 18, 23 dez. 2021.

LUPIÁÑEZ, D. G.; SPIELMANN, M.; MUNDLOS, S. Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. **Trends in Genetics**, abr. 2016.

LUPSKI, J. R. Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, jun. 2015.

MALVESTITI, F. et al. De novo small supernumerary marker chromosomes detected on 143000 consecutive prenatal diagnoses: Chromosomal distribution, frequencies, and characterization combining molecular cytogenetics approaches. **Prenatal Diagnosis**, v. 34, n. 5, p. 460–468, 2014.

MARCOZZI, A.; PELLESTOR, F.; KLOOSTERMAN, W. P. The genomic characteristics and origin of chromothripsis. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2018. v. 1769p. 3–19.

MARI, F. et al. Refinement of the 12q14 microdeletion syndrome: Primordial dwarfism and developmental delay with or without osteopoikilosis. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 9, p. 1141–1147, 2009.

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, p. 309–326, 24 ago. 2015.

MCCORD, R. P.; BALAJEE, A. 3D genome organization influences the chromosome translocation pattern. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2018. v. 1044p. 113–133.

MCVEY, M.; LEE, S. E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. **Trends in Genetics**, nov. 2008.

MERTENS, F.; JOHANSSON, B.; MITELRNAN, F. **Isochromosomes in NeoplasiaGENES, CHROMOSOMES & CANCER**. [s.l.: s.n.].

MICELI, M. et al. Trait – driven analysis of the 2p15p16.1 microdeletion syndrome suggests a complex pattern of interactions between candidate genes. **Genes & Genomics**, v. 45, n. 4, p. 491–505, 20 abr. 2023.

MIGA, K. H. Centromere studies in the era of 'telomere-to-telomere' genomics. **Experimental Cell Research**, 15 set. 2020.

MINOCHERHOMJI, S. et al. Sequence and expression analysis of gaps in human chromosome 20. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 14, p. 6660–6672, ago. 2012.

MONTAZERINEZHAD, S.; EMAMJOMEH, A.; HAJIEGHRARI, B. Chromosomal abnormality, laboratory techniques, tools and databases in molecular Cytogenetics. **Molecular Biology Reports**, nov. 2020.

MOREIRA, A. et al. Abnormal bone mineral content and density in people with tetrasomy 18p. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 3, p. 417–422, 13 mar. 2019.

MORIN, S. J. et al. Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. **Fertility and Sterility**, jan. 2017.

NAGAI, K.; FUJII, M.; KITAZUME, S. Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type Z in Central Nervous System Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4414, 16 abr. 2022.

NEWMAN, S. et al. Next-generation sequencing of duplication CNVs reveals that most are tandem and some create fusion genes at breakpoints. **American Journal of Human Genetics**, v. 96, n. 2, p. 208–220, 5 fev. 2015.

NUR, B. G. et al. The clinical spectrum of a rare chromosomal abnormality: Isochromosome 18p. **Genetic counseling (Geneva, Switzerland)**, v. 27, n. 2, p. 223–31, 2016.

NURK, S. et al. The complete sequence of a human genome. **Science**, 376,44-53(2022).

OKUMU, D. O. et al. BIRC6 mediates imatinib resistance independently of Mcl-1. **PLOS ONE**, v. 12, n. 5, p. e0177871, 16 maio 2017.

PANAGOPOULOS, I. et al. Rearrangement of chromosome bands 12q14~15 causing HMGA2-SOX5 gene fusion and HMGA2 expression in extraskeletal osteochondroma. **Oncology Reports**, v. 34, n. 2, p. 577–584, ago. 2015.

PAPADIMITRIOU, E.; KANELLOPOULOU, V. K. Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Zeta 1 as a Potential Target in Cancer Therapy and Diagnosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8093, 30 abr. 2023.

PAREEK, C. S.; SMO CZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, nov. 2011.

PARENTI, I. et al. Neurodevelopmental Disorders: From Genetics to Functional Pathways. **Trends in Neurosciences**, ago. 2020.

PARISI, S. et al. HMGA proteins in stemness and differentiation of embryonic and adult stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, jan. 2020.

PAVONE, P. et al. 7q31.32 partial duplication: First report of a child with dysmorphism, autistic spectrum disorder, moderate intellectual disability and, epilepsy. Literature review. **Epilepsy Research**, v. 158, p. 106223, dez. 2019.

