

**Samar Nasser Chehimi**

**Caracterização citogenômica da deleção do braço curto do cromossomo 5**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leslie Domenici Kulikowski

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Chong Ae Kim

**São Paulo**

**2021**

**Samar Nasser Chehimi**

**Caracterização citogenômica da deleção do braço curto do cromossomo 5**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leslie Domenici Kulikowski  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Chong Ae Kim

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Chehimi, Samar Nasser  
Caracterização citogenômica da deleção do braço  
curto do cromossomo 5 / Samar Nasser Chehimi. --  
São Paulo, 2021.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Coorientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1. Doenças raras 2. Genética humana  
3. Análise de sequência com séries de  
oligonucleotídeos 4. Síndrome do miado do gato  
5. Deleção cromossômica 6. Deleção de genes 7. Rearranjos  
genômicos 8. Estabilização citogenômica 9. Testes  
genéticos 10. Variações do número de cópias de DNA

USP/FM/DBD-025/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

# **D**EDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais, Mariam e Wissam, cujos ensinamentos, apoio e amor sempre consistiram no impulso para alcançar os meus sonhos e na força para persistir e lutar mesmo em momentos difíceis.*

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à **Deus** pela benção de me colocar em uma família maravilhosa e me apresentar a tantas pessoas boas nesta vida, que sempre somaram muito!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Leslie Kulikowski**, que é uma orientadora fantástica, compreensiva e carinhosa que eu tive a sorte de me acompanhar durante toda minha jornada. São muitos anos de imensa aprendizagem e sinergia, mas o que sempre carregarei comigo será a sua força para se manter firme e procurar soluções, mesmo quando parecerem impossíveis. Não tenho palavras para te agradecer por todo o apoio ao longo dos meus cinco anos de laboratório e pela sua imensa contribuição no meu percurso na pesquisa. Muito obrigada!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Chong Kim** por ter me recebido em seu grupo de braços abertos e por ter me apresentado a um mundo totalmente novo de doenças e síndromes raras. Além disso, estendo meus agradecimentos aos médicos geneticistas e aos residentes, principalmente ao Dr. **José Ricardo Ceroni**, pelas avaliações clínicas tão detalhadas e observadoras.

Ao **Núcleo Cri du Chat e às famílias** dos portadores da deleção de 5p por me permitirem, não somente desenvolver esse trabalho, mas também integrar um grupo em que a esperança e o amor transbordam. Vocês são a essência deste trabalho!

Ao Prof. Dr. **Nilson Assunção** por toda contribuição para desenvolver os experimentos deste trabalho e pelo suporte e parceria ao longo de todos os Encontros Anuais de *Cri du Chat*.

Ao Dr. **Hakon Hakonarson**, à Dr.<sup>a</sup> **Renata Pellegrino**, à Dr.<sup>a</sup> **Fernanda Mafra** e toda a equipe do *The Center for Applied Genomics (CAG)* por terem me acolhido tão bem durante o doutorado sanduíche e por me ensinarem na prática técnicas que eu só tinha visto nos artigos mais inovadores. Sou eternamente grata pelas aprendizagens que me proporcionaram! Agradeço também aos amigos brasileiros e estrangeiros que fiz nesse período e que foram essenciais para que eu aproveitasse ao máximo essa oportunidade.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudos para a realização do doutorado sanduíche.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Citogenômica (LIM03): **Gleyson Carvalho, Yanca Gasparini, Amom Mendes, Vanessa Tavares, Marília Montenegro, Gil Novo-Filho, Beatriz Wolff, Fabrícia Madia** e a todos que conheci por toda a ajuda nos experimentos, análise, desenvolvimento e discussões neste trabalho, mas principalmente pelas risadas, leveza e todos os doces que comemos juntos nestes anos.

À Dr.<sup>a</sup> **Évelin Zanardo** por ter me ensinado, desde meus primeiros dias no laboratório, sobre biologia molecular, amizade e paciência em todos os momentos em que mais precisei. Que venham mais viagens, congressos, conversas e áudios gigantes! Agradeço também ao Dr. **Alexandre Torchio** por ter me apresentado ao grupo de citogenômica, por ser um professor incrível e por ser um amigo com quem posso sempre contar.

Às minhas irmãs de alma, **Angelica Ramalho** e **Luíse Garcia**, por serem duas mulheres incríveis em quem me espelho sempre e que, durante os últimos anos e a pandemia, me deram a certeza de que uma amizade como a nossa sobrevive à distância e ao tempo, a terras e oceanos, aos momentos leves e pesados, sem nunca ser abalada. Estaremos sempre juntas!

Às minhas maravilhosas amigas que sempre me trouxeram luz e apoio nos momentos certos: **Caroline Ricce**, obrigada por ser meu porto seguro de desabafos e reflexões sobre a vida e carreira; **Giane Chaim**, obrigada por essa pessoa doce de personalidade forte que sempre me faz rir; **Nicole Dittrich** e **Thiele Rosales**, obrigada por serem os mais lindos presentes que Philly me deu, por todas as discussões (quase) científicas e por serem uma inspiração para mim! Agradeço a todos meus outros amigos que me fizeram companhia e me lembraram da alegria de todos os outros aspectos importantes da vida.

À minha preciosa família, especialmente aos meus avós paternos, **Mohamad** (*in memoriam*) e **Karima**, e meus avós maternos, **Ayoub** e **Zuhaf**, por tanto amor e zelo mesmo crescendo tão longe de vocês. Como disse meu avô Ayoub, escritor, “Beirute é a cidade que escreve sua história misturada ao cheiro do carinho e nostalgia; é a cidade lavada com sonhos elevados”. A saudade me dá forças todos os dias para que tenham motivos de orgulho.

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais e meus irmãos! Aos meus pais, **Mariam e Wissam**, obrigada por serem pais tão amorosos, pela compreensão nas minhas escolhas, que sempre envolvem abraçar o mundo e fazer mil coisas ao mesmo tempo. Obrigada por serem esses pilares gigantes que não se abatem diante das dificuldades da vida e por fazerem tudo (e mais um pouco) para nos darem todas as oportunidades que não tiveram. Aos meus irmãos, **Mohamad e Yara**, agradeço pelo amor, paciência e por me cobrirem quando dormia no sofá analisando resultados, lendo artigos e mexendo na tese. Vocês sempre suportaram os momentos de luta comigo e, mais que nunca, quero sempre celebrar todas as vitórias com vocês. Amo vocês mais que tudo!



**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

*“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Esse é o momento de entender mais para temer menos.”*

***Marie Curie***

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

# SUMÁRIO

## SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Resumo

*Abstract*

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
1.1	Rearranjos genômicos .....	29
1.2	Mecanismos de reparo e estabilização do DNA em regiões cromossômicas terminais deletadas .....	30
1.3	Considerações sobre a Síndrome do 5p- .....	33
1.4	Características genômicas da região de 5p.....	35
1.5	Métodos moleculares de detecção das alterações genômicas .....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
2.1	Objetivo principal.....	43
2.2	Objetivos secundários .....	43
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1	Casuística .....	45
3.2	Avaliação Clínica .....	45
3.3	Extração de DNA .....	46
3.4	Integridade e quantificação das amostras de DNA .....	46
3.5	Técnica de <i>array</i> .....	47

3.6	Análise dos dados.....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1	Dados clínicos e fenotípicos.....	51
4.2	Resultados obtidos no <i>array</i> .....	54
4.3	CNVs identificadas exclusivamente no cromossomo 5 pela técnica de <i>array</i> .....	59
4.4	CNVs identificadas em outros cromossomos pela técnica de <i>array</i> .....	65
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
5.1	Dados clínicos e fenotípicos.....	67
5.2	Resultados anteriores e resultados obtidos pelo <i>array</i> .....	74
5.3	CNVs no cromossomo 5 e correlação genótipo-fenótipo .....	77
5.4	CNVs em outros cromossomos .....	80
5.4.1	<i>Paciente 9: duplicação de 20,6 Mb em 9p</i> .....	81
5.4.2	<i>Paciente 11: duplicação de 48,2 Mb em 18q</i> .....	83
5.4.3	<i>Paciente 22: deleção de 44,5 Mb em Yq</i> .....	85
5.4.4	<i>Paciente 27: duplicação de 23,3 Mb em 2p</i> .....	86
5.4.5	<i>CNVs menores em outros cromossomos</i> .....	87
5.5	Considerações sobre os mecanismos de formação e estabilização das alterações detectadas em 5p .....	88
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>98</b>
	ANEXO A: Ficha clínica para coleta de dados sobre a Síndrome <i>Cri du chat</i> .....	98
	ANEXO B: Quadro 1 – Quadro das principais alterações clínicas coletadas.....	103
	ANEXO C: Quadro 3 – Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo <i>Infinium CytoSNP-850K BeadChip</i> <sup>®</sup> .....	106
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>130</b>

