

ROSANA SILVA FARIA

**Caracterização de cromossomos marcadores pela análise
cromossômica por microarray**

Brasília, 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROSANA SILVA FARIA

Caracterização de cromossomos marcadores pela análise cromossômica por microarray

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

Orientadora. Prof. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília

2015

ROSANA SILVA FARIA

Caracterização de cromossomos marcadores pela análise cromossômica por microarray

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

Aprovada em 26 de janeiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Universidade de Brasília

Prof. Dra. Aline Pic-Taylor.

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

PUC-GO

Agradecimentos

A Deus por ter me abençoado até aqui e ter feito grandes coisas por mim!

À minha orientadora, Juliana Forte Mazzeu de Araújo, meu primeiro contato em Brasília, pela oportunidade, orientação e compreensão.

Aos meus pais, Vandeir Gonçalves de Faria e Maria Lúcia Silva Faria e também aos meus irmãos Raquel, Mateus e Eduardo pelo amor e carinho para comigo e por sempre apoiarem meus estudos.

Ao meu marido Saulo Cruz Ferreira pelo apoio, compreensão e seu amor incondicional!

À Dra. Íris Ferrari por colaborar com as análises dos pacientes e pelo seu exemplo de vida.

À Dra. Suely Rodrigues dos Santos da Unirio, que cedeu algumas amostras que fizeram parte do estudo.

Aos companheiros do laboratório de genética que me ajudaram e me acolheram tão bem, aos técnicos Nilsa e Aluisio e a todos os estagiários que passaram pelo laboratório.

Aos colegas Claudiner Pereira de Oliveira e Raphael Bonadio pela realização dos experimentos de microarray.

As médicas Dra. Mara dos Santos Córdoba, Dra. Heloísa Safatle e Dra. Maria Teresa Rosa pelo atendimento dos pacientes e por sempre nos ajudar.

Aos pacientes e suas famílias por gentilmente concordarem em participar deste estudo.

As agencias de fomento à pesquisa por financiarem nossas pesquisas.

Meu agradecimento.

RESUMO

Os cromossomos marcadores são definidos como cromossomos estruturalmente anormais, exanuméricos e formados por reordenamentos complexos. Os fenótipos associados a um cromossomo marcador são muito variados, sendo os mais comuns deficiência intelectual, malformações e infertilidade. A variabilidade fenotípica pode ser explicada por diversos fatores, como diferentes graus de mosaicismo, conteúdo gênico da região adicional, cromossomo de origem e possibilidade de dissomia uniparental. O surgimento de novas técnicas para a investigação dos pontos de quebra tem permitido identificar os mecanismos envolvidos na formação dos rearranjos e correlacionar os rearranjos cromossômicos com as manifestações clínicas, sendo úteis para o diagnóstico, provendo informações relevantes para o prognóstico e contribuindo para a identificação de regiões candidatas. O objetivo deste estudo foi caracterizar cromossomos marcadores quanto à sua origem e conteúdo gênico por meio da análise cromossômica por microarray. Foram analisados nove pacientes que apresentaram cromossomos marcadores identificados pelo cariótipo com bandamento G e depois analisados por microarray. Em sete pacientes a análise por microarray permitiu a identificação do rearranjo: inv dup 15 (2 casos), tetrassomia 18p (2 casos), trissomia 9p, trissomia 21q, microduplicação 22q e perda de heterozigose na região pericentromérica do cromossomo 9. Dois pacientes não apresentaram alterações na análise cromossômica por microarray e, portanto o cromossomo marcador deve ser constituído apenas de heterocromatina. A análise por microarray permitiu a identificação do marcador em 78% dos casos além de ter permitido visualizar o rearranjo detalhadamente, revelando detalhes de sua complexidade que não seriam identificados por outras metodologias.

Palavras-chaves: cromossomo marcador; microarray; rearranjos cromossômicos.

ABSTRACT

Marker chromosomes are defined as being structurally abnormal, extranumerical and formed by complex rearrangements. There are several phenotypes associated with a marker chromosome. The most common ones are: intellectual disability, malformations, and human infertility. The phenotypic variability may be explained through several factors such as different degrees of mosaicism, gene content of the additional region, chromosomal origin and possibility of uniparental disomy. The development of new techniques for the investigation of breakpoint regions has enabled the identification of mechanisms involved in the formation of rearrangements, and correlation of chromosomal rearrangements to clinical manifestations, hence coming in handy for diagnosis, supplying relevant data for prognosis, and contributing to identifying candidate regions. This study aimed at characterizing the origin and gene content of marker chromosomes through chromosomal analysis with the use of microarray. A total of nine patients were analysed, all presenting marker chromosomes based on G-banding analysis, and latter microarray analysis. To seven, the microarray analyses allowed determination of the rearrangement: inv dup 15 (2 cases), tetrasomy 18p (2 cases), trisomy 9p, trisomy 21q, microduplication 22p and loss of heterozygosity in the pericentromeric region of chromosome 9. Two patients did not present alterations in chromosomal analysis by microarray, which meant that the marker chromosome probably originated from heterochromatin. Chromosome microarray analysis allowed the identification of the rearrangement in 78% of the cases allowing a detailed visualization of the rearrangement and revealing details of its complexity that would not be identified by other methods.

Key-Words: marker chromosome; microarray; chromosome rearrangements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da troca tipo U na meiose, um dos mecanismos de formação de um cromossomo marcador (adaptado de Liehr et. al., 2007).....	15
Figura 2. Segregação meiótica em um portador de translocação aparentemente balanceada; ocorrendo um erro do tipo 3:1 irá gerar dois tipos de gametas, um com dois cromossomos normais e um translocado. Se ocorrer fecundação desse gameta, o zigoto terá um par cromossômico A normal, um par cromossômico B normal e um cromossomo translocado. Retirado de Laus (2008).....	16
Figura 3. Paciente 1 aos sete anos apresentando dismorfias faciais.....	29
Figura 4. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan HD (Affymetrix) do paciente 1. O retângulo em azul representa o segmento alterado e a linha vermelha vertical indica o final da região de tetrassomia e início da trissomia em 15q11.2q13.3.....	30
Figura 5. Paciente 2 aos nove anos.....	30
Figura 6. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) da paciente 2. O retângulo em azul representa o segmento de tetrassomia 15q11.2q13.2.....	31
Figura 7. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) do paciente 3. O retângulo em azul representa o segmento de tetrassomia das regiões 18p11.32p11.31 e 18p11.31p11.21.....	33
Figura 8. Paciente 4 aos doze anos.....	34
Figura 9. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) do paciente 4. O retângulo em azul representa o segmento de tetrassomia da região 18p11.32q11.1.....	35
Figura 10. Paciente 5 aos onze anos.....	36

Figura 11. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) da paciente 5. Os dois retângulos em azul (linha 1) representam os segmentos triplicados em 9p24.3p24.2 e 9p13.3p13.1.....	37
Figura 12. Paciente 6 aos cinco anos.....	38
Figura 13. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) da paciente 6. O retângulo em azul (linha 1) representam o segmento duplicado em 22q11.21.....	39
Figura 14. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) da paciente 6, mostrando a perda de heterozigose da região pericentromérica do cromossomo 9.....	39
Figura 15. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) do paciente 7. O retângulo em azul representa o segmento de tetrassomia da região 21q22.11.....	41
Figura 16. Paciente 8 com um 1 e 4 meses.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pacientes que realizaram análise por array e seus respectivos resultados, incluindo a posição e região genômica, tamanho do rearranjo e a plataforma utilizada para o experimento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APBA2 – Amyloid beta a4 precursor, proteína de ligação Família A, Membro 2
Array-CGH – Array comparative genomic hybridization
ASD - Transtornos do espectro do autismo
AS - Síndrome de Angelman
ATP10A – ATPase, Classe V, Tipo 10A
BACs – Cromossomo Artificial de Bactéria
BPS – Breakpoints
CNVs - Variação de Número de Cópias
CYFIP1 – Cytoplasmic fmrp-interacting protein 1
CHRFAM7A – CHRNA7/FAM7A fusion gene
CMA – Microarray
C15orf2 – Nuclear pore associated protein 1
C21orf91 – Chromosome 21 open reading frame 91
DECIPHER – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans*
DGV - *Database of Genomic Variants*
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
FISH - Hibridação in situ fluorescente
GABRA5 – gamma-aminobutyric acid receptor, ALPHA-5
GABRB3 – gamma-aminobutyric acid receptor, BETA-3
GABRG3 – gamma-aminobutyric acid receptor, GAMMA-3
HERC2 – hect domain and rcc1-like domain 2
HUB – Hospital Universitário de Brasília
Inv dup – duplicação invertida
IPW – imprinted in Prader-Willi Syndrome
LCRs – região de baixo número de cópias
LOH – perda de heterozigose
MAGEL2 – MAGE-LIKE 2
MKRN3 – MKRN3 antisense RNA
NAHR – recombinação homóloga não alélica
NDN – NECDIN
NDNL2 – necdin-like GENE 2

NIPA1 – nonimprinted gene in Prader-willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 1PWS
NIPA2 – nonimprinted gene in Prader-willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 2

OCA2 – oculocutaneous albinism II

PAR1 – coagulation factor II receptor

PAR5 – Prader-Willi/Angelman Region RNA 5

PWRN1 – Prader-Willi Region Noncoding RNA 1

PWRN2 – Prader-Willi Region Noncoding RNA 2

SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SNRPN – small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N

SKY- Spectral Karyotyping

SYNJ1 – synaptojanin 1

TDAH - Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TJP1 – tight junction protein 1

TRPM1 – transient receptor potential cation channe, subfamília M, MEMBRO1

TUBGCP5 – Tubulin-gamma complex-associated protein 5

UBE3A – Ubiquitin-Protein Ligase E3A

VLDLR1 – Receptor de lipoproteína de baixa densidade

YACs – Cromossomo artificial de Levedura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 REARRANJOS INTERCROMOSSÔMICOS.....	12
1.2 REARRANJOS INTRACROMOSSÔMICOS.....	13
1.3 CROMOSSOMOS MARCADORES.....	14
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	22
3.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	22
3.3 MÉTODOS LABORATORIAIS.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO I.....	61

1. INTRODUÇÃO

As alterações cromossômicas apresentam-se como uma das principais causas de morbidade no homem. A frequência de anomalias cromossômicas ao nascimento é de aproximadamente seis para cada mil recém-nascidos. Estima-se que 60% dos abortos espontâneos no primeiro trimestre de gestação e 5% dos natimortos apresentem alguma anomalia cromossômica. As mais comuns são as aneuploidias, porém as alterações cromossômicas estruturais representam cerca de 40% das alterações cromossômicas em recém-nascidos (1).

As alterações cromossômicas estruturais são em sua maioria equilibradas e geralmente estão associadas a fenótipos normais, porém os portadores têm um risco aumentado de falha reprodutiva. A segregação meiótica dos cromossomos envolvidos nos rearranjos pode levar a produção de gametas com rearranjos estruturais não equilibrados aumentando a chance de abortamentos e de filhos com fenótipos alterados. Estudos de casais com história de abortamentos de repetição mostraram que em aproximadamente 4% dos casais, um dos membros possuía alteração cromossômica (2).

Os rearranjos cromossômicos podem ser classificados em intercromossômicos, quando envolvem mais de um cromossomo, ou em intracromossômicos quando há apenas um cromossomo envolvido no rearranjo.

1.1 REARRANJOS INTERCROMOSSÔMICOS

Os rearranjos intercromossômicos envolvem pelo menos dois cromossomos diferentes e podem envolver cromossomos homólogos. Estes incluem translocações Robertsonianas e translocações recíprocas (3).

Translocações Robertsonianas ocorrem quando há uma fusão entre cromossomos acrocêntricos, sendo os rearranjos recorrentes mais comuns, encontrados em um a cada 1000 indivíduos. Apesar de todas as combinações de

cromossomos acrocêntricos participarem das translocações Robertsonianas, a ocorrência destas translocações não é aleatória. Especificamente, rob (13q14q) e rob (14q21q) são as mais comuns, constituindo cerca de 85% de todas as translocações Robertsonianas (3).

As translocações recíprocas resultam de quebra de dois cromossomos, com trocas recíprocas de segmentos. As translocações recíprocas ocorrem em cerca de um em cada 625 indivíduos na população. A maioria das translocações recíprocas é considerada “única”, pois são encontradas apenas em membros de uma mesma família (3). Apesar dos portadores de translocações recíprocas balanceadas geralmente apresentarem fenótipos normais, seus filhos podem exibir uma trissomia parcial ou monossomia parcial e fenótipo alterado.

As translocações podem alterar a quantidade de material cromossômico, podendo envolver perda ou ganho de material genético, normalmente estão associadas a um fenótipo anormal, então considera ser uma translocação não equilibrada.

1.2 REARRANJOS INTRACROMOSSÔMICOS

Os rearranjos intracromossômicos são alterações citogenéticas que parecem envolver um único cromossomo. Estes incluem deleções intersticiais e terminais, duplicações, cromossomos marcadores, inversões e isocromossomos. Alguns rearranjos podem envolver um único cromossomo homólogo (trocas de cromátides irmãs) enquanto outros podem envolver ambos os cromossomos homólogos (recombinação entre homólogos) (3).

Nas duplicações, os segmentos duplicados podem estar localizados adjacentes um ao outro ou uma das cópias da região duplicada pode estar em sua posição normal e a outra em alguma outra parte do cromossomo.

As deleções são as anomalias estruturais mais comuns, sendo uma causa importante de deficiência intelectual e malformações (4). Nas deleções terminais os pontos de quebra que ocorrem nas bandas cromossômicas distais levam à perda de sequências terminais incluindo a região do telômero, porém a necessidade do

telômero para a estabilidade cromossômica pode justificar a presença de sequências teloméricas nas extremidades dos cromossomos com deleção terminal (3).