PELLESTOR, F.; GATINOIS, V. Chromoanagenesis: A piece of the macroevolution scenario. **Molecular Cytogenetics**, jan. 2020.

POTTIE, L. et al. Bi-allelic premature truncating variants in LTBP1 cause cutis laxa syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v. 108, n. 6, p. 1095–1114, jun. 2021.

POSZEWIECKA, B. et al. TADeus2: a web server facilitating the clinical diagnosis by pathogenicity assessment of structural variations disarranging 3D chromatin structure. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, p. W744–W752, 5 jul. 2022.

PRISTYAZHNYUK, I. E.; MENZOROV, A. G. Ring chromosomes: from formation to clinical potential. **Protoplasma**, mar. 2018.

PUIG, M. et al. Human inversions and their functional consequences. **Briefings in Functional Genomics**, v. 14, n. 5, p. 369–379, 1 set. 2015.

QUINLAN, A. R.; HALL, I. M. Characterizing complex structural variation in germline and somatic genomes. **Trends in Genetics**, jan. 2012.

QUIÑONES-PÉREZ, B. et al. Three-generation family with novel contiguous gene deletion on chromosome 2p22 associated with thoracic aortic aneurysm syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 3, p. 560–569, mar. 2018.

RAJESH, H.; FRECKMANN, M. L.; CHAPMAN, M. Azoospermia and paternal autosomal ring chromosomes: Case report and literature review. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 4, p. 466–470, 2011.

RAMASWAMI, G.; GESCHWIND, D. H. Genetics of autism spectrum disorder. Em: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 147p. 321–329.

RAO, K. P.; BELOGOLOVKIN, V. **Marker Chromosomes. Fetal and Pediatric Pathology**, abr. 2012.

RECALCATI, M. P. et al. Molecular cytogenetics characterization of seven small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 19: Genotype-phenotype correlation and review of the literature. **European Journal of Medical Genetics**, v. 61, n. 3, p. 173–180, mar. 2018.

REDDY, K. S. et al. A systematic analysis of small supernumerary marker chromosomes using array CGH exposes unexpected complexity. **Genetics in Medicine**, jan. 2013.

REN, H. et al. BAC-based PCR fragment microarray: High-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints. **Human Mutation**, v. 25, n. 5, p. 476–482, maio 2005.

RODRIGUES, J. M. et al. Cohen Syndrome: Review of the Literature. **Cureus**, 18 set. 2018.

ROMERO, D. M. et al. Novel role of the synaptic scaffold protein Dlgap4 in ventricular surface integrity and neuronal migration during cortical development. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

Saal HM, Harbison MD, Netchine I, Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA. **Silver-Russell Syndrome**; 2002.

SAHAJPAL, N. S. et al. Optical genome mapping as a next-generation cytogenomic tool for detection of structural and copy number variations for prenatal genomic analyses. **Genes**, mar. 2021.

SALEM, H. et al. Nek7 kinase targeting leads to early mortality, cytokinesis disturbance and polyploidy. **Oncogene**, v. 29, n. 28, p. 4046–4057, 15 jul. 2010.

SAKOFISKY, C. J.; MALKOVA, A. Break induced replication in eukaryotes: mechanisms, functions, and consequences. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, jul. 2017.

SANTACROCE, R. et al. The first case of a small supernumerary marker chromosome derived from chromosome 10 in an adult woman with an apparently normal phenotype. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 61, n. 6, p. 398–402, 2 nov. 2015.

SCHLEICHER, K. et al. The Ndc80 complex targets Bod1 to human mitotic kinetochores. **Open Biology**, v. 7, n. 11, p. 170099, 15 nov. 2017.

SCHOB, C. et al. Cognitive impairment and autistic-like behaviour in SAPAP4-deficient mice. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

SEBOLD, C. et al. Tetrasomy 18p: Report of the molecular and clinical findings of 43 individuals. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 152A, n. 9, p. 2164–2172, set. 2010.

SHI, Y.; SUN, X.; HE, X. Overexpression of Aristaless-Like Homeobox-4 Inhibits Proliferation, Invasion, and EMT in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 25, n. 1, p. 11–18, 2017.