**LISTAS**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação dos mecanismos de captura telomérica responsáveis pela formação e estabilização das deleções terminais ..... 32
<b>Figura 2</b>	Representação da posição de genes haploinsuficientes e condicionalmente haploinsuficientes ..... 37
<b>Figura 3</b>	Exemplos de CNVs detectadas por meio do <i>array</i> , da plataforma Illumina, e analisados no <i>software</i> BlueFuse™. .... 40
<b>Figura 4</b>	Fluxograma contendo os resultados simplificados que os pacientes apresentavam previamente e após o <i>array</i> ..... 54
<b>Figura 5</b>	Cariótipo com bandamento G da Paciente 11, indicando o cromossomo 5 com material adicional ao final do braço curto..... 57
<b>Figura 6</b>	Cariótipo com bandamento G da Paciente 30..... 57
<b>Figura 7</b>	Imagem do cromossomo 5 completo da amostra da Paciente 30, observado no <i>array</i> , com uma pequena deleção no braço longo. .... 58
<b>Figura 8</b>	Imagem ampliada do braço curto do cromossomo 5 do Paciente 29..... 59
<b>Figura 9</b>	Resultados do MLPA ( <i>kit</i> P064-C1) realizado em amostra de DNA proveniente da mãe dos Pacientes 28 e 29..... 59
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática da extensão das deleções detectadas e os diferentes pontos de quebra alinhados com a posição genômica de genes selecionados e correlação entre genótipo-fenótipo de estudos anteriores. . 60
<b>Figura 11</b>	Destaque do 5p- observado na amostra da Paciente 5 ..... 61
<b>Figura 12</b>	Destaque do 5p- observado na amostra da Paciente 24 ..... 62
<b>Figura 13</b>	Representação gráfica dos rearranjos inferidos a partir dos dados moleculares obtidos dos pacientes que apresentavam translocações grandes entre o cromossomo 5 e outros cromossomos ..... 82
<b>Figura 14</b>	Cariótipo com bandamento G da mãe da Paciente 11 ..... 84



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Testes citogenéticos e moleculares disponíveis para a detecção de SCDC e suas indicações específicas. ....	39
<b>Tabela 2</b>	Bancos de dados e referências <i>online</i> usados no direcionamento e busca de informações e artigos científicos para a classificação das CNVs .....	49
<b>Tabela 3</b>	Levantamento dos dados disponíveis sobre período do nascimento e sexo dos portadores da síndrome. ....	51
<b>Tabela 4</b>	Tabela comparativa entre os achados clínicos dos pacientes deste estudo e em outros quatro estudos de referência.....	52
<b>Tabela 5</b>	Alterações genômicas que não envolveram o cromossomo 5, classificadas como VUS ou patogênicas, detectadas por meio do <i>array</i> .....	65

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Quadro das principais alterações clínicas coletadas .....	103
<b>Quadro 2</b>	Resultados prévios obtidos por meio de técnicas citogenéticas e moleculares diversas (cariótipo, FISH, MLPA) comparados com os resultados obtidos por meio do <i>array</i> .....	55
<b>Quadro 3</b>	Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo <i>Infinium CytoSNP-850K BeadChip®</i> .....	106
<b>Quadro 4</b>	Levantamento do conteúdo de sequências repetitivas, incluindo SDs, LINEs e SINEs, próximos aos pontos de quebra, exclusivamente no cromossomo 5 .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

arr	<i>Array</i> genômico
del	Deleção
5p-	Deleção do braço curto do cromossomo 5
Dr.	Doutor
Dr. <sup>a</sup>	Doutora
dup	Duplicação
et al.	E outros (as)
ed.	Edição
fig.	Figura
InDel	Inserção/Deleção
inv	Inversão
add	Material cromossômico adicional
n.	Número
p.	Página
pq	Ponto de quebra
Prof.	Professor
Prof. <sup>a</sup>	Professora
v.	Versão

## LISTA DE SIMBOLOS

~	Aproximadamente
p	Braço curto do cromossomo
q	Braço longo do cromossomo
cm	Centímetro
°C	Grau Celsius
=	Igual a
kb	Kilobase
kg	Kilograma
®	Marca registrada
Mb	Megabase
m	Metro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
>	Maior que
<	Menor que
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
%	Porcentagem
hg19	Referência de nucleotídeos do genoma humano
mers	Tamanho da sequência de nucleotídeos
x	Veze

## LISTA DE SIGLAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
ADNPM	Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor
AME	Alterações musculoesqueléticas
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i>
BERA	<i>Brainstem Evoked Response Audiometry</i>
BIR	<i>Break-Induced Replication</i>
CGH-array	<i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
ClinGen	<i>Clinical Genome Resource</i>
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
DECIPHER	<i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variants</i>
DI	Deficiência intelectual
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FoSTeS	<i>Fork Stalling and Template Switching</i>
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GRCh37	<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICr	Instituto da Criança
ISCA	<i>International Standards for Cytogenomic Arrays</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
LCR	<i>Low-copy repeats</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
MC	Malformação congênita
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MMBIR	<i>Microhomology-Mediated Break-Induced Replication</i>
NAHR	<i>Non-Allelic Homologous Recombination</i>

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NIPT	<i>NonInvasive Prenatal Testing</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNM	Ressonância magnética
ROH	<i>Regions of Homozygosity</i>
SCDC	<i>Síndrome Cri du chat</i>
SD	<i>Segmental duplications</i>
SINE	<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i>
SN	Sistema nervoso
SPPR	<i>Subtelomeric Pairing with Proximal Recombination</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDAH	<i>Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade</i>
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
VUS	<i>Variants of Uncertain clinical Significance</i>

# RESUMO E ABSTRACT

## RESUMO

Chehimi SN. *Caracterização citogenômica da deleção do braço curto do cromossomo 5* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A citogenômica é o estudo de alterações estruturais do DNA que revela variações no número de cópias genômicas (CNVs, do inglês, *Copy Number Variations*), que podem ser responsáveis por quadros clínicos de malformações e consequências fenotípicas aos portadores. A deleção do braço curto do cromossomo 5 (5p-) é uma alteração genômica causadora da Síndrome do 5p-, também conhecida como Síndrome *Cri du Chat*, caracterizada, principalmente, por atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, microcefalia, baixa estatura, hipertelorismo ocular e deficiência intelectual. Neste trabalho, avaliamos trinta (30) amostras de DNA de pacientes com 5p-, previamente diagnosticados por cariótipos com bandamento G, FISH e/ou MLPA, utilizando a técnica de *array* genômico (*Infinium CytoSNP-850K BeadChip*<sup>®</sup> - Illumina) para delinear o ponto de quebra genômico e caracterizar os rearranjos estruturais relacionados ao fenótipo clínico. Os nossos resultados revelaram alterações estruturais em 5p que incluíam: deleções terminais puras (23), inversão pericêntrica (1), deleção intersticial (1), rearranjo terminal envolvendo uma deleção seguida de duplicação em 5p (1) e deleções e duplicações concomitantes com outros cromossomos (4). Dentre os pacientes com os rearranjos entre dois cromossomos, observamos um caso *de novo* entre os cromossomos 5 e 9 (arr[GRCh37] 5p15.33p14.1(25328\_25351609)x1; 9p24.3p21.3(46587\_20642438)x3), uma translocação *de novo* entre os cromossomos Y e 5 (arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(22149\_17812007)x1, Yq11.21q12(14852740\_59335913)x0), um rearranjo entre os cromossomos 2 e 5 (arr[GRCh37] 2p25.3p24.1 (12770\_23337574)x3, 5p15.33p15.1(113576\_15713132)x1), e entre os cromossomos 5 e 18 (arr[GRCh37] 5p15.33p14.2(113576\_24272820)x1, 18q12.1q23(29782990\_78013728)x3). Essa última alteração foi herdada de forma materna por meio de um rearranjo complexo entre os cromossomos 5, 10 e 18, sendo transmitido há, no mínimo, três gerações familiares. A caracterização molecular por *array* genômico também permitiu avaliar a contribuição da patogenicidade de 197 CNVs detectadas, bem como a alta incidência de sequências do tipo LINE, próximas aos pontos de quebra da deleção, que sugerem rearranjos mediados, principalmente, por NAHR (do inglês, *Non-*



*Allelic Homologous Recombination*). A correlação entre os pontos de quebra moleculares e o quadro clínico dos pacientes possibilitou inferir uma nova localização genômica terminal em 5p, inédita na literatura, associada ao choro típico da síndrome e à microcefalia. Ainda, compilamos informações fenotípicas clinicamente relevantes dos trinta pacientes avaliados, contribuindo para a formação de um banco de dados brasileiros de portadores de 5p-. A caracterização citogenômica da deleção do braço curto do cromossomo 5 teve um impacto direto no diagnóstico dos pacientes e suas famílias, e ajudou a aprimorar a correlação genótipo-fenótipo nessa síndrome.