As inversões são rearranjos considerados equilibrados, em que ocorrem duas quebras em um cromossomo e essas quebras sofrem uma rotação de 180 graus antes da religação dos fragmentos. Normalmente não há perda ou ganho de material gênico, nem alterações no fenótipo, porém, o ponto de quebra pode afetar algum gene com função essencial levando a uma mutação.

1.3 CROMOSSOMOS MARCADORES

Os cromossomos marcadores são um grupo heterogêneo no que diz respeito aos seus efeitos clínicos, sua origem e sua estrutura cromossômica (5;6). São definidos como cromossomos estruturalmente anormais, que não podem ser definidos pela citogenética, são formados por reordenamentos complexos normalmente constituídos por heterocromatina centromérica, mas que podem conter genes. Os cromossomos marcadores mais comuns na população humana são aqueles derivados a partir dos cromossomos X, 15 e 22 (3).

Os cromossomos marcadores são encontrados em ~0,043% dos nascidos vivos, ~0,075% dos casos de pré-natal e são sete vezes mais prevalentes em pacientes com deficiência intelectual (7). Cerca de 77% dos cromossomos marcadores são *de novo* e 23% são herdados da mãe (16%) ou do pai (7%) (7). A maioria deles é proveniente dos braços curtos e regiões pericentroméricas dos cromossomos acrocêntricos, os derivados de autossomos não acrocêntricos são raros e correspondem a apenas ~15% de todos os marcadores (8). Cromossomos marcadores podem estar presentes em um cariótipo de 46 cromossomos, em um cariótipo numericamente anormal (como nas síndromes de Down ou Turner) ou em um cariótipo anormal, mas estruturalmente equilibrado (9).

Os estudos de caracterização dos cromossomos marcadores têm revelado diferentes mecanismos de formação dos cromossomos marcadores, incluindo resgate de trissomia funcional, erros pós-zigóticos e complementação gamética (10). Os cromossomos com duplicação invertida (*inv dup*) são os mais comumente

descritos na literatura e vários modelos de formação têm sido propostos, sendo o mais plausível a troca do tipo U na meiose, resultante de erros durante o *crossing-over* entre cromossomos homólogos, seguidos de não-disjunção na meiose I (11). A troca do tipo U também é proposta para a formação de marcadores do tipo isocromossomo com quebra no DNA centromérico (12). Este é um mecanismo mais geral de formação de isocromossomos presentes não só em células germinativas, mas também em células tumorais (13).

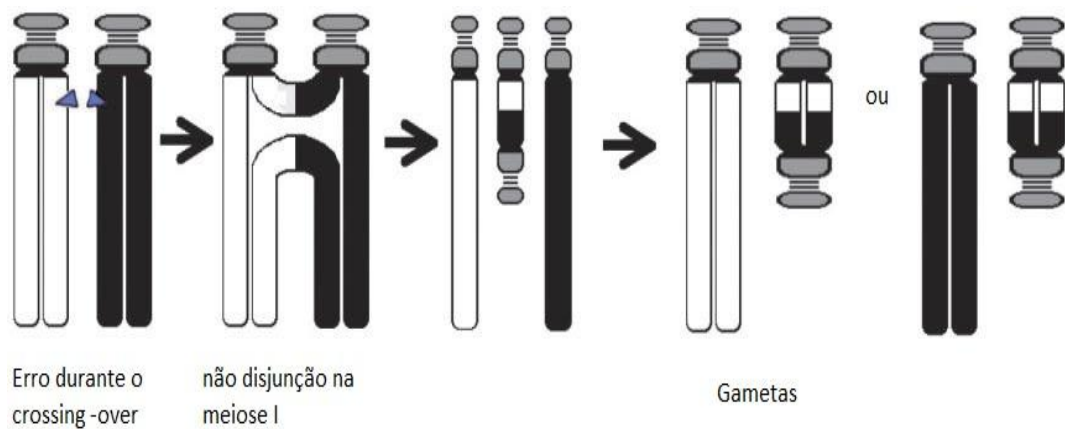


Figura 1. Esquema da troca tipo U na meiose, a não disjunção de cromossomos homólogos durante a meiose I dá origem a gametas que contém um cromossomo normal e outro alterado. O zigoto originado desses gametas possuirá um par cromossômico normal e um cromossomo marcador (adaptado de Liehr et. al., 2004).

Os cromossomos marcadores também podem ser derivados de translocações equilibradas de um dos pais, num processo de erro na segregação meiótica durante a formação dos gametas. Nesse processo ocorre erro de segregação 3:1 gerando gametas com a presença de cromossomo translocado extranumerário (14).

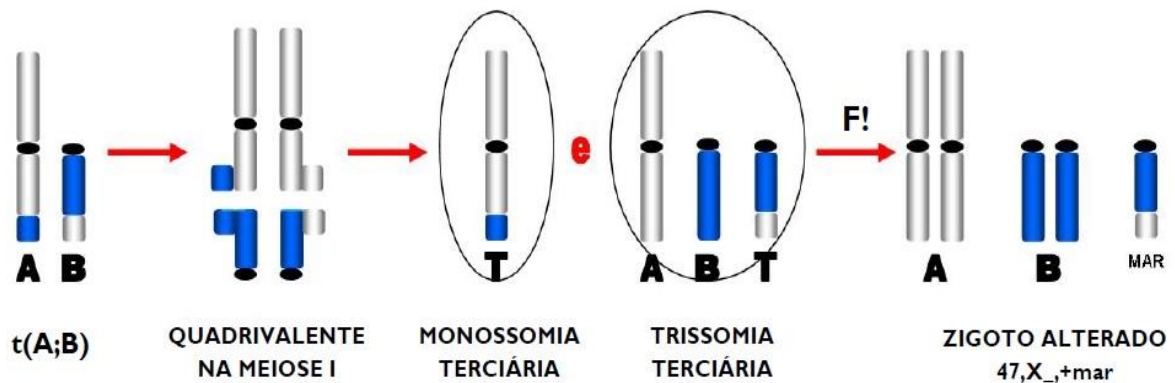


Figura 2. Segregação meiótica em um portador de translocação aparentemente balanceada; ocorrendo um erro do tipo 3:1 irá gerar dois tipos de gametas, um com dois cromossomos normais e um translocado. Se ocorrer fecundação desse gameta, o zigoto terá um par cromossômico A normal, um par cromossômico B normal e um cromossomo translocado. Retirado de Laus (2008).

Os cromossomos marcadores em anel ocorrem com uma frequência de 10% entre os cromossomos marcadores, sendo que em 60% dos casos foram observadas alterações fenotípicas nos pacientes (15;16). Vários mecanismos para a formação desse tipo de marcador foram postulados, podendo ser formados em associação com rearranjos cromossômicos complexos, envolver a deleção de uma parte do cromossomo, deixando dois fragmentos de cromossomo um dos quais forma um pequeno anel (17), no entanto os mecanismos de formação de alguns cromossomos marcadores em anel permanecem inexplicados.

Recentemente, números crescentes de cromossomos marcadores foram relatados com centrômeros que não continham DNA alfa-satélite detectável (9). Esses marcadores se originam de fragmentos acêntricos e contém Neo-Centrômeros que se formam em regiões contendo sequências que dividem alguma similaridade estrutural com a sequência centromérica original, mas seus mecanismos de formação ainda não são totalmente compreendidos (18). O desenvolvimento da maioria dos neo-centrômeros baseia-se na troca tipo U na meiose, o fragmento acêntrico formado durante uma troca tipo U, é incluído em um gameta, um neo-centrômero é ativado e novo cromossomo é distribuído nas células filhas. Esta teoria é apoiada pelo fato de que a frequência de cromossomos inv dup 15 é semelhante ao observado em cromossomos com neo-centrômero (8).

É difícil estabelecer uma relação precisa entre a presença do cromossomo marcador e o fenótipo do paciente. Estima-se que entre 14,7 % a 28, 6% de

portadores de cromossomo marcador apresentem fenótipo anormal (19;20). Mesmo em portadores assintomáticos, os marcadores podem afetar a gametogênese, interferindo na segregação normal dos cromossomos homólogos ou promovendo trocas cromossômicas, e assim comprometendo a viabilidade da progênie (21).

Os fenótipos associados à presença de um cromossomo marcador variam enormemente, desde o normal até gravemente afetado (22), os fenótipos mais comuns são: deficiência intelectual, convulsões, características autistas e atraso de crescimento. Essa variabilidade pode ser explicada por diversos fatores, como diferentes graus de mosaicismo, conteúdo gênico da região adicional, cromossomo de origem e possibilidade de dissomia uniparental.

O mosaicismo somático está presente em ~50% dos casos de cromossomo marcador. A maioria dos casos de mosaicismo parece não ter qualquer efeito clínico direto, mas há também casos na literatura em que o grau de mosaicismo parece alterar o fenótipo (23). O mosaicismo é clinicamente importante pelo fato de que um cromossomo marcador de novo, mesmo presente em mosaico pode ser indício de dissomia uniparental (UPD).

A dissomia uniparental caracteriza-se pela herança de dois cromossomos homólogos a partir de apenas um dos genitores e pode ocorrer em casos de cromossomos marcadores. Prever os efeitos fenotípicos da dissomia uniparental é muito complexo, mas para alguns cromossomos (6, 7, 11, 14, 15 e 20) foi demonstrado que a dissomia uniparental pode resultar em anomalias no indivíduo (9).

A correlação de cromossomos marcadores específicos com diferentes quadros clínicos foi possível para algumas síndromes, por exemplo: síndrome de Pallister-Killian, que resulta da tetrassomia do braço curto do cromossomo 12 marcador isocromossomo i(12p); síndrome do olho de gato que é caracterizada pela presença de cromossomo marcador derivado da duplicação invertida do braço curto e região proximal do braço longo do cromossomo 22 (invdup 22pter-22q11.2) e a síndrome i(18p) que é caracterizada pela presença de marcador isocromossomo derivado do cromossomo 18 [i(18p)], que leva à tetrassomia do braço curto desse cromossomo.

Os cromossomos marcadores não podem ser identificados ou caracterizados de forma inequívoca pela citogenética convencional, pois são em geral do tamanho

ou menor do que um cromossomo 20 de uma metáfase (9). A descrição e a caracterização dos cromossomos marcadores podem fornecer informações valiosas para o aconselhamento genético, mas sua extrema heterogeneidade em tamanho, estrutura e origem cromossômica resultou na caracterização limitada de muitos marcadores em laboratório clínicos (6). Normalmente os cromossomos marcadores são detectados pela citogenética por bandamento G em pacientes com deficiência intelectual e/ou malformações congênitas, em pessoas sub-férteis ou no diagnóstico pré-natal. No entanto, outras metodologias como o FISH (Hibridação *in situ* fluorescente) e a análise cromossômica por microarray são necessárias para a caracterização do rearranjo em termos de origem cromossômica, conteúdo gênico, dissomia uniparental e outros desequilíbrios concomitantes em outras partes do genoma (8).

Por serem frequentemente complexos os marcadores exigem uma investigação rigorosa; os métodos de citogenética clássica como bandas G, C e AgNOR fornecem informações sobre características morfológicas e estruturais, presença de mosaicismo, presença de centrômero, se a origem é de cromossomo acrocêntrico, se é um cromossomo em anel ou um marcador, porém as técnicas de bandamento aplicadas a cromossomos metafásicos/prometafásicos permitem a detecção de alterações cromossômicas que afetam no mínimo 5 a 10 Mb.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) aumentou as possibilidades de análise de aberrações cromossômicas não identificáveis pelas técnicas de bandamento. O método consiste no anelamento específico entre uma sonda de oligonucleotídeos com a marcação fluorescente e sequências de ácido nucleicos pertencentes à amostra analisada. Possibilita a detecção de sequências específicas de DNA e RNA em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos (24). A detecção de sequências de cópia única pode ser feita com sondas de DNA clonadas em plasmídeos, cosmídeos, fagos, BACs ou YACs. É aplicada no mapeamento físico de sequências de DNA, detecção de rearranjos diminutos, caracterização mais precisa de rearranjos cromossômicos de uma forma geral bem como para a validação dos dados obtidos pela análise cromossômica por microarray.

A técnica de FISH pode ser utilizada para determinar a composição dos cromossomos marcadores e para a identificação do centrômero. (8). Porém a técnica de FISH é demorada e pode resultar em uma classificação ambígua ou má

classificação para o marcador; se foi realmente constituído apenas por heterocromatina ou contem material eucromático com genes sensíveis à dosagem (25).

Recentemente, a análise cromossômica por microarray (CMA) tem permitido detectar perdas e ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópios utilizando sondas de BACs ou oligonucleotídeos. A resolução do microarray é determinada pelo tamanho e pela distância entre as sondas. Os primeiros arrays utilizavam sondas clonadas em BACs, mas as plataformas recentes utilizam como alvo de hibridização sondas de oligonucleotídeos que permitem maior cobertura genômica e uma resolução superior do que os arrays de BACs.

Ela tem o poder de detectar simultaneamente, num único ensaio, aneuploidias, deleções, duplicações e amplificações e é especialmente útil na identificação de novas doenças genômicas. Novas plataformas têm surgido mais recentemente que têm além de sondas para detecção de alterações do número de cópias, sondas de SNP permitindo detectar perda de heterozigose e determinação da origem parental dos rearranjos. Com o aumento do poder de detecção conferido pela CMA (elevou a resolução de megabase para kilobase), desequilíbrios cromossômicos não detectáveis pelas técnicas de bandamento passaram a ser descritos. Apesar de ser uma técnica relativamente cara seu custo é compensado pela elevada taxa de detecção de desequilíbrios submicroscópios.