SHINAWI, M.; CHEUNG, S. W. The array CGH and its clinical applications. **Drug Discovery Today**, set. 2008.

SIMPSON, B. S. et al. Genetic alterations in the 3q26.31-32 locus confer an aggressive prostate cancer phenotype. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, 1 dez. 2020.

SONG, J. et al. Pathogenic *GRM7* Mutations Associated with Neurodevelopmental Disorders Impair Axon Outgrowth and Presynaptic Terminal Development. **The Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 11, p. 2344–2359, 17 mar. 2021.

SPIELMANN, M.; LUPIÁÑEZ, D. G.; MUNDLOS, S. Structural variation in the 3D genome. **Nature Reviews Genetics**, jul. 2018.

SPITERI, B. S.; STAFRACE, Y.; CALLEJA-AGIUS, J. Silver-Russell syndrome: A review. **Neonatal Network**, v. 36, n. 4, p. 206–212, 2017.

SPITTEL, H. et al. Mitotic stability of small supernumerary marker chromosomes: A study based on 93 immortalized cell lines. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 142, n. 3, p. 151–160, 2014.

SU, L.; DENG, Z.; LENG, F. The mammalian high mobility group protein at-hook 2 (HMGA2): Biochemical and biophysical properties, and its association with adipogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, maio. 2020.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. What makes a centromere? **Experimental Cell Research**, v. 389, n. 2, 15 abr. 2020.

TANGA, N. et al. Behavioral and neurological analyses of adult mice carrying null and distinct loss-of-receptor function mutations in protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ). **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. e0217880, 13 jun. 2019.

TOM TANG, Y. et al. Tafa: a novel secreted family with conserved cysteine residues and restricted expression in the brain. **Genomics**, v. 83, n. 4, p. 727–734, abr. 2004.

TOPS, S.; HABEL, U.; RADKE, S. Genetic and epigenetic regulatory mechanisms of the oxytocin receptor gene (OXTR) and the (clinical) implications for social behavior. **Hormones and Behavior**, v. 108, p. 84–93, fev. 2019.

USHER, C. L.; MCCARROLL, S. A. Complex and multi-allelic copy number variation in human disease. **Briefings in Functional Genomics**, v. 14, n. 5, p. 329–338, 1 set. 2015.

VADO, Y. et al. Novel variant in *PLAG1* in a familial case with silver–Russell syndrome suspicion. **Genes**, v. 11, n. 12, p. 1–9, 1 dez. 2020.

VANDEWEYER, G.; KOOY, R. F. Detection and interpretation of genomic structural variation in health and disease. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, jan. 2013.

VIGNALI, R.; MARRACCI, S. HMGA genes and proteins in development and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, jan. 2020.

VORSANOVA, S. G. et al. Variability in the heterochromatin regions of the chromosomes and chromosomal anomalies in children with autism: Identification of genetic markers of autistic spectrum disorders. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 37, n. 6, p. 553–558, jul. 2007.

WAWRUK, Halinna Dornelles. Caracterização de rearranjos cromossômicos e sua relação com quadros clínicos. 2019. 143 f., il. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

WECKSELBLATT, B.; RUDD, M. K. Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. **Trends in Genetics** Elsevier Ltd, 1 out. 2015.

WEISKIRCHEN, R.; PENNING, L. C. COMMD1, a multi-potent intracellular protein involved in copper homeostasis, protein trafficking, inflammation, and

cancer. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** Elsevier GmbH, 1 maio 2021.

WEISCHENFELDT, J. et al. Phenotypic impact of genomic structural variation: Insights from and for human disease. **Nature Reviews Genetics**, fev. 2013.

WILCH, E. S.; MORTON, C. C. Historical and clinical perspectives on chromosomal translocations. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2018. v. 1044p. 1–14.

WILCOCK, A. R. et al. Deletion of Short Arm of No. 4 (4p-)-A Detailed Case Report. **Journal of Medical Genetics**, 1970.

WU, H. et al. Phenotype-to-genotype approach reveals head-circumference-associated genes in an autism spectrum disorder cohort. **Clinical Genetics**, v. 97, n. 2, p. 338–346, 14 fev. 2020.

YANG, L. A Practical Guide for Structural Variation Detection in the Human Genome. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 107, n. 1, 1 set. 2020.