**Descritores:** Doenças raras; Genética humana; Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos; Síndrome do miado do gato; Deleção cromossômica; Deleção de genes; Rearranjos genômicos; Estabilização citogenômica; Testes genéticos; Variações do número de cópias de DNA.

## ABSTRACT

Chehimi SN. *Cytogenomic characterization of the deletion of the short arm of chromosome 5* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Cytogenomics is the study of structural changes in DNA that reveals genomic copy number variations (CNVs), which may be responsible for clinical features of malformations and phenotypic consequences for carriers. The deletion of the short arm of chromosome 5 (5p-) is a genomic alteration causative of the 5p- syndrome, also known as Cri du Chat syndrome, mainly characterized by a delay in the neuropsychomotor development, microcephaly, short stature, ocular hypertelorism and intellectual disability. In this work, we evaluated thirty (30) DNA samples from patients with 5p-, previously diagnosed by G-banded karyotypes, FISH and/or MLPA, using the genomic array technique (Infinium CytoSNP-850K BeadChip® - Illumina) to outline the genomic breakpoint and characterize structural rearrangements related to the clinical phenotype. Our findings revealed structural changes in 5p that included: pure terminal deletions (23), pericentric inversion (1), interstitial deletion (1), terminal rearrangement involving a deletion followed by duplication in 5p (1) and concomitant deletions and duplications with other chromosomes (4). Among the patients with rearrangements between two chromosomes, we observed a *de novo* case between chromosomes 5 and 9 (arr[GRCh37] 5p15.33p14.1(25328\_25351609)x1, 9p24.3p21.3(46587\_20642438)x3), a *de novo* translocation between Y and 5 chromosomes (arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(22149\_17812007)x1, Yq11.21q12(14852740\_59335913)x0), a rearrangement between chromosomes 2 and 5 (arr[GRCh37] 2p25.3p24.1(12770\_23337574)x3, 5p15.33p15.1(113576\_15713132)x1), and between chromosomes 5 and 18 (arr[GRCh37] 5p15.33p14.2(113576\_24272820)x1, 18q12.1q23(29782990\_78013728)x3). This last alteration was maternally inherited through a complex rearrangement between chromosomes 5, 10 and 18 that has been transmitted for at least three family generations. The molecular characterization by genomic array also allowed to evaluate the contribution of the pathogenicity of 197 detected CNVs, as well as the high incidence of LINE sequences that surrounded the breakpoints of the deletion, which suggest rearrangements mediated mainly by NAHR (Non-Allelic Homologous Recombination). The correlation between the molecular breakpoints and the clinical features

of the patients made it possible to infer a new terminal genomic region in 5p, unprecedented in the literature, associated with the typical cry of the syndrome and microcephaly. We also compiled clinically relevant phenotypic information from the thirty patients evaluated, contributing to the formation of a Brazilian database of 5p patients. The cytogenomic characterization of the deletion of the short arm of chromosome 5 had a direct impact on the diagnosis of patients and their families, and helped to improve the genotype-phenotype correlation in this syndrome.

**Descriptors:** Rare diseases; Human genetics; Oligonucleotide array sequence analysis; Cri-du-chat syndrome; Chromosome deletion; Gene deletion; Genomic rearrangements; Cytogenomic stabilization; Genetic tests; DNA copy number variations.

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A literatura mostra que o estudo citogenômico detalhado de alterações estruturais no DNA pode ajudar a revelar as características da arquitetura do genoma que impactam diretamente no fenótipo clínico, bem como elucidar os mecanismos que produzem esses desequilíbrios (Luo et al., 2011). Assim a investigação molecular detalhada de diferentes síndromes, ao longo dos anos, tem contribuído para o entendimento da relação genótipo-fenótipo, para o esclarecimento das famílias e ao mesmo tempo pode auxiliar na busca de um tratamento mais efetivo para as doenças genômicas.

### 1.1. Rearranjos genômicos

Alterações submicroscópicas na arquitetura do DNA podem ocorrer em qualquer parte do genoma de um indivíduo, sendo responsáveis pela manifestação de diversas síndromes e doenças, com impacto funcional, ou caracterizar variações populacionais benignas e contribuições para a diferença genômica entre os indivíduos, sem consequências fenotípicas aparentes aos portadores (Sebat et al., 2004).

Essas alterações favorecem o surgimento de diversos tipos de rearranjos, como, por exemplo, inversões e translocações balanceadas (que não envolvem perda ou ganho de material genético) e deleções e duplicações. Essas duas últimas englobam as variações no número de cópias gênicas (CNVs, do inglês, *Copy Number Variation*). As CNVs são caracterizadas por anormalidades genômicas e/ou cromossômicas, em decorrência de perdas ou ganhos de material genético, cujos tamanhos variam de algumas centenas de pares de bases a milhões de pares de bases (Mb), e representam, majoritariamente, a origem de uma gama de síndromes malformativas, associadas ao atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) e deficiência intelectual (DI) que aparentemente não possuem uma etiologia definida (Redon et al., 2006; Luo et al., 2011).

Sabe-se que determinadas regiões no genoma humano estão mais suscetíveis a sofrerem quebras e rearranjos estruturais como as CNVs, e diversos fatores podem contribuir para essa maior suscetibilidade, tais como a presença de repetições em *tandem*

(curtas sequências de DNA repetidas até milhares de vezes) nas porções terminais cromossômicas; sítios frágeis do DNA; regiões de LCRs (do inglês, *Low-Copy Repeats*), também conhecidas como *segmental duplications* (SD), que são pequenas sequências repetitivas com mais de 95% de similaridade frequentemente encontradas em regiões centroméricas e teloméricas; e *hotspots* em regiões subteloméricas (Myers, 2007; Luo et al., 2011; Guilherme et al., 2015).

As porções cromossômicas terminais, que englobam os subtelômeros e telômeros, são constituídas por sequências altamente repetitivas que garantem a estabilidade mitótica no processo da divisão celular (Miller et al., 2010; Luo et al., 2011). Uma vez que essas regiões estão encarregadas por manter uma estabilidade estrutural, sua perda nas deleções provoca instabilidade cromossômica, favorecendo o desequilíbrio genômico e a condição a processos apoptóticos. Assim, essa deleção pode responder por estigmas síndrômicos característicos sendo necessário suprir a ausência telomérica com algum mecanismo de reposição ou reconstituição genômica (Cervantes e Lundblad, 2002; Ballif et al., 2004).

## **1.2. Mecanismos de reparo e estabilização do DNA em regiões cromossômicas terminais deletadas**

Em consequência às quebras na dupla fita de DNA, podem ocorrer deleções de regiões cromossômicas e diversos mecanismos de correção e estabilidade estrutural dos telômeros podem surgir para reparar o dano.

Dentre as funções principais dos telômeros, está a manutenção da estabilidade cromossômica, impedindo recombinações homólogas durante a replicação e degradação da porção terminal dos cromossomos (Meyne et al., 1989; Cervantes e Lundblad, 2002; Mefford e Trask, 2002). Adjacentes aos telômeros estão as regiões chamadas de subteloméricas, que possuem sequências distintas para cada um dos diferentes cromossomos e que contém grande concentração de genes, constituindo uma alta diversidade fenotípica pelos polimorfismos encontrados e mediando rearranjos deletérios devido à homologia das regiões subteloméricas (Mefford e Trask, 2002).