A análise cromossômica por microarray é uma técnica eficiente e sensível para a detecção de alteração no número de cópias do genoma em alta resolução (26), pode determinar se o cromossomo marcador é constituído de eucromatina ou apenas de heterocromatina constitutiva e de qual cromossomo se originou, permite a caracterização e identificação dos pontos de quebra e determinação dos genes presentes no marcador o que pode permitir estabelecer correlação com o fenótipo do paciente (27). Além disso também identifica alterações em outras partes do genoma que não participam diretamente do rearranjo, uma vantagem em relação a técnica de FISH.

Além de perdas e ganhos de segmentos os *arrays* que possuem sondas de SNPs permitem detectar perdas de heterozigose; a determinação da heterozigose do par cromossômico que originou o marcador também é importante já que 5% dos

casos de marcadores cromossômicos estão relacionados com dissomia uniparental (28).

O surgimento de novas técnicas para a caracterização dos cromossomos marcadores tem permitido identificar os mecanismos envolvidos na formação dos rearranjos e correlacionar os rearranjos cromossômicos com as manifestações clínicas, sendo úteis para o diagnóstico, provendo informações relevantes para o prognóstico e contribuindo para a identificação de regiões candidatas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo caracterizar cromossomos marcadores quanto à sua origem e conteúdo gênico por meio da análise cromossômica por microarray.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a. Identificar e caracterizar cromossomos marcadores pela análise cromossômica por microarray.
- b. Relacionar os segmentos cromossômicos envolvidos com o quadro clínico dos pacientes.
- c. Avaliar a contribuição da análise cromossômica por microarray como método de estudo de cromossomos marcadores.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo retrospectivo com nove pacientes atendidos ou encaminhados para o Hospital Universitário de Brasília e Hospital de Apoio de Brasília ou para a UNIRIO cujo resultado de cariótipo por banda G revelou a presença de cromossomo marcador. Os pacientes concordaram em participar do estudo e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Fizeram parte deste estudo nove pacientes portadores de cromossomos marcadores com ou sem alterações fenotípicas

3.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pacientes, os pais ou responsáveis, antes de assinarem o termo, foram esclarecidos sobre o procedimento de retirada e o destino da amostra de sangue, sendo exposta de forma acessível a questão do sigilo sobre a identificação do paciente, e ainda a autorização para uso de fotos. Este estudo faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina sob o número (CEP-FM: 079/2009; 25/11/2009). O projeto contou com financiamento da FAPDF à orientadora no Edital PPSUS/2010.

3.3 MÉTODOS LABORATORIAIS

3.3.1 Avaliação Clínica e Coleta de Material

A anamnese e o exame clínico dos pacientes foram realizados por médicas geneticistas do ambulatório de genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB) ou pelos médicos que os encaminharam. Amostras de sangue periférico foram obtidas dos pacientes, em dois tubos, um com EDTA e outro com heparina. Essas amostras foram utilizadas para extração de DNA e obtenção de cultura temporária de células, respectivamente. Foram colhidas amostras de sangue periférico dos pais dos pacientes para a realização do exame de cariótipo por banda G.

3.3.2 Cultura de Linfócitos e Exame de Cariótipo

Com o sangue heparinizado foi realizada cultura de sangue total para realização do exame de cariótipo. O protocolo utilizado desenvolvido por Moorhead et al. em 1960 (com modificações) dura cerca 72h após incubação das amostras. Para o crescimento dos linfócitos foi misturado 1 mL de sangue total fresco a 8mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), 1,5 mL de soro fetal bovino, 300µL de Fitohemaglutinina, 100µL de antibiótico penicilina/ estreptomicina e 100 µL de L-Glutamina. Após mais ou menos 70h na estufa a 37°C adicionou-se 100 µL de Colchicina e retornou para a estufa por mais 45 min. a 37°C. Terminado o período de crescimento e feita a parada das células na metáfase foi realizada a fase de hipotonização. Foi transferido o material da estufa para dois tubos falcons deixando cada um com 5,5 mL que foram centrifugados por 6 min. a 2000 rotações por minuto (rpm). Após, foi retirado o sobrenadante e acrescentou-se aos poucos a solução de KCL a 37°C até completar 12 mL. Depois de bem homogeneizado foi colocado por 15 min. na estufa a 37°C. Da estufa seguiu para a centrifuga por 6 min a 2000 rpm. Depois foi retirado o sobrenadante deixando mais ou menos 2 mL. Para a Fixação foi utilizado a solução 1:3 de ácido acético e metanol, nessa fase foi colocado com

auxílio de vortex o fixador aos poucos até completar 10 mL. Foi homogeneizado e levado à centrifuga por 6 min a 2000 rpm. Retirado o sobrenadante foi repetido o processo de fixação por mais 4 vezes. O material pingado nas lâminas foi tratado por bandeamento G utilizando tripsina em solução salina e corado com Giemsa. O cariótipo foi analisado pela Professora Doutora Iris Ferrari do Laboratório de Genética Clínica da UnB e feito com auxílio de microscópio, sendo entregue resultado posteriormente a cada paciente.

Nos casos atendidos na UNIRIO, a cultura de células e análise foi realizada pela Dra. Suely Rodrigues dos Santos.

3.3.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir do sangue periférico pelo método Puregene – “*Salting out*”. Este método é dividido em etapas, sendo a primeira de lise celular, onde foi utilizado 5mM MgCl₂, 1mM EDTA pH 8,0 em uma reação e, 10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS em outra; para cada reação a solução foi centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos. Para a segunda etapa utilizou-se 1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular. Esta solução contém 7,5M de NH₄ Ac. Centrifugou-se a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formam um *pellet* marrom escuro e compacto.

Na etapa de precipitação de DNA, o sobrenadante foi transferido para um tubo *falcon* contendo 3ml de isopropanol. O tubo foi invertido lentamente até que se formasse um novelo de DNA. A reação foi centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante, e adicionou-se 3ml de etanol absoluto. A reação foi novamente centrifugada. Depois disso, drenou-se o tubo e deixou-se o DNA secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Na última etapa, acrescentou-se ao tubo com o DNA, 200-250 µl de TE 1x ou água milliQ, que resultou em uma concentração aproximada de 400 ng/µl. O DNA foi armazenado a 2-8°C.

As quantificações foram feitas no espectrofotômetro Nanodrop® (ThermoScientific).

3.3.4. Análise Cromossômica Por Microarray

A Análise Cromossômica por Microarray (CMA) permite identificar microdeleções ou microduplicações, simultaneamente, em milhares de seqüências alvo do genoma. Esta técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em um chip (*GeneChip*[®]) de DNA (29; 30). A investigação da presença de alterações cromossômicas submicroscópicas por CMA em sete pacientes com cromossomos marcadores identificados pela técnica de banda G foi feita utilizando a plataforma *CytoScan*[®] 750K Array (*Affymetrix*, EUA) e as configurações disponíveis no *GeneChip*[®] Scanner 3000 7G System (*Affymetrix*, EUA). Essa plataforma utiliza microarranjos de DNA contendo 550.000 sondas não polimórficas para CNVs de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano, cobrindo uma distância média de 1 Kb, e cerca de 200.000 SNPs. O sistema todo inclui os oligonucleotídeos pré-arranjados em ***GeneChip***[®], conjunto de 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridização, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, e programa computacional necessário para a identificação dos SNPs e das CNVs e detecção de mosaicismos.

Em dois casos foram utilizadas uma plataforma de alta resolução, *CytoScan*TM HD (*Affymetrix*). Essa plataforma possui cerca de 2,7 milhões de sondas sendo 750.000 SNPs que permitem uma alta resolução tanto de variações no número de cópias quanto de perda de heterozigose e também detecção de mosaicismos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fizeram parte do estudo nove casos de cromossomos marcadores identificados por bandamento G e caracterizados por CMA. Todos os pacientes apresentaram cromossomo marcador em seus cariótipos, sendo que um dos pacientes (paciente 8) apresentou mosaicismo. Os pais dos pacientes realizaram exame de citogenética por bandamento G e não foram identificados cromossomos marcadores em seus cariótipos.

A CMA permitiu a detecção da origem do cromossomo marcador em sete (78%) dos nove casos pesquisados. Desses, dois casos não apresentaram alterações no exame de microarray. Dois casos se originaram do cromossomo 15 e dois casos se originaram do cromossomo 18. Os outros casos derivaram dos cromossomos 9 (paciente 5), 9 ou 22 (paciente 6) e 21 (paciente 7). Os resultados encontram-se resumidos na Tabela I.

A taxa de ocorrência entre os sexos foi 1:1. Três pacientes (33,3%) apresentaram deficiência intelectual, três pacientes (33,3%) apresentaram atraso na fala e destes dois também apresentaram atraso de desenvolvimento e dois (22,2%) foram diagnosticados com TDAH. O paciente 2 tem pais consanguíneos e o paciente 6 apresentou perda de heterozigose na região pericentromérica do cromossomo 9. Não foi identificado mosaicismo pela CMA em nenhum dos casos estudado.

Tabela1. Pacientes que realizaram análise cromossômica por microarray e seus respectivos resultados, incluindo a posição e região genômica, tamanho do rearranjo e a plataforma utilizada para o experimento.

Amostra	Tipo de alteração/Interpretação	Resultado/Posição genômica	Localização cromossômica	Tamanho	Plataforma	
1	Tetrassomia e trissomia inv dup 15	chr15:22,770,421-32,439,281	15q11.2q13.3	9.669 kbp	CytoScan™ (Affymetrix)	HD
2	Tetrassomia inv dup 15	chr15: 22,770,421- 30,370,018,	15q11.2q13.2	7.600 kbp	Affymetrix (hg19)	750k
3	Tetrassomia Isocromossomo 18p LOH18p	chr18:136,22715,079,294	18p11. p11.21,	14.905 Kbp	Affymetrix (hg19)	750k
4	Tetrassomia Isocromossomo 18p	chr18:136,227-18,529,578	18p11.32q11.1	18.393 kbp	Affymetrix (hg19)	750k
5	Trissomia Trissomia 9p24.3p24.2 e 9p13.3p13.1	chr9: 1,937,872-3,931,626 e chr9: 35,299,346 - 68,188,391	9p24.3p24.2 9p13.3p13.1	1.983 kbp e 3.480 kbp	Affymetrix (hg19)	750k

Tabela1. Pacientes que realizaram análise cromossômica por microarray e seus respectivos resultados, incluindo a posição e região genômica, tamanho do rearranjo e a plataforma utilizada para o experimento.

Amostra	Tipo de alteração/Interpretação	Resultado/Posição genômica	Localização cromossômica	Tamanho	Plataforma	
6	Trissomia parcial 22q e LOH 9p	chr22: 20,728,956-21,465,659	22q11.21	737 kbp	CytoScanTM (Affymetrix)	HD
7	Trissomia	chr21:33,738,605-34,920,973.	21q22.11	1.182 kbp	Affymetrix 750k (hg19)	
8	-	Sem CNVs patogênicas	-	-	Affymetrix 750k (hg19)	
9	-	Sem CNVs patogênicas	-	-	Affymetrix 750k (hg19)	

Paciente 1

O paciente (Figura 3) foi avaliado aos sete anos de idade e apresentava atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, especialmente na fala, aparente hipertelorismo ocular, fendas palpebrais discretamente oblíquas descendentes, orelhas proeminentes e macrostomia.



Figura 3. Paciente 1 aos sete anos apresentando dismorfias faciais: hipertelorismo ocular, fendas palpebrais discretamente oblíquas descendentes, orelhas proeminentes e macrostomia.

A CMA revelou que o paciente era portador de um rearranjo no cromossomo 15 constituído de um segmento de tetrassomia e um segmento de trissomia da região proximal do braço longo do cromossomo 15 na posição genômica chr15:22,770,421-32,439,281(hg19) envolvendo as bandas 15q11.2q13.3. Esse rearranjo possivelmente corresponde a um cromossomo marcador do tipo inv dup15. O tamanho total do segmento alterado foi de 9,669 Mb. Não foi detectada alteração patogênica de número de cópias em nenhum outro cromossomo, evidência de mosaicismo ou perda de heterozigose que sugerisse dissomia uniparental.

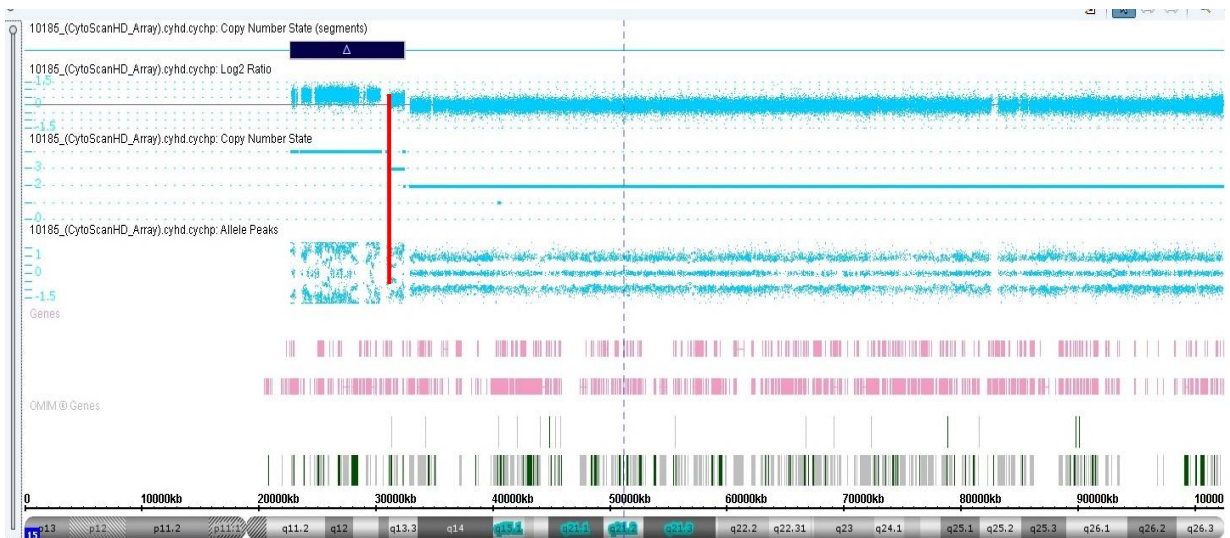


Figura 4. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan HD (Affymetrix) do paciente 1. O retângulo em azul representa o segmento alterado e a linha vermelha vertical indica o final da região de tetrassomia e início da trissomia em 15q11.2q13.3.