YANG, N.; WU, S.; YAN, J. Structural variation in complex genome: detection, integration and function. **Science China Life Sciences**, v. 62, n. 8, p. 1098–1100, ago. 2019.

YLSTRA, B. et al. BAC to the future! Or oligonucleotides: A perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). **Nucleic Acids Research**, fev. 2006.

ZEPEDA-MENDOZA, C. J.; MORTON, C. C. The Iceberg under Water: Unexplored Complexity of Chromoanagenesis in Congenital Disorders. **American Journal of Human Genetics**, abr. 2019.

ZHAO, B. et al. The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, dez. 2020.

ZHU, J. et al. The Role of Formyl Peptide Receptors in Neurological Diseases via Regulating Inflammation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, 28 set. 2021.

ZHU, S. et al. Molecular Structure, Expression and Role of TAF4 and its Receptor FPR1 in the Spinal Cord. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 31 maio 2022.

13 Anexos

Anexo 1

Trabalhos publicados durante o período do doutorado referentes a outros projetos e colaborações.

- Artigo resultado da pesquisa de mestrado realizada entre 2016 e 2018.

Molecular
Syndromology

Original Article

Mol Syndromol 2022;13:290–304
DOI: 10.1159/000518872

Received: March 16, 2021
Accepted: August 3, 2021
Published online: February 11, 2022

Characterization of Associated Nonclassical Phenotypes in Patients with Deletion in the WAGR Region Identified by Chromosomal Microarray: New Insights and Literature Review

Vanessa Sodré de Souza^{a,b} Gabriela Corassa Rodrigues da Cunha^{a,b} Beatriz R. Versiani^{c,d}
Claudiner Pereira de Oliveira^{c,d} Maria Teresa Alves Silva Rosa^{d,e} Silviene F. de Oliveira^{a,b,f}
Patricia N. Moretti^e Juliana F. Mazzeu^{b,e,g} Aline Pic-Taylor^{a,b,e,f}

^aPrograma de P s-gradua o em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^bPrograma de P s-gradua o em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^cHospital de Apoio de Brasília, Secretária de Estado de Saúde do Distrito Federal, Brasília, Brazil; ^dHospital Universitário, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^ePrograma de P s-gradua o em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^fDepartamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil; ^gFaculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

➤ Artigos publicados através da colaboração pelo SCOURGE Cohort Group.

OXFORD

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddac132>
Advance access publication date 16 June 2022
Original Article