A resposta primária à exposição do telômero e da região final cromossômica é a cicatrização por meio da ação da enzima telomerase. A telomerase adiciona sequências teloméricas repetitivas, sem a incorporação das sequências dos subtelômeros, para proteger a extremidade exposta e promover a estabilidade do ciclo celular (Varley et al.,

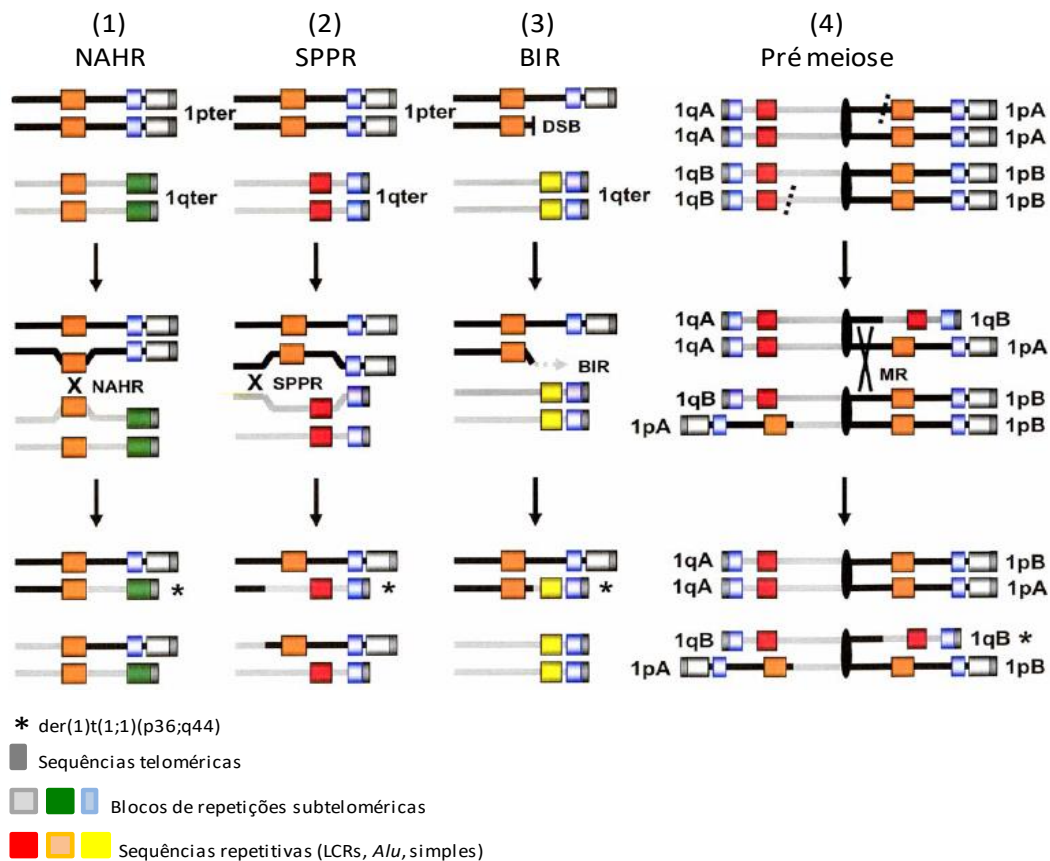
2000; Cervantes e Lundblad, 2002). Como consequência, ocorrem as sínteses de novos telômeros, formando neotelômeros, identificados por meio do sequenciamento dos pontos de quebra (Guilherme et al., 2015).

Ademais, outros mecanismos baseados em recombinações podem ocorrer para a estabilidade genômica. Um desses métodos alternativos para a correção de quebras na dupla fita de DNA é a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês, *Non-Homologous End-Joining*) dos telômeros, com ligação das extremidades expostas, para remover a sinalização da região danificada. No entanto, isso provoca instabilidade nas divisões celulares pela fusão dos cromossomos, podendo levar ao surgimento de InDels, pequenas deleções e/ou inserções (Burma et al., 2006; Lieber, 2008).

Outra forma de estabilização de deleções terminais é a aquisição de sequências teloméricas repetitivas da porção final de outros cromossomos juntamente com as respectivas regiões subteloiméricas, formando cromossomos derivados, que possibilitam a replicação do cromossomo e segregação celular normal (Varley et al., 2000; Ballif et al., 2004). A captura de telômeros para reparar a deleção pode ocorrer entre cromátides-irmãs ou entre cromossomos homólogos e não homólogos, e esse mecanismo pode gerar rearranjos constitucionais crípticos (Ballif et al., 2004). Utilizando sondas específicas para regiões subteloiméricas, Ballif et al. (2000) identificaram deleções terminais estabilizadas por captura de telômeros em 17% de 60 pacientes, demonstrando que esse mecanismo ocorre em uma proporção significativa.

Alguns mecanismos moleculares que resultam na captura telomérica para geração e estabilização das porções terminais deletadas já foram sugeridos (Fig. 1): 1) rearranjos cromossômicos na porção final deletada por meio de uma recombinação homóloga não-alélica (NAHR, do inglês, *Non-Allelic Homologous Recombination*) entre LCRs (Stankiewicz e Lupski, 2002); 2) recombinação ectópica por pareamento subteloimérico entre finais cromossômicos não-homólogos em LCRs distantes, seguidos de eventos recombinatórios em regiões mais proximais (mecanismo denominado SPPR, do inglês, *Subtelomeric Pairing with Proximal Recombination*) (Mefford e Trask, 2002); 3) captura de um novo telômero por meio da cópia de sequências teloméricas homólogas de um cromossomo pré-existente no final do cromossomo deletado por meio de um processo de replicação induzida por quebra (BIR, do inglês, *Break-Induced Replication*) resultando em uma translocação não-recíproca (Kolodner et al., 2002); 4) geração de cromossomos com porções finais deletadas que são estabilizadas por sequências

teloméricas originadas do telômero da extremidade oposta à deleção, gerando duplicação dessa região, por meio de troca pré-meióticas com recombinação meiótica posterior (Pennaneach et al., 2006).



**Figura 1** – Representação dos mecanismos de captura telomérica responsáveis pela formação e estabilização das deleções terminais: (1) Modelo de NAHR, representado pelas regiões terminais do cromossomo 1, no qual o  $\text{der}(1)\text{t}(1;1)(\text{p}36;\text{q}44)$  seria formado pela recombinação entre LCRs (quadrado laranja) que estão localizadas em 1pter e 1qter. (2) Modelo de SPPR, no qual ocorre o alinhamento entre as regiões terminais subtelo-méricas não-homólogas em regiões subtelo-méricas homólogas (quadrado azul) próximas, resultando em uma translocação recíproca sem a presença de LCRs nos pontos de quebra. (3) Modelo de BIR, provocado pela quebra na dupla fita de DNA que é reparada ao invadir e replicar a sequência de outros terminais cromossômicos. (4) Modelo de troca intercromossômica pré-meiótica, indicada pelas linhas pontilhadas, com recombinação meiótica entre cromossomos homólogos (1pterA e 1qterB) resultando na formação de um cromossomo  $\text{der}(1)$  com deleção 1pter e duplicação 1q (figura adaptada de Ballif et al., 2004)

Esses mecanismos que geram cromossomos rearranjados, com deleções e duplicações, podem provocar diversos tipos de desarranjos genômicos como alterações na dosagem gênica, disrupção de genes haploinsuficientes, fusão de genes que podem



provocar novas sequências codificantes, alterações na posição de regiões que impactam na regulação da expressão gênica, expressão de alelos recessivos, entre outros (Lupski e Stankiewicz, 2005).

No caso de translocações não balanceadas intercromossômicas, os mecanismos estabilizadores mais frequentes são NHEJ ou replicação induzida por quebras mediada por microhomologia (MMBIR, do inglês, *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*), uma vez que estudos relataram que a maior parte das junções dos pontos de quebra apresentava microhomologia, sequências curtas inseridas e sequências repetitivas parálogas. Contudo, houve rearranjos mediados por NAHR, mediante a presença de sequências maiores de homologia (>1 kb), sendo esta a característica mais comum nos pontos de quebra, e com menor frequência de sequências *Alu* (Boone et al., 2014; Weckselblatt e Rudd, 2015).

Compreender o perfil e características das sequências que circundam os pontos de quebra pode esclarecer o mecanismo envolvido na estabilização das extremidades expostas (Ballif et al., 2000; Ballif et al., 2004; Schmutz et al., 2004).

Assim sendo, rearranjos na estrutura dos cromossomos e detecção de CNVs já foram associados, utilizando-se diversas técnicas moleculares e plataformas de *array*, a variadas síndromes que envolvem ADNPM, DI e malformações congênitas (MC), incluindo a síndrome da deleção do braço curto do cromossomo 5 (5p-) (Overhauser et al., 1994; Veltman et al., 2002; Slavotinek, 2008; Vissers et al., 2010; Cooper et al., 2011).