Paciente 2

A paciente do sexo feminino (Figura 5), foi atendida aos nove anos de idade, é a terceira filha de um casal consanguíneo (primos em segundo grau), apresenta comportamento agitado, fala sozinha e tem risos imotivados, não tem noção do perigo, apresenta dificuldades de interação com as pessoas, tem alteração na coordenação motora, dificuldades de aprendizado, atraso na fala e foi diagnosticada com déficit intelectual moderado. Não é síndrômica, tem mordida aberta e a boca fica entreaberta, apresenta microretrognatia discreta e frouxidão tegumentar.



Figura 5. Paciente 2 aos nove anos; apresenta microretrognatia e boca entreaberta.

A CMA revelou uma tetrassomia parcial do cromossomo 15 de 7,600 kbp, na posição genômica chr15: 22,770,421- 30,370,018 (hg19), na região 15q11.2q13.2 que deu origem a um cromossomo marcador do tipo inv dup15. Não apresentou perda de heterozigose que sugerisse dissomia uniparental, mosaïcismo e nem alteração patogênica em outros cromossomos.

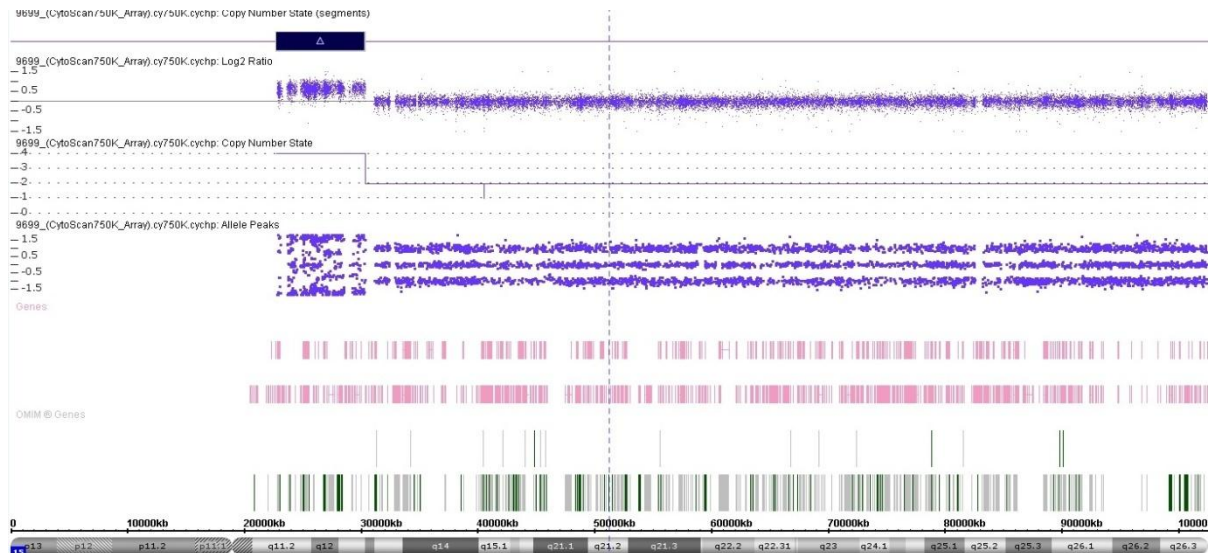


Figura 6. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) da paciente 2. O retângulo em azul representa o segmento de tetrassomia correspondendo as bandas 15q11.2q13.2.

A região 15q11q13 é um segmento de susceptibilidade a rearranjos genômicos, incluindo deleções, duplicações, triplicações intersticiais e inversões (31). Há três síndromes conhecidas associadas a esta região: Síndrome de Prader Willi (PWS), síndrome de Angelman (AS) e síndrome da duplicação 15q13.3.

Indivíduos com síndrome de duplicação 15q geralmente têm hipotonia, atraso no desenvolvimento, dificuldades de aprendizagem, fala ausente ou muito pobre, transtornos do espectro do autismo (ASD), epilepsia, e características faciais (32; 33). Os pacientes 1 e 2 apresentaram a maioria destas características, estando ausente o autismo e a epilepsia. O fenótipo varia significativamente uma vez que ele parece ser influenciado pela natureza da alteração, a origem parental da alteração e o nível de mosaïcismo (34).

Pelo menos 26 genes (OMIM) foram detectados na região de tetrassomia: *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2*, *NIPA1*, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *PWRN2*, *PWRN1*, *C15orf2*, *SNRPN*, *PAR5*, *IPW*, *PAR1*, *UBE3A*, *ATP10A*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*, *OCA2*, *HERC2*, *APBA2*, *NDNL2*, *TJP1*, *CHRFAM7A* e *TRPM1*. Dentro

desta região, pelo menos três genes (*NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1*) estão envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso central, o gene *SNRPN* tem sido associado com o autismo quando há ganho de números de cópias de origem materna (35). No entanto, os pacientes 1 e 2 não tinham diagnóstico de autismo.

Os genes importantes que estão envolvidos em distúrbios do desenvolvimento e neurológicos são *GABRA5*, *GABRA3*, *GABRG3*, *MAGEL2*, *MKRN3*, *NDN*, *SNRPN* e *UBE3A*. Três dos genes codificam subunidades dos receptores de GABA, uma família de canais de cloreto dependentes de ligantes que medeiam o principal neurotransmissor inibitório GABA no cérebro (36). Eles foram encontrados por serem altamente expressos no córtex cerebral em amostras de cérebro *post mortem* (37).

Esta região contém breakpoints (BPS) recorrentes que consistem em segmentos de repetições de baixo número de cópias: BPS1, BPS2, BPS3, BPS4 e BPS5 localizados em 15q11-q13. Esta região também é sujeita a efeitos de *imprinting* regulados por metilação, e o alelo que é expresso para genes específicos baseia-se na origem parental do cromossomo (36). Nesse segmento estão mapeados pelo menos cinco genes paternalmente expressos (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2*, *snoRNAs* e *SNRPN-SNURF*) e dois genes maternalmente expressos (*UBE3A* e *ATP10A*). A região crítica para a síndrome de Prader-Willi (PWS) / Síndrome Angelman (AS) está localizada entre BP2 e BP3 (38).

As características clínicas dos pacientes estão em concordância com relatos anteriores, como o atraso de desenvolvimento, atraso na fala, dificuldades de aprendizagem, distúrbios comportamentais incluindo agressividade; todas resultam de um desenvolvimento anormal do cérebro, função provavelmente explicada por um efeito de dosagem de vários genes localizados na região 15q11.2q13 (39).

A paciente 2 é filha de pais consanguíneos, no entanto seus sinais clínicos não diferem daqueles esperados para portadores de marcadores do tipo invdup15.

Paciente 3

Paciente do sexo masculino portador de deficiência intelectual associada a malformações e dismorfias faciais. A CMA revelou uma tetrassomia do braço curto do cromossomo 18 na posição genômica chr18:136,227-15,079,294 (hg19), Além

dessa alteração que resultou em um cromossomo marcador, não foi detectada alteração patogênica em nenhum outro cromossomo ou evidência de mosaicism. No entanto, a ausência de SNPs em heterozigose é indicativa de dissomia uniparental desse braço cromossômico. Esses dados permitem caracterizar o marcador como um isocromossomo de braço curto de 18 (i(18p)).

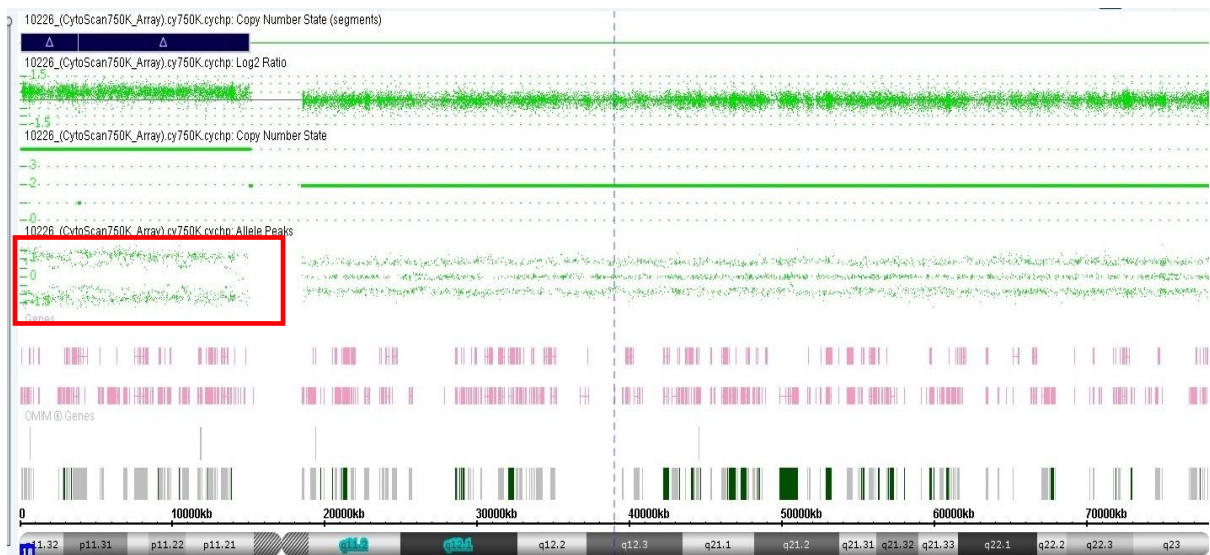


Figura 7. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) do paciente 3. O retângulo em azul representa o segmento de tetrassomia das regiões. O retângulo vermelho ressalta o resultado dos SNPs mostrando a ausência de heterozigose para marcadores do braço curto do cromossomo 18.

Paciente 4

Paciente do sexo feminino, filha de casal jovem e não consanguíneo com deficiência intelectual e atraso psicomotor, principalmente na fala. Apresenta dismorfias faciais, microcefalia, hipoplasia de face média, hipotelorismo ocular, fendas palpebrais estreitas, estrabismo convergente, nariz pequeno, microstomia, palato alto, dentes pequenos hipoplásticos, camptodactilia do 5º quirodáctilo direito e esquerdo, posição viciosa do polegar esquerdo e implantação anômala do hálux esquerdo. Tem hipoplasia renal à direita, convulsões, anemia crônica e distúrbios de refração.



Figura 8. Paciente 4 aos doze anos de idade, apresentando microcefalia, hipoplasia de face média, hipotelorismo ocular, estrabismo e nariz pequeno.

A paciente apresentou uma tetrassomia de 18,393 kbp no braço curto do cromossomo 18, na região 18p11.32q11.1, na posição genômica chr18:136,227-18,529,578, envolvendo todo o braço curto e a região do centrômero do cromossomo 18 que deu origem a um cromossomo marcador. Esses dados permitem caracterizar o marcador como um isocromossomo de braço curto de 18 (i(18p)).

Não foi detectada alteração patogênica em nenhum outro cromossomo, evidência de mosaïcismo ou perda de heterozigose que sugerisse dissomia uniparental.

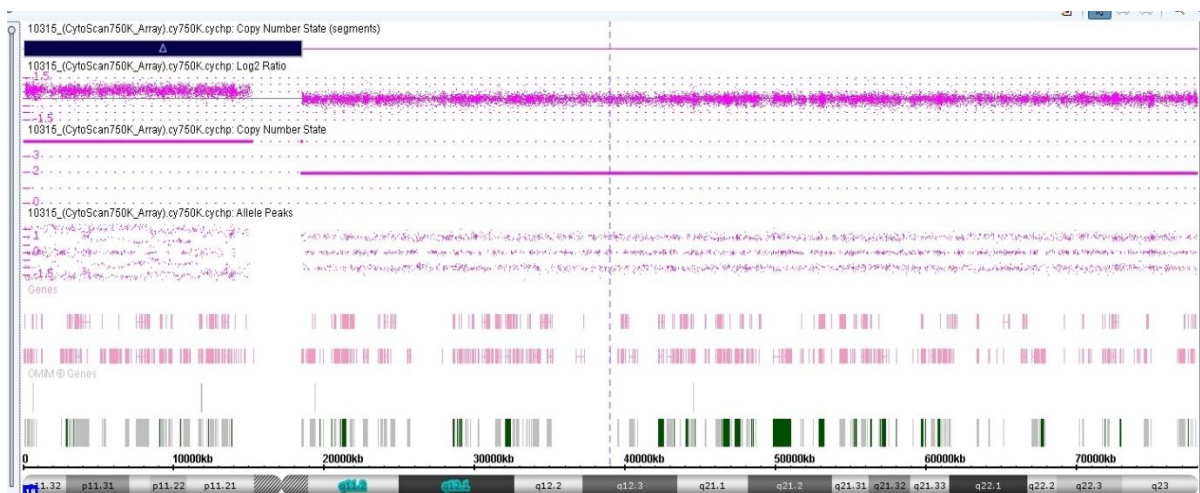


Figura 9. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) do paciente 4. O retângulo em azul representa o segmento de tetrassomia da região 18p11.32q11.1

Isocromossomos são cromossomos marcadores supranumerários constituídos de duas cópias do mesmo braço de um cromossomo; a presença de um isocromossomo além do par de cromossomos normais leva a uma tetrassomia do braço envolvido (40). Os pacientes 3 e 4 apresentaram tetrassomia do braço curto do cromossomo 18 sugestiva de um isocromossomo do braço curto do cromossomo 18 (i(18p)). A tetrassomia 18p está associada com deficiência intelectual moderada a grave, microcefalia, hipertonia, atraso de crescimento, estrabismo, escoliose, cifose e outras anomalias. Estudos mais recentes ampliaram o fenótipo acrescentando icterícia neonatal, dificuldades respiratórias, otite média recorrente, perda de audição, convulsões, defeitos de refração, refluxo gastroesofágico, defeitos cardíacos e anomalias nos pés (41). As características da paciente 4 correspondem aos relatos na literatura, apresentando algumas das características para este distúrbio como microcefalia, atraso psicomotor, defeitos de refração e convulsões.