Novel genes and sex differences in COVID-19 severity

Raquel Cruz^{1,2,3,4,1}, Silvia Diz-de Almeida^{4,1}, Miguel López de Heredia⁴, Inés Quintela⁴, Francisco C. Ceballos⁵, Guillermo Pita⁶, José M. Lorenzo-Salazar⁷, Rafaela González-Montelongo⁷, Manuela Gago-Domínguez^{8,1}, Marta Sevilla Porras^{2,9}, Jair Antonio Tenorio Castaño^{7,9,10}, Julian Nevado^{7,9,10}, Jose María Aguado^{11,12,13,14}, Carlos Aguilar¹⁵, Sergio Aguilera-Albasa^{16,17}, Virginia Almadana¹⁸, Berta Almoguera^{19,2}, Nuria Alvarez⁴, Álvaro Andreu-Bembabeu^{20,11}, Eunata Arana-Arri^{21,22}, Celso Arango^{20,23,11}, María J. Arranz²⁴, María-Jesus Artiga²⁵, Raúl C. Baptista-Rosas^{26,27,28}, María Barreda-Sánchez^{29,30}, Moncef Belhassen-García^{31,32}, Joso F. Bezerra³³, Marcos A.C. Bezerra³⁴, Lucía Boix-Palop³⁵, María Brion^{36,37}, Ramón Brugada^{38,39,37,40}, Matilde Bustos⁴¹, Enrique J. Calderón^{42,43,44}, Cristina Carbonell^{45,32}, Luis Castano^{21,46,2,47,48}, Jose E. Castela⁴⁹, Rosa Conde-Vicente⁵⁰, M. Lourdes Cordero-Lorenzana⁵¹, Jose L. Cortes-Sanchez^{52,53}, Marta Corton^{53,2}, M. Teresa Darnaude⁵⁴, Alba De Martino-Rodriguez^{55,56}, Victor del Campo-Pérez⁵⁷, Aranzazu Díaz de Bustamante⁵⁴, Elena Domínguez-Garrido⁵⁸, Andre D. Luchessi⁵⁹, Rocío Eiros⁶⁰, Gladys Mercedes Estigarribia Sanabria⁶¹, María Carmen Fariñas^{62,63,64}, Uxia Fernández-Robelo⁶⁵, Amanda Fernández-Rodríguez^{5,14}, Tania Fernández-Villa⁶⁶, Belén Gil-Fournier⁶⁷, Javier Gómez-Arre^{68,56}, Beatriz González Álvarez^{55,56}, Ferman Gonzalez Bernaldo de Quirós⁶⁸, Javier González-Peñas^{20,11,23}, Juan F. Gutiérrez-Sautista⁶⁹, María José Herrero^{70,71}, Antonio Herrero-Gonzalez⁷², María A. Jimenez-Sousa^{5,14}, María Claudia Latig^{73,74}, Anabel Liger Borja⁷⁵, Rosario Lopez-Rodríguez^{19,2}, Esther Mancebo^{76,77}, Caridad Martín-López⁷⁸, Vicente Martín^{78,41}, Oscar Martínez-Nieto^{79,74}, Iciar Martínez-Lopez^{80,81}, Michel F. Martinez-Resendez⁸², Angel Martínez-Pérez⁸², Juliana F. Mazzeo^{83,84,85}, Eleuterio Merayo Macías⁸⁶, Pablo Minguez^{19,2}, Victor Moreno Cuenda^{87,88}, Vivian N. Silbiger⁸⁹, Silviene F. Oliveira^{83,89,90,91,92}, Eva Ortega-Paino⁹³, Mara Parellada^{20,23,13}, Estela Paz-Artal^{76,77,93}, Ney P.C. Santos⁹⁴, Patricia Pérez-Matute⁹⁵, Patricia Pérez⁹⁶, M. Elena Pérez-Tomás⁷⁹, Teresa Peruchó⁹⁷, Mel Lina Pinsach-Abuin^{98,97}, Ericka N. Pompa-Mera⁹⁸, Gloria L. Porras-Hurtado⁹⁹, Aurora Pujol^{100,2,101}, Soraya Ramiro León⁶⁷, Salvador Resino^{5,14}, Marianne R. Fernandes^{34,102}, Emilio Rodríguez-Ruiz^{103,2}, Fernando Rodríguez-Artalejo^{104,105,43,106}, José A. Rodríguez-García¹⁰⁷, Francisco Ruiz Cabello^{69,108,109}, Javier Ruiz-Hornillos^{110,111,112}, Pablo Ryan^{113,114,115}, José Manuel Soria¹⁰, Juan Carlos Souto¹¹⁶, Eduardo Tamayo^{117,118}, Alvaro Tamayo-Velasco¹¹⁹, Juan Carlos Taracido-Fernandez⁷², Alejandro Teper¹²⁰, Lilian Torres-Tobar¹²¹, Miguel Urioste¹²², Juan Valencia-Ramos¹²³, Zuleima Yáñez¹²⁴, Ruth Zarate¹²⁵, Tomoko Nakanishi^{126,127,128,129,130}, Sara Pigazzini^{131,132}, Frauke Degenhardt^{133,134}, Guillaume Butler-Laporte^{135,136}, Douglas Maya-Miles^{136,137}, Luis Bujanda^{138,139}, Youssef Bouysran¹³⁹, Adriana Palom^{140,141,142}, David Ellinghaus^{143,133}, Manuel Martínez-Bueno¹⁴⁴, Selina Rolker¹⁴⁵, Sara Amitrano¹⁴⁶, Luisa Roade^{137,140,147}, Francesca Fava^{148,149,150}, Christoph D. Spinner¹⁵¹, Daniele Prati¹⁵², David Bernardo^{153,157}, Federico Garcia^{154,155}, Gilles Darcis^{156,157}, Israel Fernández-Cadenas¹⁵⁸, Jan Cato Holter^{159,160}, Jesus M. Banales^{161,137}, Robert Frithiof⁶⁷, Stefano Duga^{163,164}, Rosanna Asselta^{163,164}, Alexandre C. Pereira¹⁶⁵, Manuel Romero-Gómez^{136,137}, Beatriz Nafra-Jiménez¹⁶⁶, Johannes R. Hoy^{167,160,168}, Isabelle Migette^{169,170}, Alessandra Renieri^{148,149,150}, Anna M. Planas^{170,171}, Kerstin U. Ludwig¹⁴⁵, Maria Buti^{137,140,147}, Souda Rahmouni¹⁷², Marta E. Alarcón-Riquelme^{144,172}, Eva C. Schulte^{173,174,175}, Andre Franke^{133,134}, Tom H. Karlsen^{167,160,176}, Luca Valentini^{177,178}, Hugo Zeberg^{179,180}, Brent Richards^{181,128,182}, Andrea Ganna^{132,183}, Mercè Borda^{184,185}, Itziar de Rojas^{184,185}, Agustín Ruiz^{184,185}, Pascual Sánchez-Juan¹⁸⁶, Luis Miguel Real¹⁸⁷, SCOURGE Cohort Group, HOSTAGE Cohort Group, GRAACE Cohort Group, Encarna Guillen-Navarro^{29,188,189,190}, Carmen Ayuso^{19,2}, Anna González-Neira⁴, José A. Riancho^{62,63,64}, Augusto Rojas-Martínez¹⁹¹, Carlos Flores^{7,192,193,194,1}, Pablo Lapunzina^{7,9,10,1} and Angel Carracedo^{1,2,3,4,8,1}