### **1.3. Considerações sobre a Síndrome do 5p-**

A síndrome do 5p-, também conhecida como Síndrome *Cri du chat* (SCDC – OMIM #123450) ou monossomia de 5p, é caracterizada por uma deleção parcial (terminal e/ou intersticial) do braço curto do cromossomo 5, na qual os pacientes apresentam somente uma cópia de um fragmento ou do braço curto inteiro. Essa síndrome envolve a deleção de genes contíguos, ocorrendo em uma frequência populacional mundial de 1:15.000 a 1:50.000 em nascidos vivos (Niebuhr, 1978; Higurashi et al., 1990).

A síndrome foi descrita pela primeira vez em 1963 por Lejeune e colaboradores, sendo assim denominada porque os recém-nascidos com a síndrome apresentavam um choro agudo semelhante ao miado de gato.

As características clínicas dos pacientes acometidos são choro estridente, assimetria facial, perímetro cefálico reduzido (microcefalia), face arredondada ao

nascimento, dobras epicânticas, estrabismo, má formação da laringe, hipertelorismo ocular, hipotonia, orelhas de implantação baixa, ponte nasal proeminente, pregas únicas nas mãos (sulco simiesco) e atraso no crescimento e desenvolvimento, entre outras. Podem também apresentar MC cardíacas, neurológicas e multissistêmicas (Niebuhr, 1978; Mainardi et al., 2001).

Diversos autores relataram mudanças fenotípicas e comportamentais nos pacientes com 5p- ao longo do desenvolvimento: o rosto arredondado se tornou mais alongado e fino, houve maior indício de macrostomia, casos de automutilação e agressividade foram evidenciados e alguns pacientes que eram hipotônicos ficaram hipertônicos com dificuldade para caminhar (Cornish e Pigram, 1996; Van Buggenhout et al., 2000; Collins e Cornish, 2002; Santo et al., 2016). O amplo espectro fenotípico da síndrome já foi associado a diagnósticos diferenciais para a síndrome de Angelman (Van Buggenhout et al., 2000) e a síndrome de Silver-Russell (Vado et al., 2018), quando há a ausência das características patognomônicas, sobreposição de fenótipos ou mudanças fenotípicas ao longo do crescimento do indivíduo.

Com o crescimento desse portador, a presença do choro típico ao nascimento esteve associada a um maior comprometimento de fala e aprendizagem. Porém, apesar de mudanças nas características clínicas com o passar dos anos, o atraso de crescimento se mantém, resultando em pacientes com baixa estatura, microcefalia, pouco ganho de peso corpóreo e escoliose na idade adulta (Van Buggenhout et al., 2000).

A maioria dos casos (80-90%) de portadores da SCDC é de rearranjos genômicos *de novo*, mas em cerca de 10-15% os rearranjos são herdados de translocações balanceadas de um dos pais, preferencialmente de origem paterna. Em menor frequência, a SCDC ocorre por rearranjos cromossômicos complexos, como anéis e inversões (Niebuhr, 1978; Mainardi et al., 2001; Mainardi et al., 2006) e ainda de forma mais rara, pode ocorrer pela presença de uma baixa porcentagem de células contendo rearranjos em 5p em mosaicismo gonadal (Alkaya et al., 2020).

As deleções são geralmente terminais (80-90%) e em cerca de 3-5% são intersticiais e os pontos de quebra no cromossomo 5 podem variar desde grandes porções do braço curto a somente a região p15.3. Deleções maiores já foram relacionadas a consequências fenotípicas mais graves (Niebuhr, 1978; Mainardi et al., 2006).

Determinadas regiões no braço curto do cromossomo 5 já foram associadas diretamente a uma característica específica, tal como a região 5p15.2, ligada aos

dismorfismos faciais e dificuldades intelectuais, sendo considerada a região crítica para as características fenotípicas da síndrome, e a região 5p15.3 para o choro semelhante ao miado de gato e atraso na fala (Overhauser et al., 1994; Gersh et al., 1995). Contudo, estudos moleculares têm se mostrado de importância crítica para elucidar completamente a composição genômica dessas regiões e inferir correlações genótipo-fenótipo mais precisas.

#### 1.4. Características genômicas da região de 5p

O cromossomo 5 é um dos maiores cromossomos humanos, possuindo cerca de 180 Mb de tamanho com 827 *locus* gênicos já conhecidos, e que, no entanto, possui uma das menores densidades gênicas dentre os cromossomos. Apesar disso, a existência de grandes porções altamente conservadas de regiões não codificadoras indicam a possibilidade de regulação da expressão gênica à distância (Schmutz et al., 2004).

Contudo, variadas doenças e síndromes já foram associadas a variações em base única e desequilíbrios genômicos no cromossomo 5, como a disqueratose congênita (Armanios et al., 2005); doença de Parkinson (Foroud et al., 2006); atrofia muscular espinhal (Sun et al., 2005), além da anteriormente citada SCDC.

Focando especificamente no braço curto do cromossomo 5, a região de interesse desse trabalho, cinco genes (*TERT*, *SEMA5A*, *MARCH6*, *CTNND2* e *NPR3*) foram considerados haploinsuficientes, baseando-se na contribuição da dosagem desses genes em hemizigose para o fenótipo da SCDC (Nguyen et al., 2015).

Os genes *SEMA5A* e *CTNND2* estão relacionados ao desenvolvimento cerebral e migração de neurônios e a hemizigosidade destes pode dificultar esse processo e levar à DI e comportamentos do espectro autista (Duan et al., 2014). O gene *CTNND2* (do inglês, *δ-Catenin*), localizado na região 5p15.2 e que inicialmente foi descrito como proteína neuronal, já foi diretamente relacionado à deficiência intelectual e a perda hemizigótica configurou em um quadro sintomático mais agravado (Medina et al., 2000). Atualmente, sabe-se que esse gene está relacionado à adesão celular por meio de interação com proteínas reguladas por cálcio, além de estar envolvido na regulação sináptica, especialmente nos processos de aprendizagem e expressão de emoções (Lu et al., 2016).

Além disso, próximo à localização genômica do gene *CTNND2*, está presente o gene *SEMA5A* (do inglês, *semaphorin F*), envolvido na repulsa dos sinais de orientação dos axônios no desenvolvimento cerebral embrionário; uma única cópia do gene

interrompe sinais regulatórios para a geração de neurônios pós-mitóticos, reduzindo drasticamente sua quantidade e aumentando a proliferação de precursores neuronais (Simmons et al., 1998).

O gene *MARCH6* foi associado ao choro característico da síndrome, juntamente com o gene *FLJ25076*, que está envolvido na mesma via de sinalização. O gene *FLJ25076* está altamente expresso em tecidos torácicos e escapulares, além de estar envolvido no processo de degradação proteica, possuindo um papel no desenvolvimento das características faciais e dismorfismos esqueléticos (Wu et al., 2005).

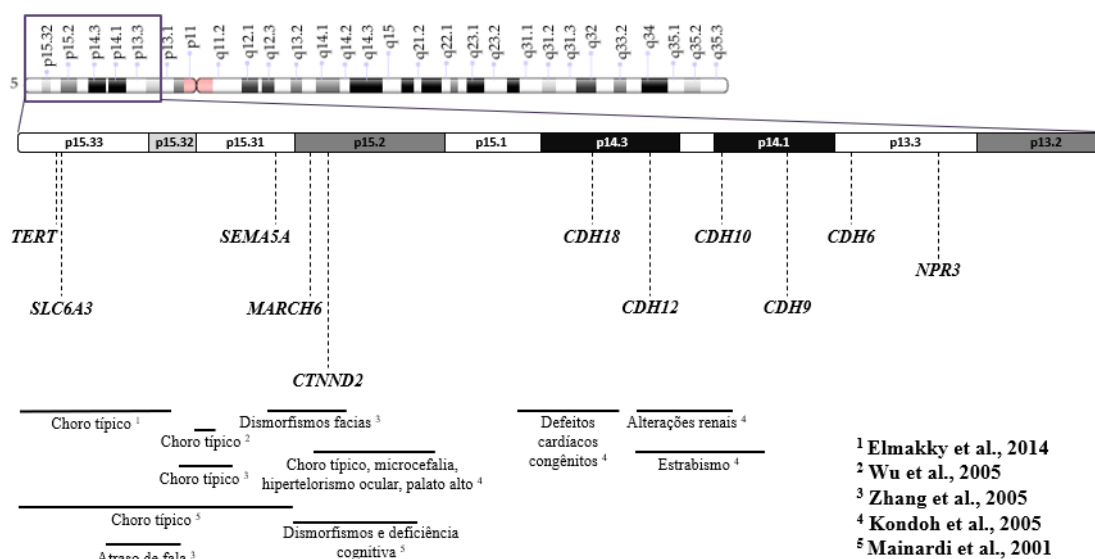
A deleção do gene *TERT* e sua heterozigiosidade estão relacionados a falhas na manutenção do comprimento do telômero e alterações fenotípicas em adultos, como o cabelo grisalho precoce (Zhang et al., 2003). Mutações no gene *TERT* também podem estar relacionados ao desenvolvimento de disqueratose congênita de padrão autossômico dominante, síndrome relacionada à falha na medula óssea e cujas manifestações ocorrem quando há encurtamento crítico dos telômeros (Armanios et al., 2005; Du et al., 2007).