Este tipo de isocromossomo parece ser um dos isocromossomos mais comuns observados em seres humanos (42) com uma frequência de 1:180.000 nascidos vivos (40). A tetrassomia parece ocorrer *de novo* na maioria dos casos, mas alguns casos herdados foram relatados na literatura, para a maioria dos casos herdados verificou-se ser de origem materna (40;43), sendo a idade materna considerada um fator de risco (40).

No paciente 3, na região de tetrassomia também foi identificada ausência de SNPs em heterozigose que é indicativa de dissomia uniparental desse braço cromossômico. Estudos já relacionaram a presença de cromossomo marcador com dissomia uniparental, mas são extremamente raros, segundo Liehr (44) apenas 46 casos foram reportados e não há registro na literatura de dissomia uniparental associado a um cromossomo marcador originário do cromossomo 18. Os efeitos patogênicos ainda não são claros, mas parece estar associado à homozigose de doenças recessivas e *imprinting* genômico, porém não foi possível associar a clínica do paciente com a dissomia uniparental uma vez que os dados clínicos não estavam disponíveis.

Paciente 5

A paciente (Figura 9) do sexo feminino foi examinada aos 11 anos de idade, sendo diagnosticada com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), tem sono agitado, dificuldade na escrita e na leitura e é agressiva. Apresenta nariz pequeno, leve angulação nos cotovelos, pés planos e hipertelorismo ocular.



Figura 10. Paciente 5 aos 11 anos de idade com hipertelorismo ocular e nariz pequeno.

A paciente apresentou uma triplicação em duas regiões não contíguas no cromossomo nove nas posições genômicas chr9: 1,937,872-3,931,626 e chr9: 35,299,346-68,188,391(hg19), originando uma trissomia das regiões 9p24.3p24.2 e 9p13.3p13.1 na forma de um cromossomo marcador.

Não foi detectada alteração patogênica em nenhum outro cromossomo, evidência de mosaicismo ou perda de heterozigose que sugerisse dissomia uniparental.

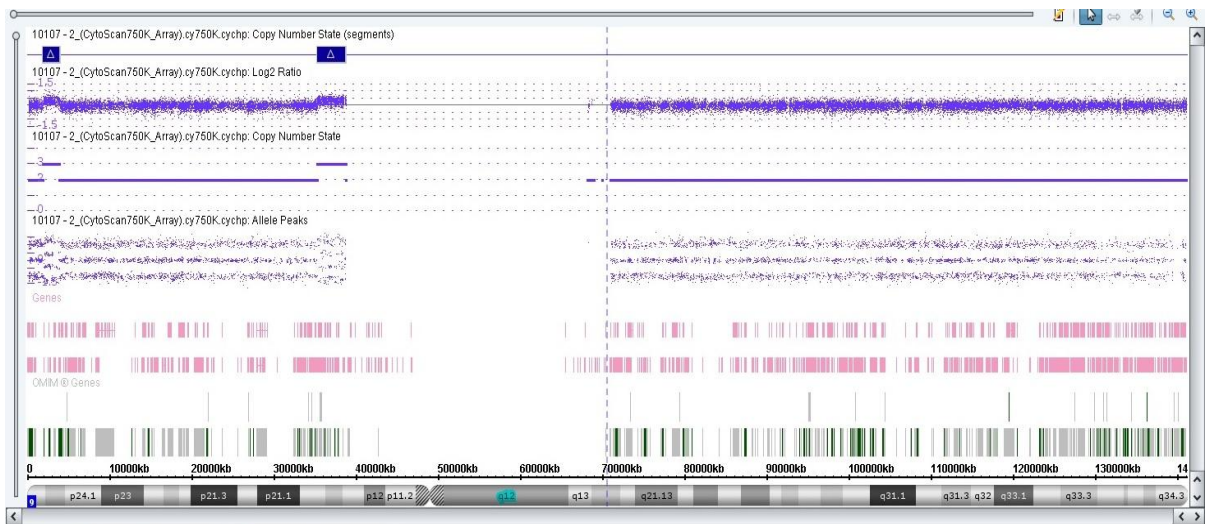


Figura 11. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) da paciente 5. Os dois retângulos em azul (linha 1) representam os segmentos triplicados em 9p24.3p24.2 e 9p13.3p13.1.

O braço curto do cromossomo 9 é uma região pobre em genes e a trissomia 9p é uma das anomalias mais frequentes em recém-nascidos vivos, sendo a correlação fenótipo-genótipo bem estabelecida. As principais características incluem deficiência intelectual, microcefalia, braquicefalia, olhos profundos, fendas palpebrais obliquas para baixo, raiz nasal proeminente com a ponta nasal bulbosa, orelhas de implantação baixa, dedos curtos e idade óssea atrasada. A paciente 5 apresenta poucas alterações fenotípicas e exibe um rearranjo diferente dos descritos na literatura; com três cópias da região 9p24.3p24.2, próximo a região terminal do braço curto e três cópias da região 9p13.3p13.1, próximo a região centromérica do cromossomo, que deram origem a um cromossomo marcador. Muitos dos pacientes descritos tiveram o marcador identificado apenas por FISH portanto não se sabe o segmento exato envolvido no rearranjo.

O segmento 9p24.3 é uma região com muitos genes conhecidos para algumas das características da trissomia 9p, muitos destes genes não estão presentes na região duplicada na paciente. Um gene importante nesta região é o gene *VLDLR1* (receptor de proteína de baixa densidade), pertence a uma família de genes bem conhecidos que têm a capacidade transmitir uma variedade de sinais extracelulares através das membranas neuronais do sistema nervoso central (45). Mutações neste gene têm sido associadas à disfunção cognitiva (46; 47; 48), *VLDLR1* estava duplicado na paciente, apoiando a associação entre a disfunção cognitiva e este gene.

Paciente 6

A paciente (Figura 11) do sexo feminino é filha de pais não consanguíneos, foi diagnosticada com deficiência intelectual leve e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), e ao exame físico apresentou epicanto bilateral, fendas palpebrais pequenas, sulco nasolabial em arco de cupido. Apresentava alteração no processamento auditivo.



Figura 12. Paciente 6 aos cinco anos e apresentou epicanto bilateral, fendas palpebrais pequenas, sulco nasolabial em arco de cupido.

A paciente apresentou uma duplicação no cromossomo 22 com tamanho de 737kbp, na posição genômica chr22:20,728,956-21,465,659, na região 22q11.21, além de perda de heterozigose na região pericentromérica do cromossomo 9 que sugere dissomia uniparental nessa região. Não foi detectada alteração patogênica em nenhum outro cromossomo nem evidência de mosaicismo.

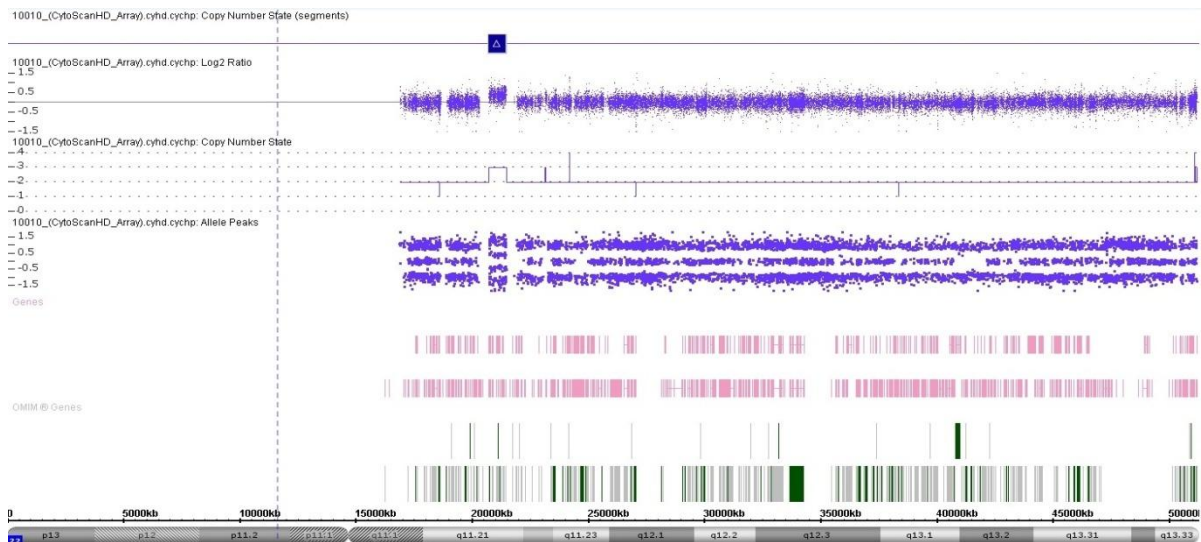


Figura 13. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan HD (Affymetrix) da paciente 6. Os dois retângulos em azul (linha 1) representam o segmento duplicado em 22q11.21.

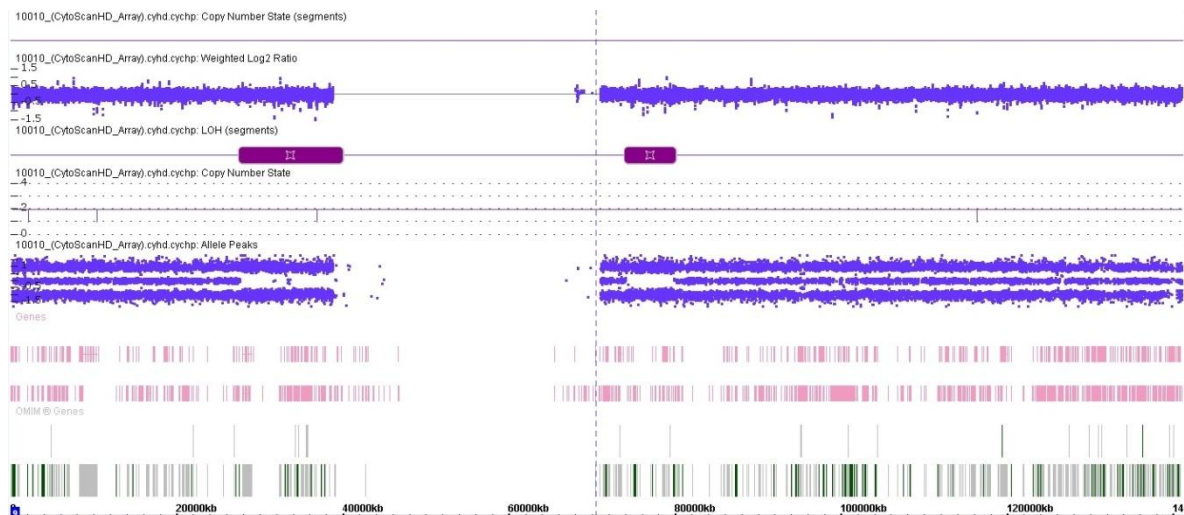


Figura 14. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan HD (Affymetrix) da paciente 6, mostrando a perda de heterozigose da região pericentromérica do cromossomo 9.

A região cromossômica 22q11.2 é muito suscetível a rearranjos cromossômicos, levando a três diferentes síndromes com malformações congênitas: síndrome de George/velocardiofacial (OMIM 192430, 188400), síndrome der(22) e síndrome olho do gato (OMIM 115470). A síndrome do olho de gato é uma síndrome rara e tem um quadro variável de anomalias congênitas. As características incluem coloboma ocular, apêndices pré-auriculares, anomalias anais, anomalias craniofaciais, anomalias no esqueleto e atraso mental (49; 50). Geralmente esta síndrome está associada a um cromossomo marcador extranumérico, consistindo de material

duplicado do cromossomo 22. O marcador é geralmente bissatelitado e dicêntrico, resultando em trissomia do braço curto e uma parte do 22q11.2 (51).

A parte proximal do braço longo do cromossomo 22 (22q11.2) tem sido reconhecida como um hot spot para rearranjos cromossômicos, pois contém sequências com muitas LCRs e contém a região crítica para a síndrome do olho de gato e a síndrome DiGeorge. A paciente apresentou uma duplicação desta região (22q11.21), porém não apresentou as principais características da síndrome como o coloboma no olho, anomalias anais e apêndice pré-auricular, provavelmente por ser uma pequena duplicação no final desta região e não envolver a região crítica para as síndromes, também parece que esta região está sujeita a penetrância incompleta e os efeitos genéticos podem ser susceptíveis a dose-dependência.

Além dessa pequena duplicação no cromossomo 22, a paciente apresentou uma perda de heterozigose na região pericentromérica do cromossomo 9. A maioria dos cromossomos marcadores é proveniente das regiões pericentroméricas dos cromossomos e especula-se que portadores de cromossomos marcadores podem ter um risco aumentado para a dissomia uniparental estruturalmente dos homólogos normais a partir da qual foi derivado o cromossomo marcador (52). Portanto a perda de heterozigose no cromossomo 9 pode ser indicativa da origem do cromossomo marcador.