Article

GWAS and meta-analysis identifies 49 genetic variants underlying critical COVID-19

<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06034-3>

Received: 22 November 2022

Accepted: 27 March 2023

Published online: 17 May 2023

Open access

 Check for updates

Erola Pairo-Castineira^{1,2,86,4}, Konrad Rawlik^{1,86,4}, Andrew D. Bretherick^{1,2,4}, Ting Qi^{8,6}, Yang Wu⁷, Isar Nassirif⁸, Glenn A. McConkey⁸, Marle Zechner^{1,3}, Lucija Klaric², Fiona Griffiths^{1,3}, Wilna Oosthuyzen^{1,3}, Athanasios Kousathanas⁹, Anne Richmond², Jonathan Millar^{1,3,11}, Clark D. Russell¹, Tomas Malinauskas⁸, Ryan Thwaites¹², Kirstie Morrice^{1,3}, Sean Keating¹¹, David Mastlove¹⁴, Allstar Nichol¹⁵, Malcolm G. Semple^{16,17}, Julian Knight⁸, Manu Shankar-Hari^{18,19}, Charlotte Summers¹⁹, Charles Hinds²⁰, Peter Horby²⁰, Lowell Ling²², Danny McAuley^{23,24}, Hugh Montgomery²⁵, Peter J. M. Openshaw^{12,26}, Colin Begg²⁷, Timothy Walsh¹¹, Albert Tenesa^{23,28}, Carlos Flores^{29,30,31,32}, José A. Riancho^{33,34,35}, Augusto Rojas-Martínez²⁶, Pablo Lapunzina^{33,38,39}, GenOMICC Investigators⁴⁰, SCOURGE Consortium⁴¹, ISARICC Investigators⁴², The 23andMe COVID-19 Team⁴³, Jian Yang⁴⁴, Chris P. Ponting⁴⁵, James F. Wilson⁴⁶, Veronique Vitart⁴⁷, Malak Abedalthagafi^{48,41}, Andre D. Luchessi^{42,45}, Esteban J. Parra⁴⁹, Raquel Cruz^{50,51}, Angel Carracedo^{52,53,54,55}, Angle Fawkes⁵⁶, Lee Murphy⁵⁷, Kathy Rowan⁵⁸, Alexandre C. Perelra⁵⁹, Andy Law⁶⁰, Benjamin Fairfax⁶¹, Sara Clahsey Hendry^{1,3} & J. Kenneth Battle^{1,2,3,11,12}

Critical illness in COVID-19 is an extreme and clinically homogeneous disease phenotype that we have previously shown¹ to be highly efficient for discovery of genetic associations². Despite the advanced stage of illness at presentation, we have shown that host genetics in patients who are critically ill with COVID-19 can identify immunomodulatory therapies with strong beneficial effects in this group³. Here we analyse 24,202 cases of COVID-19 with critical illness comprising a combination of microarray genotype and whole-genome sequencing data from cases of critical illness