O gene *NPR3* está relacionado, em ratos, ao aumento de pressão sanguínea e hipertensão, independente do consumo de sal, mas o efeito de sua haploinsuficiência em humanos permanece incerto (Kuang et al., 2017).

Além desses genes, Nguyen et al. (2015) destacaram outros genes como condicionalmente haploinsuficientes, ou seja, que apresentam algum fator de risco para a doença: *SLC6A3*, *CDH18*, *CDH12*, *CDH10*, *CDH9*, *CDH6*. A Figura 2 representa a posição desses genes haploinsuficientes e condicionalmente haploinsuficientes, juntamente com correlações genótipo-fenótipo estabelecidas anteriormente.

O gene *SLC6A3*, também conhecido como *DAT*, é um gene responsável pelo transporte de dopamina e regulador da neurotransmissão dopaminérgica. Mutações nesse gene estão relacionadas a diferenças individuais nos sintomas de transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (Tong et al., 2015).

Os genes *CDH18*, *CDH12*, *CDH10*, *CDH9*, *CDH6* compõem um *cluster* em 5p proveniente de uma família de caderinas envolvida na adesão celular e comunicação intercelular, mantendo assim a integridade das células, inclusive com implicações como supressor tumoral e de metástases (Chalmers et al., 1999). Em 3100 pacientes avaliados para identificar fatores genéticos de risco para comportamentos do espectro autista, os genes *CDH9* e *CDH10* se destacaram como altamente suscetíveis à manifestação do espectro autista (Wang et al., 2009).



**Figura 2** – Representação da posição de genes haploinsuficientes e condicionalmente haploinsuficientes (Nguyen et al., 2015), juntamente com correlações genótipo-fenótipo estabelecidas anteriormente (Mainardi et al., 2001; Kondoh et al., 2005; Zhang et al., 2005; Wu et al., 2005; Elmakky et al., 2014)

Em adição às investigações dos genes, os produtos proteicos têm recebido atenção. Um estudo mais recente, investigou a interação de redes de proteínas que poderiam estar associadas à SCDC na região crítica de 5p15.3-p15.2 a partir de dados clínicos, caracterização molecular e biologia de sistemas de seis pacientes (deleções de tamanho variando de 11,2 Mb a 28,6 Mb) e apontou novas proteínas candidatas quanto à sua contribuição para o fenótipo dos portadores, por meio de uma abordagem integrativa entre a citogenética clássica, molecular e bioinformática. Essas proteínas são CCT5, TPPP, MED10, ADCY2, MTRR, CEP72, NDUFS6 e MRPL36 (Corrêa et al., 2019).

Outra característica marcante do cromossomo 5, além da baixa densidade gênica relatada, é a abundância de sequências repetitivas. O conteúdo de sequências repetitivas corresponde à 46,3% da concentração total de nucleotídeos no cromossomo, sendo que as sequências repetitivas mais frequentes são os elementos nucleares longos intercalados (LINEs, do inglês, *Long Interspersed Nuclear Elements*) com capacidade de serem retrotransposons e atuarem como elementos móveis no genoma, seguidos das sequências *Alu*, incluídas na categoria de elementos nucleares curtos intercalados (SINEs, do inglês, *Short Interspersed Nuclear Elements*) (Schmutz et al., 2004).

### 1.5. Métodos moleculares de detecção das alterações genômicas

Para melhor delineamento molecular e identificação das alterações na arquitetura genômica, diversas técnicas foram desenvolvidas e aprimoradas, principalmente para detectar os rearranjos submicroscópicos (Stankiewicz, 2002; Slavotinek, 2008).

Durante a gestação, há testes moleculares para avaliar possíveis aneuploidias ou alterações cromossômicas e genômicas, de acordo com as suspeitas clínicas e riscos para a gestação. Um desses é o teste pré-natal não invasivo, NIPT (do inglês, *NonInvasive Prenatal Testing*) indicado em casos de idade materna avançada (>35 anos); histórico familiar prévio de alterações genômicas; translocações parentais (equilibradas ou robertsonianas) previamente detectadas; e resultados anormais de testes maternos gestacionais ou ultrassons (Greeley, Kessler e Vohra, 2015).

Há também testes pré-natais de caráter mais invasivo, como a amniocentese, biópsia das vilosidades coriônicas e cordocentese que podem detectar a presença de SCDC, mas que implicam em riscos para a gestação, e por isso devem ser avaliados e selecionados com cautela diante das informações, necessidade e indicações clínicas (Akolekar et al., 2015).

As investigações em relação a anormalidades cromossômicas são mais frequentes após o nascimento da criança. Nesses casos, recorre-se a outras técnicas moleculares mais comuns e com alta resolução diagnóstica conforme a suspeita e o critério clínico (Tabela 1).

Em casos com deleções maiores que 5 Mb, o diagnóstico é feito por técnicas de citogenética clássica, como cariótipo com bandamento G. Entretanto, essa técnica não possui resolução suficiente para esclarecer rearranjos e deleções menores, além de dificultar a precisão nos pontos de quebra envolvidos (Veltman et al., 2002).

Deleções menores que 5 Mb podem ser identificadas por meio de técnicas moleculares combinadas ou individuais, tais como FISH (do inglês, *Fluorescence In Situ Hybridization*), MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e *array* genômico.

A técnica de FISH consiste na hibridação e emparelhamento de sondas fluorescentes a uma região-alvo do DNA identificando, dessa forma, alterações em regiões específicas, como as deleções, as duplicações, as inversões, as translocações e outros rearranjos estruturais (Pinkel et al., 1986; Ballif et al., 2000). A técnica de MLPA

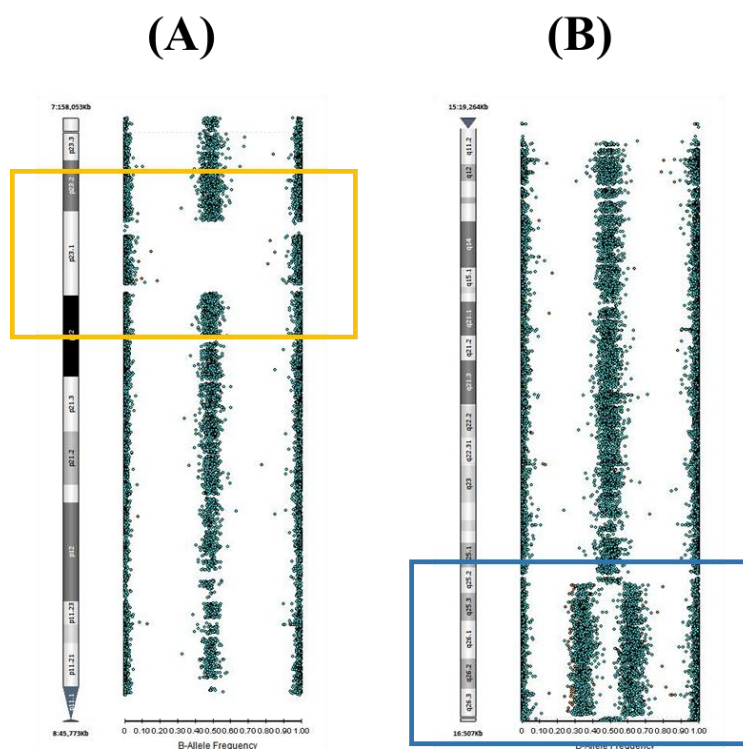
consiste na identificação simultânea de variações no número de cópias de 40 a 50 regiões em um único experimento, sendo assim uma ferramenta de ótimo custo-benefício em casos em que há uma suspeita clínica abordada por um dos *kits* comerciais disponíveis (Schouten et al., 2002; Zanardo et al., 2017).