Paciente 7

Paciente do sexo feminino, filha de casal jovem não consanguíneo, com atraso psicomotor moderado e deficiência intelectual, microcefalia, baixa estatura e sobrepeso. Apresentou as seguintes dismorfias faciais: microbraquicefalia, alopecia areata, face arredondada e plana, olhos com fendas estreitas, palato alto e estreito, dentes pequenos e muito juntos, orelhas pequenas ligeiramente baixo implantadas. Tem distúrbio de comportamento com agressividade e hiperatividade. Apresenta insuficiência tricúspide leve e esteatose hepática.

A paciente apresentou uma trissomia de 1,182 kbp no braço longo do cromossomo 21, na região 21q22.11 e na posição genômica chr21:33,738,605-34,920,973 (hg19) dando origem a um cromossomo marcador. Não foi detectada

alteração patogênica em nenhum outro cromossomo, evidência de mosaïcismo ou perda de heterozigose que sugerisse dissomia uniparental.

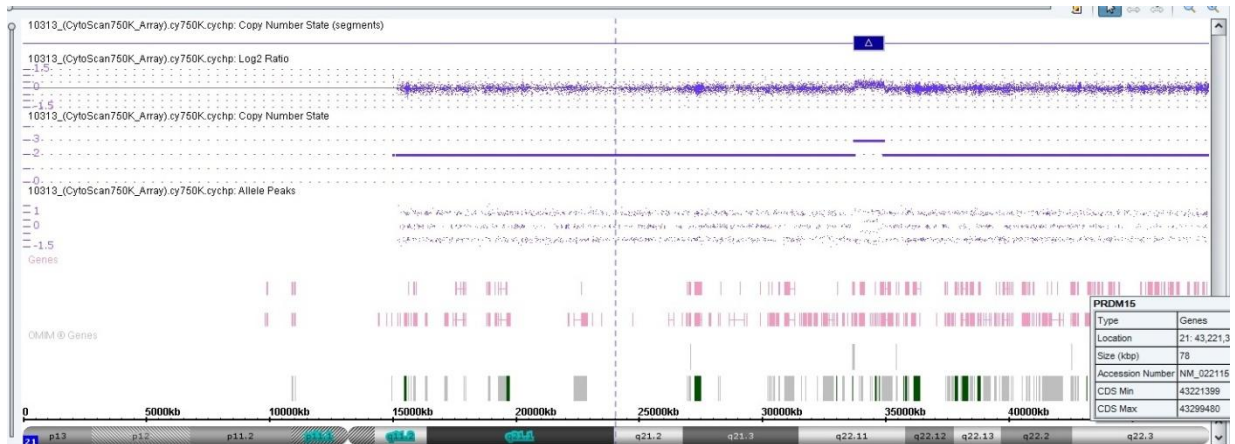


Figura 15. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix) do paciente 7. O retângulo em azul representa o segmento de trissomia da região 21q22.11.

A trissomia do cromossomo 21 causa a síndrome de Down, resultando em déficit cognitivo, hipotonia, características fenotípicas como perfil achatado, fendas palpebrais oblíquas, encurvamento dos quintos dígitos e prega única nas palmas. A trissomia do 21 também é um fator de risco para doença congênita cardíaca, doença de Hirschsprung e outras anomalias (53). O fenótipo da síndrome de Down tem sido atribuído a um desequilíbrio da região 21q22.1-q22.3 (53), outras regiões também podem contribuir para o fenótipo. A região de trissomia da paciente (21q22.11) não engloba a região crítica da síndrome mas a trissomia produziu algumas características fenotípicas da Síndrome de Down como microcefalia, olhos com fendas estreitas, defeito cardíaco e deficiência intelectual, portanto é provável que haja uma significativa contribuição de outros genes no cromossomo 21 e em outras partes do genoma para o fenótipo da Síndrome de Down.

Pacientes com desequilíbrios parciais do cromossomo 21 são raros e a maioria das trissomias parciais do cromossomo 21 resultaram de translocações desequilibradas (54). A região de trissomia do paciente engloba cerca de 23 genes, essa região parece ser uma região crítica associada a deficiência intelectual e atraso na fala, os genes *C21orf91* e *SYNJ1* contidos nesta região estão relacionados com defeitos cognitivos (55).

Paciente 8

O paciente (figura 16) do sexo masculino, foi examinado com um ano e quatro meses, é filho de um casal jovem não consanguíneo, nasceu prematuro, tem leve atraso na coordenação. Apresenta testa retangular, sobrancelhas retas com tendência a se encontrar na linha média, fendas palpebrais curtas, raiz nasal baixa, filtro liso (médio), lábio superior muito fino, horizontalizado, bochechas baixas, micrognatia, palato alto, braquidactilia, peso e altura no menor percentil. Foi diagnosticado com comunicação interatrial que faz parte do grupo das cardiopatias congênicas acianóticas.



Figura 16. Paciente 8 com 1 ano e 4 meses. Apresenta testa retangular, sobrancelhas retas, com tendência a se encontrar na linha média, fendas palpebrais curtas, raiz nasal baixa, filtro liso (médio), lábio superior muito fino, horizontalizado, bochechas baixas, micrognatia.

O resultado do exame citogenético por banda G mostrou um cromossomo marcador extranumerário em mosaico (47,XY,+mar [11] /46,XY[19]), no entanto a CMA não evidenciou alterações patogênicas em nenhum cromossomo, mosaicismo ou perda de heterozigose que sugerisse dissomia uniparental, sendo portanto provável que o marcador seja formado apenas por heterocromatina.

Portanto as alterações fenotípicas provavelmente não apresentam relação direta com o cromossomo marcador, podendo ter ocorrido uma mutação em algum gene ou influência do ambiente.

Paciente 9

Paciente do sexo masculino, normal, sem alterações fenotípicas, tem 40 anos de idade e foi diagnosticado com infertilidade. Casado, há doze anos o casal faz tratamento para engravidar e já realizaram fertilização in vitro.

Realizou exame de citogenética através de bandamento G e o resultado mostrou um cromossomo marcador extranumérico, mas o CMA não identificou alteração patogênica em nenhum cromossomo, mosaicismo ou perda de heterozigose que sugerisse dissomia uniparental, sendo provável que o marcador seja formado por heterocromatina.

Anomalias cromossômicas são importantes causas de infertilidade, casais com abortamento de repetição apresentam frequência de alterações cromossômicas maiores do que na população geral. A frequência de cromossomos marcadores detectados em pacientes com infertilidade é maior do que na população em geral (0,125% contra 0,044%) e é também diferente entre homens (0,165%) e mulheres (0,022%) (56). Estudos demonstraram também que o tipo de herança do marcador influencia na infertilidade; pequenos cromossomos marcadores herdados da mãe são mais susceptíveis de conduzir problemas de fertilidades nos filhos enquanto que pequenos cromossomos marcadores herdados do pai são mais prováveis de causar infertilidade nas filhas (57).

Aproximadamente 20-30% dos pequenos cromossomos marcadores investigados por CMA são constituídos de heterocromatina (58). A implicação destes pequenos cromossomos marcadores em infertilidade pode ser explicada por uma interação mecânica durante a meiose. Em translocações ou em portadores de cromossomos marcadores, a insuficiência na gametogênese provavelmente não é induzida por desequilíbrios genômicos, mas por dificuldade mecânica durante a meiose.

Muitos dos cromossomos marcadores são formados apenas por heterocromatina e não causam alterações fenotípicas nos portadores, sendo associadas apenas nas causas de infertilidade.

As alterações apresentadas pelo paciente 8 apesar de serem leves, parecem não ter relação com o cromossomo marcador.

Os pacientes deste estudo apresentaram uma grande heterogeneidade quanto à origem, estrutura cromossômica e efeitos fenotípicos. A característica mais comum nos pacientes foi a presença de atraso de desenvolvimento ou atraso psicomotor. Uma grande variabilidade fenotípica está relacionada com a presença de cromossomos marcadores, o risco de um fenótipo anormal pode estar associado com o tamanho do material eucromático ou o número de genes e cerca de 14% dos cromossomos marcadores está presente adicionalmente a uma aberração cromossômica numérica como trissomia 18, 21, ou 13, monossomias do X ou outra alteração numérica (59), o que torna esse tipo de alteração cromossômica uma das mais difíceis para a determinação do prognóstico e do aconselhamento genético, principalmente quando encontrados em exames pré-natais.

Correlações genótipo-fenótipo em um cenário de diagnóstico devem abordar uma variedade de fatores, incluindo o conteúdo genético, os efeitos de posição, tamanho da aberração, padrão de herança, presença de mosaicismo e dissomia uniparental.

O mosaicismo está presente em cerca de 50% dos indivíduos portadores de cromossomos marcadores, porém é difícil saber a real taxa de mosaicismo somático em qualquer indivíduo estudado, pois a frequência de células portadoras de cromossomos marcadores é altamente variável de tecido para tecido. O grau de mosaicismo pode ser considerado como uma possibilidade para o impacto clínico, sendo extremamente importante para o aconselhamento pré-natal. Nos casos aqui estudados apenas um paciente (paciente 8) apresentou mosaicismo ao cariótipo de sangue periférico, porém na análise por CMA não foi detectado nenhuma alteração confirmando se tratar de um cromossomo marcador formado por heterocromatina.

Dentre os casos de cromossomos marcadores em mosaico, é mais frequente mosaico em que os cromossomos marcadores foram derivados de cromossomos não acrocêntricos do que os derivados de acrocêntricos (58% versus 24%) (60). Os marcadores derivados de acrocêntricos são mais estáveis e tendem a apresentar menos alterações fenotípicas do que os derivados de cromossomos não acrocêntricos, também existem uma maior susceptibilidade para a formação de dissomia uniparental em marcadores em mosaico derivados de acrocêntricos do que os marcadores derivados de não acrocêntricos (59).

Os cromossomos marcadores também podem estar associados à dissomia uniparental, a taxa de dissomia uniparental em indivíduos com marcadores é de 0,044% em recém-nascidos vivos (60). Essa taxa pode estar subestimada uma vez que as principais técnicas para estudo de marcadores como o FISH não permitem a identificação de regiões de perda de heterozigose. Os principais mecanismos propostos para a formação da dissomia uniparental associado a cromossomos marcadores são: resgate de trissomia, complementação gamética e quebra cromossômica em regiões proximais ao centrômero, seguida por não-disjunção. O efeito patogênico ainda não está totalmente esclarecido, mas parece que a dissomia uniparental pode causar condições clínicas como o surgimento de homozigose para mutações recessivas ou padrões aberrantes de *imprinting*. Além disso, a dissomia uniparental é frequentemente encontrada em conjunto com mosaïcismo para uma linha celular cromossomicamente anormal, o que também pode contribuir para alterações fenotípicas (61).

Em nossa amostra apenas o paciente 3 apresentou dissomia uniparental do segmento em tetrassomia. Como não temos informações clínicas detalhadas do paciente não podemos especular quanto ao efeito da dissomia uniparental no quadro clínico.

A origem dos cromossomos marcadores esteve de acordo com a literatura: dois casos se originaram do cromossomo 15 e dois casos se originaram do cromossomo 18; que são os cromossomos frequentemente envolvidos na origem dos marcadores. Os outros casos derivaram dos cromossomos 9 (paciente 5), 9 ou 22 (paciente 6) e 21 (paciente 7).

A maioria dos cromossomos marcadores é derivada dos braços curtos e de regiões pericentroméricas de cromossomos acrocêntricos e cerca de metade deles são derivados do cromossomo 15 (62). Cerca de 30% dos cromossomos marcadores contém eucromatina, o que leva a uma trissomia ou tetrassomia e consequentes anomalias congênitas (63). A ocorrência de cromossomos marcadores é sete vezes mais prevalente em indivíduos com deficiência intelectual (56).

Cromossomo marcador decorrente do cromossomo 15 é o segundo rearranjo mais comum no cromossomo 15 e cerca de 80% se devem a duplicação invertida (inv dup 15). A maioria dos inv dup 15 é de origem materna e está associada com a

idade materna avançada (38). Os pacientes 1 e 2 do presente estudo apresentaram duplicação invertida no cromossomo 15 (figura 17), com tetrassomia na região crítica PWS/AS e possuem fenótipo concordante com o descrito na literatura. Por meio da técnica de microarray foi possível caracterizar o rearranjo e determinar quais os cromossomos envolvidos. Sabemos que a região 15q11q13 é uma área altamente susceptível a rearranjos genômicos clinicamente importantes como a síndrome de Prader-Willi (PWS [MIM176270]) e síndrome de Angelman (AS [MIM 105830]). O fenótipo dos portadores de cromossomos marcadores originados daquela região parece que está ligado a região crítica destas síndromes. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a origem dos cromossomos marcadores com duplicação invertida, a mais plausível parece ser a troca do tipo U na meiose resultante de erros no *crossing-over* entre cromossomos homólogos, seguido de não disjunção na meiose I. A existência de LCRs nas proximidades dos breakpoints sugere ser responsável pelos rearranjos envolvendo a região 15q11q13, descobertas recentes sugerem que diversos rearranjos cromossômicos pode envolver a susceptibilidade a rearranjos relacionados com a presença de LCR. No caso de cromossomos marcadores, as LCRs podem causar um desalinhamento durante o emparelhamento na meiose I que resultam em rearranjos genômicos por recombinação homóloga não alélica (NAHR) entre sequências invertidas repetidas (64).

Dos cromossomos acrocêntricos, o paciente 7 também apresentou cromossomo marcador derivado do cromossomo 21. A frequência de cromossomos marcadores derivados do cromossomo 21 é baixa; o cromossomo 21 está relacionado com a síndrome de Down e outros tipos de rearranjos envolvendo este cromossomo são pouco relatados na literatura. Villa et. al. (65) propôs a recombinação homóloga não alélica (NAHR) como um mecanismo de formação de um cromossomo marcador em anel derivado do cromossomo 21.