ARTICLE OPEN



Psychiatric polygenic risk as a predictor of COVID-19 risk and severity: insight into the genetic overlap between schizophrenia and COVID-19

M. Alemany-Navarro^{1,2,3,4}, S. Diz-de Almeida^{2,5}, R. Cruz^{2,5}, J. A. Riancho^{6,7,8}, A. Rojas-Martinez⁹, P. Lapunzina^{5,10,11}, C. Flores^{12,13,14,15}, [Scourge Cohort Group](#) and A. Carracedo^{2,3,4,5}

© The Author(s) 2023

Despite the high contagion and mortality rates that have accompanied the coronavirus disease-19 (COVID-19) pandemic, the clinical presentation of the syndrome varies greatly from one individual to another. Potential host factors that accompany greater risk from COVID-19 have been sought and schizophrenia (SCZ) patients seem to present more severe COVID-19 than control counterparts, with certain gene expression similarities between psychiatric and COVID-19 patients reported. We used summary statistics from the last SCZ, bipolar disorder (BD), and depression (DEP) meta-analyses available on the Psychiatric Genomics Consortium webpage to calculate polygenic risk scores (PRSs) for a target sample of 11,977 COVID-19 cases and 5943 subjects with unknown COVID-19 status. Linkage disequilibrium score (LDSC) regression analysis was performed when positive associations were obtained from the PRS analysis. The SCZ PRS was a significant predictor in the case/control, symptomatic/asymptomatic, and hospitalization/no hospitalization analyses in the total and female samples; and of symptomatic/asymptomatic status in men. No significant associations were found for the BD or DEP PRS or in the LDSC regression analysis. SNP-based genetic risk for SCZ, but not for BD or DEP, may be associated with higher risk of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity, especially among women; however, predictive accuracy barely exceeded chance level. We believe that the inclusion of sexual loci and rare variations in the analysis of genomic overlap between SCZ and COVID-19 will help to elucidate the genetic commonalities between these conditions.

Translational Psychiatry (2023)13:189; <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02482-7>

Anexo II

Parecer Consubstanciado de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de rearranjos cromossômicos estruturais em pacientes com deficiência intelectual e malformações congênitas múltiplas

Pesquisador: Juliana Forte Mazzeu de Araújo

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

Versão: 3

CAAE: 19163919.9.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.739.096

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo descritivo, que procurará mapear rearranjos estruturais em uma amostra de conveniência de pacientes do Ambulatório de Doenças Genéticas do Hospital Universitário de Brasília, a fim de os correlacionar com fenótipos cognitivos e físicos deletérios.

Objetivo da Pesquisa:

A proponente lista três objetivos específicos:

1. Descrever e caracterizar fenotipicamente portadores de deficiência intelectual e malformações múltiplas.
2. Analisar as alterações estruturais, bem como sua origem e o conteúdo gênico, através de técnicas de citogenética clássica/molecular e sequenciamento.
3. Estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo dos segmentos cromossômicos envolvidos com quadro clínico dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A proponente lista como riscos apenas a dor e hematoma locais formados pela coleta de sangue periférico.

Os riscos de quebra de privacidade de dados das amostras armazenadas no biorepositório serão

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 3.733.096

Considerações Finais a critério do CEP:

Após análise do colegiado em reunião ordinária dia 27/11/2019, o parecer foi pela aprovação do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1303595.pdf	11/11/2019 18:01:25		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_Esclarecido.pdf	11/11/2019 17:52:47	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_13_a_17_anos.pdf	11/11/2019 17:52:32	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_10_a_12_anos.pdf	11/11/2019 17:52:16	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_6_a_9_anos.pdf	11/11/2019 17:51:41	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Carta_Comite.pdf	11/11/2019 17:48:51	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_amostras_biologicas.pdf	11/11/2019 17:40:10	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_.pdf	11/11/2019 16:26:11	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Acelto
Orçamento	Planilha.pdf	08/11/2019 10:38:19	Vanessa Sodré de Souza	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	08/11/2019 10:37:10	Vanessa Sodré de Souza	Acelto
Cronograma	Cronograma.pdf	08/11/2019 10:35:24	Vanessa Sodré de Souza	Acelto

Situação do Parecer:

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.733.096

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 02 de Dezembro de 2019

Assinado por:

Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br