**Tabela 1** - Testes citogenéticos e moleculares disponíveis para a detecção de SCDC e suas indicações específicas

<b>Técnica</b>	<b>Resolução de detecção</b>	<b>Em que situação recorrer à técnica?</b>
<b>Cariótipo com bandamento G</b>	Alterações estruturais ou CNVs envolvendo segmentos maiores que 5-10 Mb	Teste de triagem e confirmação da suspeita clínica (não necessita de uma indicação clínica bem delimitada), recorrência na família, translocações parentais
<b>FISH</b>	Alterações estruturais ou CNVs envolvendo segmentos menores que 5 Mb; rearranjos entre dois ou mais cromossomos	Confirmação da suspeita clínica (necessita de uma indicação clínica bem delimitada para seleção da região-alvo), translocações parentais, inversões e outras alterações estruturais
<b>MLPA</b>	CNVs envolvendo segmentos pequenos, menores que 5 Mb	Confirmação da suspeita clínica (necessita de uma indicação clínica bem delimitada para seleção do <i>kit</i> -alvo; sem indicação clínica pode-se recorrer a um <i>kit</i> de microdeleções e microduplicações mais frequentes)
<b>Array genômico</b>	CNVs envolvendo segmentos pequenos, entre alguns kb a milhões de pares de bases	Teste de triagem e confirmação da suspeita clínica (não necessita de uma indicação clínica bem delimitada); pode detectar alterações em outras regiões além do 5p
<b>Sequenciamento de nova geração</b>	Alterações em bases únicas e pontos de quebra específicos	Em casos de fenótipo que sobrepõe SCDC e outras síndromes causadas por variantes genômicas e InDels

**Legenda:** FISH – do inglês, *Fluorescence In Situ Hybridization*; Kb – Kilobases; Mb – Megabases; MLPA – do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

O *array* genômico é uma técnica de alta resolução de análise total do genoma para a detecção de ganhos e perdas submicroscópicas. Em uma lâmina ou *chip* há a disposição de milhares de sondas de oligonucleotídeos, contendo sequências complementares a regiões do genoma todo, marcados com fluorescência, nos quais o DNA do paciente se ligará em caso de complementariedade, e posteriormente a análise é realizada em *software*, verificando a fluorescência emitida para a detecção de CNVs (Veltman et al., 2002; Slavotinek, 2008). Sendo assim, por meio do *array*, detectam-se CNVs a partir das sondas incluídas na lâmina de hibridação selecionada e por meio da detecção da fluorescência emitida por essas sondas (Figura 3).



**Figura 3** – Exemplos de CNVs detectadas por meio do *array*, da plataforma Illumina, e analisados no *software* BlueFuse™. (A) Deleção no braço curto do cromossomo 8, destacada pelo retângulo amarelo; (B) Duplicação no braço longo do cromossomo 15, destacada pelo retângulo azul. Imagens provenientes do Laboratório de Citogenômica, LIM03, cortesia da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leslie Domenici Kulikowski

Pela sua alta resolução e capacidade de investigação de alterações em todo o genoma em um único experimento, o *array* genômico é a indicação inicial de triagem para casos sem causa específica para ADNPM, DI, transtornos do espectro autista e múltiplas anomalias congênitas. Manuais de orientação à interpretação de CNVs já foram publicados por órgãos internacionais como o *American College of Medical Genetics* (ACMG), *Association for Molecular Pathology* (AMP), *Clinical Genome Resource* (ClinGen) de modo a estabelecer critérios de padronização de análise e classificação ao redor do mundo e de forma que os resultados possuam uma nomenclatura única e interpretada sem maiores vieses (Manning et al., 2010; Miller et al., 2010).

São poucas as publicações que utilizam o teste de *array* para investigação da deleção em 5p e outras alterações concomitantes. Santo et al. (2016) avaliaram 6 pacientes com 5p- usando o teste de CGH-*array* (do inglês, *Array Comparative Genomic Hybridization*) que evidenciou deleções com múltiplos pontos de quebra, variando entre



as regiões 5p15.2p13 em 6 pacientes, além de identificar uma dup(8)(p23.3-p23.2) benigna em um deles, que não havia sido relatada anteriormente em outros testes.

A caracterização citogenômica detalhada em amostras de pacientes portadores da SCDC, utilizando diferentes metodologias, elucidou aspectos genômicos relevantes e inéditos associados à variabilidade fenotípica apresentada nesta síndrome. Sendo assim, a investigação citogenômica nestes portadores revela características estruturais não perceptíveis em cariótipos e pode elucidar os mecanismos de reparo e estabilização dos telômeros nos segmentos terminais deletados.

Além disso, utilizando-se da combinação entre a técnica de *array* associada à análise bioinformatizada dos resultados, se alcança melhor delineamento de regiões críticas para a síndrome, maior precisão nos pontos de quebra no cromossomo 5 e uma correlação genótipo-fenótipo mais acurada. Ao mesmo tempo, considerando como modelo a deleção do braço curto do cromossomo 5, a investigação citogenômica proporciona uma compreensão mais acurada dos mecanismos capazes de estabilizar a arquitetura do DNA e que pode ser aplicada para outras síndromes causadas por decorrência de CNVs.

# OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo principal

- Caracterizar a região da deleção de 5p utilizando técnicas citogenômicas.

### 2.2. Objetivos secundários

- Delinear os pontos de quebra das CNVs detectadas por meio do *array*;
- Investigar a presença de translocações equilibradas e inversões, por meio do cariótipo com bandamento G e/ou FISH e/ou MLPA;
- Classificar todas as CNVs detectadas, relacionando-as aos achados clínicos de cada paciente;
- Inferir possíveis mecanismos responsáveis pela estabilização das alterações nos casos estudados.

# MÉTODOS

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

Para este trabalho, inicialmente, dispúnhamos de 55 (cinquenta e cinco) amostras de pacientes com diagnóstico clínico prévio da SCDC por meio do cariótipo com bandamento G, MLPA e/ou FISH ou indicação de forte suspeita clínica (como, por exemplo, o choro semelhante a um miado ao nascimento). Destes, muitos não possuíam dados clínicos e descrição detalhada. Assim, os pacientes foram reconvocados pela Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HCFMUSP) e/ou contatados em encontros anuais promovidos pelo Núcleo *Cri du Chat* (São Caetano do Sul –SP) para a coleta destes dados e assim, na seleção final, 30 (trinta) pacientes foram incluídos na casuística investigada.

Todos os pais e/ou responsáveis foram informados da realização da pesquisa, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição – CAAE: 62322416.7.0000.0068.

#### 3.2. Avaliação Clínica

Os trinta (30) pacientes e seus responsáveis compareceram ao ICr-HCFMUSP e/ou aos encontros anuais para uma anamnese clínica detalhada e acompanhamento entre janeiro de 2017 e agosto de 2019.

As triagens e avaliações dos indivíduos selecionados para esse trabalho foram realizadas por uma equipe de médicos geneticistas, sob a supervisão da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Chong Ae Kim.

Nessa consulta, as anamneses constituíram na averiguação do histórico familiar (de gestação e concepção até evolução clínica), além da avaliação do desenvolvimento físico, motor e cognitivo, e análise de exames previamente realizados, sendo toda a avaliação guiada por meio de um *checklist* específico desenvolvido em conjunto com a equipe da Unidade de Genética (Anexo A).

Também foram coletados dados referentes à antropometria (peso, altura, perímetro cefálico atual, distância intercantal interna e externa dos olhos, comprimento de mão e dedo médio), dismorfologias faciais e corpóreas, anormalidades musculoesqueléticas e outras alterações multissistêmicas. Uma vez que a averiguação de dismorfologias pode variar de acordo com o médico avaliador, restringimos que as visitas clínicas não fossem realizadas com diversos médicos, mantendo a uniformidade nas descrições clínicas.

Ao final da consulta, os pacientes foram fotografados para documentação adequada dos dismorfismos relevantes.

### **3.3. Extração de DNA**

A primeira etapa necessária para o seguimento dos experimentos moleculares planejados foi a extração do DNA genômico a partir da coleta de 4 mL de sangue periférico em tubo contendo como anticoagulante o EDTA (tubo de tampa roxa).

Para a extração manual de DNA foi utilizado o *kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)* (Qiagen, Alemanha) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante com poucas modificações, como a redução do volume de eluição de 250  $\mu$ L para 100  $\mu$ L, afim de aumentar a concentração final de DNA genômico obtido.

Após a extração, as amostras foram armazenadas em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização nos testes moleculares.

### **3.4. Integridade e quantificação das amostras de DNA**

A integridade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo consideradas adequadas para os experimentos citogenômicos as amostras sem fragmentação e sem bandas inespecíficas na corrida do gel de agarose.