Os cromossomos marcadores derivados de cromossomos não acrocêntricos são menos frequentes (~15%) do que os derivados de cromossomos acrocêntricos, mas o risco de um fenótipo anormal associado a um cromossomo marcador aleatoriamente derivado de um autossomo acrocêntrico (excluindo o cromossomo 15) é de cerca de 7% em comparação com cerca de 28% para os derivados de autossomos não acrocêntricos (66). No presente estudo, três pacientes

apresentaram cromossomos marcadores derivados de cromossomos não acrocêntricos. Cromossomos marcadores 18 têm sido relatados na forma de isocromossomos que leva uma tetrassomia 18p que na maioria dos casos é uma ocorrência *de novo*, nos casos em que é herdada a maioria é de origem materna e parece ter relação com a idade avançada, o mecanismo de formação neste caso seria a não disjunção de homólogos na meiose materna II (41). A idade materna avançada é conhecida por ter influência na formação da tetrassomia e é um dos fatores determinantes observados em famílias com crianças carregando isocromossomo adicional (67). O mecanismo alternativo de formação de um isocromossomo é uma troca do tipo U na meiose, os quais normalmente produzem um isocromossomo dicêntrico (42).

A paciente 6 apresentou uma perda de heterozigose na região pericentromérica do cromossomo 9, a perda de heterozigose leva à dissomia uniparental que é a herança de um par de cromossomos de apenas um dos genitores. Os problemas associados à dissomia uniparental incluem a homozigose de genes recessivos, mosaico de trissomias, imprinting genômico ou a combinação destes (52), os efeitos da dissomia uniparental ainda não estão totalmente esclarecidos nos casos de cromossomos marcadores. Os mecanismos de formação na coexistência de dissomia uniparental e cromossomos marcadores foram: resgate da trissomia, complementação gamética e quebra cromossômica em regiões proximais ao centrômero, seguida por não-disjunção. Não está claro se essa dissomia uniparental está ou não relacionada com o marcador. O microarray também detectou um ganho cromossômico no cromossomo 22, porém o tamanho do segmento é pequeno e pode não ter relação com o marcador. Os marcadores derivados do cromossomo 22 são bem frequentes, a região da duplicação (22q11) é uma região muito suscetível a rearranjos cromossômicos que são atribuídos a recombinação homóloga não alélica (NAHR) que é mediada por regiões de LCR. A recombinação homóloga entre repetições invertidas nas LCR de cromátides irmãs e cromossomos homólogos poderiam também levar a troca tipo U na meiose que resultaria na formação do inv dic (22) da síndrome do olho de gato e um fragmento acêntrico que seria perdido (68;69). Bartels et. al. (70) relatou um pequeno cromossomo marcador *de novo* derivado do cromossomo 22 com dissomia uniparental em um paciente e concluiu que o provável mecanismo de formação foi

resgate da trissomia funcional por estar associado com a dissomia uniparental. Como foram encontradas alterações nos cromossomos 9 e 22 pelo microarray, o cromossomo marcador pode ter sido formado por essas duas alterações levando a formação de um cromossomo complexo ou ser formado apenas pela região pericentromérica do cromossomo 9, já que a maioria dos marcadores são originados de regiões pericentroméricas. Para a confirmação do resultado seria interessante usar a técnica de FISH para validar a região presente no cromossomo marcador, se do cromossomo 9 ou do 22 ou um marcador complexo formado por ambas as regiões destes dois cromossomos.

Casos de trissomia 9p têm sido derivados a partir de pais que carregam uma translocação recíproca equilibrada e foi acompanhada por uma deleção de outro cromossomo (45). Duplicações isoladas *de novo* sem uma deleção associada não são frequentes (45), normalmente os rearranjo na região 9p são caracterizados como duplicação invertida intersticial com uma deleção terminal (inv dup del). Diferente dos casos apresentados na literatura, a paciente 5 apresentou cromossomo marcador que se originou de uma duplicação em duas regiões do 9p, as regiões 9p24.3p24.2 e 9p13.3p13.1. Essas duas regiões foram possíveis de serem identificadas através da técnica de microarray que é capaz de detectar simultaneamente, em um único ensaio as alterações presentes em todo o genoma.

O microarray revelou rearranjos complexos, de difícil detecção pela técnica de FISH. O cromossomo marcador da paciente 5 contém segmentos descontínuos do braço curto do cromossomo 9 identificado por microarray. A técnica de FISH-multicolor centrômero-específico permite a identificação das regiões centroméricas e a técnica FISH-multicolor subcentromérica-específica permite a identificação de regiões subcentroméricas, no entanto não é possível identificar cromossomos marcadores que não apresentem essas regiões. Assim, a região 9p24.3p24.2 que fica na parte terminal do braço curto do cromossomo 9, não poderia ser detectada e o marcador seria identificado como sendo formado apenas pela triplicação da região 9p13.3p13.1 que envolve o centrômero do cromossomo. Um estudo proposto por Tsuchiya et. al. (6) demonstrou uma complexidade na estrutura de cromossomos marcadores caracterizados por microarray, dois pacientes foram identificados com cromossomos marcadores que continham regiões descontínuas dos cromossomos de que foram originados, que não foram identificados através do FISH.

Em sete dos nove casos estudados foi possível pela técnica de microarray caracterizar os cromossomos envolvidos, identificar os pontos de quebra e caracterizar a alteração, porém não é possível analisar a estrutura dos cromossomos marcadores. O paciente 6 apresentou alterações em dois cromossomos, e através do microarray não foi possível ter a certeza de qual das alterações originou o cromossomo marcador pelo fato de não ser possível analisar a estrutura do cromossomo marcador. A técnica de FISH é importante para determinar se estes ganhos genômicos participaram na formação do cromossomo marcador. Porém, marcadores muito pequenos podem não ser detectados por FISH ou podem produzir resultados ambíguos ou de difícil interpretação, além disso, a técnica de microarray permitiu a avaliação em uma única hibridização, proporcionando assim uma varredura de todo o genoma para os rearranjos e uma melhor definição do genótipo com maior potencial para correlações genótipo/fenótipo.

No presente estudo, dois pacientes que foram identificados com cromossomos marcadores pela técnica de bandamento G não tiveram alterações detectadas por microarray; o paciente 8, uma criança que apresentou leves anomalias e o paciente 9, um adulto normal mas que era infértil, isso pode ser explicado pelo fato de que o cromossomo marcador continha apenas heterocromatina, uma vez que aproximadamente 20-30% dos cromossomos marcadores analisados pelo array não apresentam eucromatina (58). Mesmo não havendo desequilíbrio genômico nos portadores de cromossomos marcadores com apenas heterocromatina, a presença de um cromossomo marcador pode causar abortos recorrentes e um aumento do risco de comprometimento da espermatogênese em homens (71).

Os pequenos cromossomos marcadores são difíceis de reconhecer por causa do seu pequeno tamanho e pela perda gradual em mitoses. Em genética clínica, é muito importante caracterizar estes cromossomos para elucidar seus efeitos fenotípicos por causa de suas implicações no prognóstico e no aconselhamento genético (72). Vários métodos foram desenvolvidos para determinar a origem dos cromossomos marcadores como o FISH multicolor e o bandeamento multicolor, mas muitas destas técnicas são demoradas e não podem detectar pequenas quantidades de material eucromático em cromossomos marcadores.

A análise cromossômica por microarray com ou sem sondas de SNPs são ferramentas poderosas para delinear desequilíbrios cromossômicos. As plataformas de microarray podem ser utilizadas para a investigação de variações de números de cópias (CNVs) por todo o genoma, têm sido muito utilizadas na análise de ganhos e perdas genômicas em tumores para a caracterização e delimitação precisa de desequilíbrios genômicos e para a associação entre anormalidades cromossômicas e manifestações clínicas. Os *arrays* de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) são capazes de identificar perdas de heterozigose, detectando dissomia uniparental. Resultados animadores em termos de taxa de detecção foram obtidos em pacientes afetados por inexplicável atraso no desenvolvimento /deficiência intelectual, transtorno do espectro autista ou anomalias congênitas múltiplas, no qual o diagnóstico foi muito mais preciso do que os obtidos por cariotipagem (73). Avaliação precisa do conteúdo gênico das regiões genômicas desequilibradas, juntamente com a comparação de dados em bancos de dados publicamente disponíveis (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/> ; decipher, <http://decipher.sanger.ac.uk/> ; OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), permitiu detectar regiões críticas relacionadas com síndromes conhecidas, possibilitando a correlação genótipo-fenótipo em vários casos (73).

A caracterização de cromossomos marcadores pela análise cromossômica por microarray torna possível determinar o cromossomo envolvido na formação desse rearranjo, a presença de eucromatina ou heterocromatina, o tamanho do material de eucromatina, definir a região e os pontos de quebra de cada cromossomo envolvido, o número de genes envolvidos e revelar alguns desequilíbrios genômicos inesperados em outras partes do genoma (72).

5. CONCLUSÃO

1. Pela análise cromossômica por microarray foi possível analisar todo o genoma dos nove pacientes que possuíam cromossomos marcadores sendo possível a identificação da origem do marcador em sete casos (78%).

2. Em sete pacientes a análise por microarray permitiu a identificação do rearranjo: inv dup 15 (2 casos), tetrassomia 18p (2 casos), trissomia 9p, trissomia 21q, microduplicação 22q e perda de heterozigose na região pericentromérica do cromossomo 9.

3. Em um paciente com invdup15 foi possível identificar um segmento de trissomia, além do segmento de tetrassomia permitindo uma caracterização mais detalhada do rearranjo.

4. Em um paciente com isocromossomo 18p identificamos dissomia uniparental de todo o segmento do braço curto.

5. Em uma paciente com marcador derivado do cromossomo 9 determinamos um segmento duplicado próximo ao centrômero e um segmento intersticial indicando tratar-se de rearranjo complexo.

6. O diagnóstico por microarray demonstrou ser preciso permitindo a detecção de perdas ou ganhos cromossômicos, a região exata da alteração e os genes envolvidos e também informando sobre mosaicismo e perda de heterozigose.

7. O custo da CMA é compensado pela elevada taxa de detecção de desequilíbrios submicroscópicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jacobs PA, Hassold TJ. Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. *Human Genetics: Proceedings of the 7th International Congress*. 1986; 234-244.
2. Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PM, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. *BMJ* 2006; 332:759-763.
3. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu. Rev. Genet.* 2000; 34:297-329.
4. Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Diverse chromosome breakage mechanisms underlie subtelomeric rearrangements, a common cause of mental retardation. *Hum Mutat.* 2007; 28(2):177-82.
5. Liehr T, Mrasek K, Weise A, Dufke A, Rodriguez L, Martinez Guardia N, Sanchis A, *et al.* Small supernumerary marker chromosomes:—progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res.* 2006; 112:23–34.
6. Tsuchiya KD, Opheim KE, Hannibal MC, Hing AV, Glass IA, Raff ML, Norwood T, Torchia BA. Unexpected structural complexity of supernumerary marker chromosomes characterized by microarray comparative genomic hybridization. *Molecular Cytogenetics.* 2008; 1:7.
7. Liehr T, Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med.* 2007; 19:719–731.
8. Reddy KS, Aradhya S, Meck J, Tiller G, Abboy S, Bass H. A systematic analysis of small supernumerary marker chromosomes using array CGH exposes unexpected complexity. *Genetics in medicine.* 2013; Volume 15, Number 1.
9. Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 107:55-67.

10. Bartels I, Schlueter G, Liehr T, von Eggeling F, Starke H, Glaubitz R, Burfeind P. Supernumerary small marker chromosome (SMC) and uniparental disomy 22 in a child with confined placental mosaicism of trisomy 22: trisomy rescue due to marker chromosome formation. *Cytogenet Genome Res.* 2003; 101:103–105.
11. Schreck RR, Breg WR, Erlanger BF, Miller OJ. Preferential derivation of abnormal human G-group-like chromosomes from chromosome 15. *Hum Genet.* 1977; 36:1–12.
12. Dewald GW. Isodicentric X chromosomes in humans: origin, segregation behavior, and replication band patterns. In: Sandberg AA (ed.) *Cytogenetics of the mammalian X chromosome, part A.* Liss, New York. 1983; 405-426.
13. Mukherjee AB, Murty VV, Rodriguez E, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS. Detection and analysis of origin of i(12p), a diagnostic marker of human male germ cell tumors, by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1991; 3:300–307.
14. Christofolini DM, Piazzon FB, Evo C, Mafra FA, Cosenza SR, Dias AT, Barbosa CP, Bianco B, Kulikowski LD. Complex small supernumerary marker chromosome with a 15q/16p duplication: clinical implications. *Molecular Cytogenetics.* 2014; 7:29.
15. Blenow E, Bui TH, Kristoffersson U et al. Swedish survey on extra structurally abnormal chromosome in 39 105 consecutive prenatal diagnosis: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn.* 1994; 14:1019-1028.
16. Blenow E, Tillberg E. Small extra ring chromosome derived from chromosome 10p: clinical report and characterization by FISH. *J Med Genet.* 1996; 33(5):399-402.
17. Schuffenhauer S, Kobelt A, Daumer-Haas C, Löffler C, Müller G, Murken J, Meitinger T. Interstitial deletion 5p accompanied by dicentric ring formation of the deleted segment resulting in trisomy 5p13-cen. *Am J Med Genet.* 1996; 65:56–59.
18. Laus AC. Caracterização Citogenética Molecular de Cromossomos Marcadores Extranumerários. Tese. Ribeirão Preto. 2008.

19. Warburton PE. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991; 49(5): 995-1013.
20. Crolla JA. FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosome excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am J Med Genet.* 1998; 75:367-381.
21. Maraschio P, Tupler R, Rossi E, Barbierato L, Uccellatore F, Rocchi M, Zuffardi O, Fraccaro M. A novel mechanism for the origin of supernumerary marker chromosomes. *Hum Genet.* 1996; 97:382-386.
22. Paoloni-Giacobino A, Morris MA, Dahoun SP. Prenatal supernumerary r(16) chromosome characterized by multiprobe FISH with normal pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 1998; 18:751–752.
23. Anderlid BM, Sahlen S, Schoumans J, Holmberg E, Ahsgren I, Mortier G, Speleman F, Blennow E. Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. *Am J Med Genet.* 2001; 99:223–233.
24. Beatty B, Mai S, Squire JA. *FISH.* Toronto: Oxford University Press. 2002; 255p.
25. Vetro A , Manolakos E , Petersen MB , Thomaidis L , Liehr T, *et al.* Unexpected results in the constitution of small supernumerary marker chromosomes. *European Journal of Medical Genetics.* 2012; March, 55(3):185–190
26. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2007; 145(4):335-345.
27. Liehr T, Klein E, Mrasek K, Kosyakova N, Guilherme R.S, Aust N, Venner C, Weise A, Hamid AB. Clinical Impact of Somatic Mosaicism in Cases with Small Supernumerary Marker Chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2013;139:158-163.

- 28 . Liehr T, Ewers E, Hamid AB, Kosyakova N, Voigt M, Weise A, Manvelyan M. Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J Histochem Cytochem*. 2011 Sep; 59(9):842-848.
29. Wain LV, Armour JA, Tobin MD. Genomic copy number variation, human health, and disease. *Lancet*. 2009 Jul 25;374(9686):340-50. Review.
30. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet*. 2009 Aug; 10(8):551-64. Review.
31. Hu J, Madan-Khetarpal S, Serrano Rus AH, *et al*. Three Supernumerary Marker Chromosomes in a Patient with Developmental Delay, Mental Retardation, and Dysmorphic Features. *Genetics Research International*. 2011; 18527.
32. Battaglia A, Parrini B, Tancredi R. The Behavioral Phenotype of the idic(15) Syndrome. *Am J Med Genet Parte C Semin Med Genet*. 2010; 154C: 448-455.
33. Kaufmann CA, Suarez B, D Malaspina *et al*. NIMH Genetics Consortium Initiative Millenium Esquizofrenia: análise de ligação de pedigrees afro-americanos. *Am J Med Genet*. 1998; 81:282-289.
34. Battaglia A, Gurrieri F, Bertini E, *et al*. The inv dup(15) syndrome: a clinically recognizable syndrome with altered behavior, mental retardation, and epilepsy. *Neurology*. 1997; 48(4):1081–1086.
35. Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet*. 2011; 130:517-528.
36. Tan ES, Yong MH, Lim ECP, Li Z, Brett MSY, Tan EC. Chromosome 15q11-q13 copy number gain detected by array-CGH in two cases with a maternal methylation pattern. *Molecular Cytogenetics*. 2014; 7:32.
37. Hogart A, Nagarajan RP, Patzel KA, Yasui DH, Lasalle JM. 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to

epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet.* 2007; 16:691-703.

38. Ageeli EA, Drunat S, Delanoë C, Perrin, Baumann C, Capri Y, Fabre-Teste J, Aboura A, Dupont C, Auvin S, El Khattabi L, Chantereau D, Moncla A, Tabet AC, Verloes A Duplication of the 15q11-q13 region: Clinical and genetic study of 30 new cases. *European Journal of Medical Genetics.* 2013; 57, 5e14.

39. Kleefstra T, de Leeuw N, Wolf R, Nillesen WM, Schobers G, Mieloo H, Willemsen M, Perrotta CS, Poddighe PJ, Feenstra I, Draaisma J, van Ravenswaaij-Arts CMA. Phenotypic spectrum of 20 novel patients with molecularly defined supernumerary marker chromosomes 15 and a review of the literature. *Am J Med Genet Part A.* 2010; 152A:2221–2229.

40. Plaiasu V, Ochiana D, Motei G, Georgescu A. A Rare Chromosomal Disorder – Isochromosome 18p Syndrome. *Mædica.* 2011; 6(2):132-136.

41. Sebold C, Roeder E, Zimmerman M, Soileau B, Heard P, Carter E, Schatz M, White WA, Perry B, Reinker K, O'Donnell L, Lancaster J, Li J, Hasi M, Hill A, Pankratz L, Hale DE, Cody JD. Tetrasomy 18p: Report of the molecular and clinical findings of 43 individuals. *Am J Med Genet Part A.* 2010; 152A:2164–2172.

42. Kotzot D, Bundscherer G, Bernasconi F, et al. Isochromosome 18p results from maternal meiosis II nondisjunction. *Eur J Hum Genet.* 1996; 4:168–174.

43. Irwin DL, Bryan JL, Chan FY, et al. Prenatal diagnosis of tetrasomy 18p using multiplex fluorescent PCR and comparison with a variety of techniques. *Genetic Testing.* 2003; 7:1–6.

44. Liehr T. 201 X . supernumerary marker chromosomes. <http://ssmc-tl.com/sSMC.html> (accessed 20/12/2014)

45. Abu-Amero KK, Hellani AM, Salih MA, Seidahmed MZ, Elmalik TS, Zidan G, Bosley TM. A *de novo* marker chromosome derived from 9p in a patient with 9p partial duplication syndrome and autism features: genotype-phenotype correlation. *BMC Medical Genetics.* 2010; 11:135.

46. Di Bartolo, D.L., et al.,. Characterization of a complex rearrangement involving duplication and deletion of 9p in an infant with craniofacial dysmorphism and cardiac anomalies. *Mol. Cytogenet.* 2012; 5(1):31.
47. Hulick, P.J., et al. Cytogenetic and array-CGH characterization of a complex de novo rearrangement involving duplication and deletion of 9p and clinical findings in a 4-month-old female. *Cytogenet. Genome Res.* 2009; 126(3)305–312.
48. Recalcati, M.P., et al. Complex rearrangement involving 9p deletion and duplication in a syndromic patient: genotype/phenotype correlation and review of the literature. *Gene.* 2012; 502(1):40–45.
49. Schinzel A, Schmid W, Fraccaro M, Tiepolo L, Zuffardi O, Opitz JM, Lindsten J, Zetterqvist P, Enell H, Baccichetti C, Tenconi R, Pagon RA. The “cat eye syndrome”: dicentric small marker chromosome probably derived from a no 22 (tetrasomy 22pter to q11) associated with a characteristic phenotype. Report of 11 patients and delineation of the clinical picture. *Hum Genet.* 1981; 57:148 –58.
50. Berends MJ, Tan-Sindhunata G, Leegte B, van Essen AJ. Phenotypic variability of cat-eye syndrome. *Genet Couns.* 2001; 12:23 –34.
51. Meins H, Burfeind P, Motsh S, Trappe R, Bartmus D, Langer S, Speicher MR, Mühlendyck H, Bartels I, Zoll B. Partial trisomy of chromosome 22 resulting from an interstitial duplication of 22q11.2 in a child with typical cat eye syndrome. *J Med Genet.* 2003 40:62 doi:10.1136.
52. Kotzot D. Supernumerary marker chromosomes (SMC) and uniparental disomy (UPD): coincidence or consequence? *Journal of Medical Genetics.* 2002; 39:775-778.
53. Epstein CJ In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th edn. New York: McGraw Hill. 2001; 1223 –56.
54. Valero R, Marfany G, Gil-Benso R, Ibanez MA, Lopez-Pajares I, Prieto F, Rullan G, Sarret E, Gonzalez-Duarte R. Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. *J Med Genet.* 1999; 36:694–9.

55. Rost I, Fiegler H, Fauth C, Carr P, Bettecken T, Meyer C, Enders A, Wirtz A, Meitinger T, Carter NP, Speicher MR. Tetrasomy 21 pter-q21.2 in a male infant without typical Down's syndrome dysmorphic features but moderate mental retardation. *J Med Genet.* 2004; 41:e26.
56. Liehr T, Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *International Journal of Molecular Medicine.* 2007; 19(5):719–731.
57. Manvelyan M, Riegel M, Santos M, Fuster C, Pellestor F, Mazaurik ML, Schulze B, Polityko A, Tittelbach H, Reising-Ackermann G, Belitz B, Hehr U, Christina K, Volleth M, Götde E, Anderson J, K pferling P, K hler S, Duba HC, Dufke A, Aktas D, Martin T, Schreyer I, Ewers E, Reich D, Mrasek K, Weise A, Liehr T. Thirty-two new cases with small supernumerary marker chromosomes detected in connection with fertility problems: Detailed molecular cytogenetic characterization and review of the literature. *International journal of molecular medicine.* 2008; 21:705-714.
58. Liehr T. 201X. Cases with uniparental disomy. <http://upd-tl.com/upd.html> (accessed 20/12/2014).
59. Liehr T, Klein E, Mrasek K, Kosyakova N, Guilherme RS, Aust N, Venner C, Weise A, Hamid A.B. Clinical Impact of Somatic Mosaicism in Cases with Small Supernumerary Marker Chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 2013; 139:158-163.
60. Liehr T, Karamysheva T, Merkas M, Brecevic L, Hamid AB, Ewers E, Weise A. Somatic Mosaicism in Cases with Small Supernumerary Marker Chromosomes. *Current Genomics.* 2010; 11(6):432–439.
61. Robinson, WP. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays.* 2000; 22:452–459.
62. Crolla JA, Youings SA, Ennis S, Jacobs PA. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *European Journal of Human Genetics.* 2005; 13(2):154–160.

63. Liehr T, Mrasek K, Kosyakova N, et al. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans are there B chromosomes hidden among them. *Molecular Cytogenetics*.2008; 1:article 12.
64. Vera-Carbonell A, Lopez-Exposito I, Bafalliu JA, Ballesta-Martinez M, Glover G, Llopi C, Moya-Quiles R, Suela J, Fernandez A, Guillen-Navarro E. Molecular characterization of a new patient with a non-recurrent inv Dup Del 2q and review of the mechanisms for this rearrangement. *Am J Med Genet Part A*. 2010; 152A:2670–2680.
65. Villa N, Bentivegna A, Ertel A, Redaelli S,Colombo C, Nacinovich R, Broggi F, LissoniS, Bungaro S, Addya S, Fortina P, Dalprà L. A de novo supernumerary genomicdiscontinuous ring chromosome 21 in a childwith mild intellectual disability.*Am J Med Genet Part A*. 2011; 155:1 425–1431
66. Crolla JA. FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *American Journal of Medical Genetics*. 1998; 75:367–381.
67. Schinzel A. The impact of nondijunction in humans: not only numerical chromosome aberrations, but more. www.biologia.iniba.it/eca/NEWSLETTER/NS-2/2.html, 2009. Acessado em 20/12/2014.
68. Schreck RR, Breg WR, Erlanger BF, Miller OJ. Preferential derivation of abnormal human G-group-like chromosomes from chromosome 15. *Hum Genet*. 1977; 36:1–12.
69. Van Dyke DL, Weiss L, Logan M, Pai GS. The origin and behavior of two isodicentric bisatellited chromosomes. *Am J Hum Genet*. 1977; 29:294–300.
70. Bartels I, Schlueter G, Liehr T, von Eggeling F, Starke H, Glaubitzc R, Burfeinda P. Supernumerary small marker chromosome (SMC) and uniparental disomy 22 in a child with confined placental mosaicism of trisomy 22: Trisomy rescue due to marker chromosome formation. *Cytogenet Genome Res*. 2003; 101:103–105.
71. Guediche N, Tosca L, Kara Terki A , Bas C, Lecerf L, Young J, Briand-Suleau A, Tou B, Bouligand J, Brisset S, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Goossens M,

Tachdjian G. Array comparative genomic hybridization analysis of small supernumerary marker chromosomes in human infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2012; 24, 72– 82.

72. Marle N, Martinet D, Aboura A., Joly-Helas G, Andrieux J, Flori E, Puechberty J, Vialard F, Sanlaville D, Fert Ferrer S, Bourrouillou G, Tabet AC, Quilichini B, Simon-Bouy B, Bazin A, Becker M, Stora H, Amblard S, Doco-Fenzy M, Molina Gomes D, Girard-Lemaire F, Cordier MP, Satre V, Schneider A, Lemeur N, Chambon P, Jacquemont S, Fellmann L, Vigouroux-Castera A, Mollignier R, Delaye A, Pipiras E, Liquier A, Rousseau T, Mosca AL, Kremer V, Payet M, Rangon C, Mugneret F, Aho S, Faivre L, Callier P. Molecular characterization of 39 *de novo* sSMC: contribution to prognosis and genetic counselling, a prospective study. *Clin Genet*. 2014; 85: 233–244.

73. Novelli A, Grati FR, Ballarati L, Bernardini L, Bizzoco D, Camurri L, Casalone R, Cardarelli L, Cavalli P, Ciccone R, Clementi M, Dalpr`A L, Gentile M, Gelli G, Grammatico P, Malacarne M, Nardone AM, Pecile V, Simoni G, Zuffardi O, Giardino D. Microarray application in prenatal diagnosis: a positionstatement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012; 39: 384–388.

Anexo I

Termo de consentimento livre e esclarecido

A pesquisa intitulada “Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico” pretende investigar a relação entre as alterações cromossômicas e o quadro clínico dos portadores.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância. Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4 a 8 mL de sangue de uma das veias do antebraço do paciente e seus genitores para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue será realizado por pessoa qualificada, é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto. Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Professora Doutora Íris Ferrari é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB. Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor entendimento das causas do retardo mental.

Eu, _____, profissão

_____ residente e domiciliado

em _____, portador da Cédula de Identidade,

RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em

___/___/___, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade com a participação de meu

(minha) filho(a) _____ no estudo “Investigação

da etiologia do retardo mental sindrômico”, e afirmo que obtive todas as informações que considero necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- () Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- () Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- () Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, ____ de _____ de 20__

Assinatura do participante

Dra. Íris Ferrari

Pesquisadora responsável

Telefone para contato: (61) 3307 2505