A quantificação das amostras foi realizada por meio do fluorímetro Qubit (Invitrogen, Estados Unidos), que se baseia na detecção de fluorescência emitida quando há ligação entre o reagente do *kit* com o alvo-específico, neste caso, o DNA de dupla fita, garantindo maior precisão e acurácia na quantificação da concentração final das amostras testadas.

### 3.5. Técnica de *array*

A técnica de *array* foi realizada na plataforma do fabricante Illumina Inc., utilizando o *Infinium CytoSNP-850K BeadChip*<sup>®</sup> (Illumina, Estados Unidos). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Citogenômica (LIM 03) da rede PREMium da FMUSP.

O *BeadChip* selecionado engloba cerca de 850 mil marcadores a serem avaliados, que correspondem a quase 3300 genes de relevância clínica para pesquisa em alterações constitucionais e em cânceres, dispostos de forma distribuída e sendo 15x o número de replicatas das sondas. O tamanho médio das sondas é de 50-mers, providenciando maior especificidade aos alvos, o espaçamento médio entre as sondas totais é de aproximadamente 1,8 kb e a resolução de regiões alvo apresenta uma distância média de 10 kb.

Esta técnica baseia-se na hibridação de *beads* magnéticas a sondas que apresentam sequências complementares para todo o genoma, com objetivo de detectar microdeleções e microduplicações em todos os cromossomos, incluindo os cromossomos sexuais.

Para este ensaio foram utilizados 4 µL de DNA, a uma concentração de 50 ng/µL, de modo que a quantidade inicial de amostra utilizada fosse de 200 ng. O DNA foi, então, denaturado quimicamente, seguido pela neutralização por reagentes fornecidos no *kit*. A etapa seguinte foi a amplificação genômica isotérmica, por meio de incubação a 37 °C por um período de 20-24 horas.

Após o período de incubação, as amostras de DNA foram fragmentadas por meio da ação de uma enzima disponível no *kit*, precipitadas e ressuspendidas em reagentes específicos para seguir com a aplicação das amostras nos *BeadChips*, conforme instruções fornecidas pelo fabricante.

Posteriormente, os *BeadChips*, já contendo as amostras, foram incubados a 48 °C, por cerca de 16 horas, para a hibridação do DNA fragmentado às sondas complementares. Os *BeadChips* foram, então, lavados para a remoção de DNA não hibridado, e preparados para as etapas de extensão de uma única base e coloração, por meio da adição de nucleotídeos marcados com fluorocromos específicos, intercaladas com etapas de lavagem.

A essa etapa seguiu-se o último procedimento da técnica que compreendeu a leitura, por meio do *scanner iScan*<sup>®</sup> (Illumina, Estados Unidos), da fluorescência

incorporada às sondas nas regiões nas quais houve a hibridação do DNA. Por meio dessa leitura de fluorescência e algoritmos específicos, regiões contendo duplicações, deleções e/ou homozigidade foram reconhecidas e anotadas pelo *software* para posterior análise.

### 3.6. Análise dos dados

A análise dos resultados obtidos por meio do *array* foi realizada utilizando o *software BlueFuse™ Multi* versão 4.4 (BlueGnome®), disponibilizado pelo fabricante. Os sinais de fluorescência emitidos pelas bases estendidas e capturadas pelo iScan® foram identificadas e normalizadas para cálculos de algoritmos, com o propósito de determinar desbalanços no número de cópias e a detecção de regiões de homozigidade (ROH, do inglês, *Regions of Homozygosity*).

Os critérios de determinação de uma CNV basearam-se na ausência de um tamanho mínimo pré-definido para a chamada de CNVs; a necessidade de, no mínimo, dez sondas consecutivas alteradas (considerando-se uma resolução efetiva global de ~18 kb, conforme informado pelo fabricante), sendo o *cutoff* da razão  $\log_2$  de - 0,41 para deleções e + 0,32 para duplicações; a necessidade de, ao menos, 500 sondas consecutivas alteradas e um tamanho mínimo de 3 Mb para considerar uma ROH. Esses dados reunidos forneceram as bases para que o *software* gerasse representações gráficas das CNVs, baseadas em frequências alélicas e desvio das sondas.

A interpretação das CNVs detectadas consistiu na avaliação conjunta de características clínicas dos pacientes e informações de bancos de dados disponíveis *online*. Assim, a classificação das CNVs clinicamente relevantes foi realizada conforme as orientações mais recentes do ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*), de acordo com sua associação à causa e suscetibilidade de doenças em cinco principais grupos: benignas; possivelmente benignas; possivelmente patogênicas; patogênicas; e VUS (do inglês, *Variants of Uncertain clinical Significance*) quando não houve um consenso clínico entre a variação genômica e o fenótipo do paciente (Riggs et al., 2020).

Foram usados, principalmente, os seguintes bancos de dados: *UCSC Genome Browser*, *Database of Genomic Variants* (DGV), *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources* (DECIPHER), *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *The Clinical Genome Resource* (ClinGen), entre outros, conforme Tabela 2.



As posições genômicas das alterações foram obtidas de acordo com o genoma de referência GRCh37/hg19.

**Tabela 2** - Bancos de dados e referências *online* usados no direcionamento e busca de informações e artigos científicos para a classificação das CNVs

Banco de dados e referências	Descrição
<b>ClinGen (Clinical Genome Resource)</b>	Ferramenta colaborativa de investigação de dados fenotípicos, genes e variantes de relevância clínica para uso na medicina de precisão e pesquisa, financiada pelo NIH (Institutos Nacionais de Pesquisa, do inglês, <i>National Institutes of Health</i> ).
<b>DECIPHER</b>	Plataforma para depósito, análise e compartilhamento da interpretação clínica de variações genômicas patogênicas provenientes de pacientes com fenótipo bem estabelecido e afetados por doenças genéticas raras.
<b>DGV (The Database of Genomic Variants)</b>	Catálogo público de alterações estruturais encontradas no genoma de indivíduos controle em populações diversas, usado para pesquisa básica e diagnóstico clínico.
<b>GnomAD (The Genome Aggregation Database)</b>	Ferramenta colaborativa que agrega e harmoniza dados obtidos por meio de exomas e sequenciamentos completos do genoma de forma acessível e organizada para a comunidade científica.
<b>ISCA (The International Standards for Cytogenomic Arrays)</b>	Consórcio de laboratórios de citogenética e biologia molecular comprometidos em melhorar a qualidade do cuidado de pacientes por meio da adequada indicação clínica para direcionamento da testagem citogenética molecular, incluindo os <i>arrays</i> .
<b>NCBI (National Center for Biotechnology Information)</b>	Fonte americana de informações em biologia molecular que promove pesquisa em problemas biomédicos, utilizando métodos matemáticos e computacionais; possui colaborações com o NIH e outras agências governamentais, instituições de ensino e indústria; promove a divulgação científica; coordena diversos bancos de dados e <i>softwares</i> para a comunidade médica e científica.
<b>OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)</b>	Catálogo <i>online</i> e gratuito, continuamente atualizado, de genes humanos, doenças genéticas, com ênfase na relação molecular entre variação genética e expressão fenotípica.
<b>Pubmed</b>	Site de referência para busca de referências compiladas e mundialmente disponíveis e acessíveis (artigos inéditos, artigos de revisão, estudos de casos, capítulos de livros, etc).
<b>UCSC Genome Browser</b>	Ferramenta de visualização prática e objetiva de porções de interesse no genoma em qualquer escala, combinados a dados diversos, que podem ser incluídos ou excluídos da tela de visualização, como bandas cromossômicas, genes conhecidos, RNAs mensageiros, ilhas CpG, cobertura de variações de base única, homologia com outros organismos, rastros evolutivos, posicionamento de sondas de <i>array de kits</i> variados, relatos de pacientes com alterações fenotípicas associadas às regiões de interesse, frequência na população em geral, entre outros.

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Dados clínicos e fenotípicos

Por meio da anamnese clínica coletamos diversas informações, referentes aos pacientes estudados, para análise. As principais características clínicas foram selecionadas e resumidas no Anexo B (Quadro 1 - Quadro das principais alterações clínicas coletadas), organizado em seis grupos principais: exame antropométrico presencial, características neonatais, antecedentes clínicos, desenvolvimento cognitivo, dismorfismos faciais e alterações multissistêmicas.

As medições de peso e altura foram avaliadas conforme dados da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2007) disponíveis para meninas e meninos de 0 a 19 anos. As curvas de referência usadas para a verificação de perímetro cefálico limitaram-se à idade de 16 anos (Hall et al., 2007).

Por meio de 78 questionários disponíveis na Unidade de Genética do ICr-HCFMUSP de pacientes com a SCDC, organizamos a frequência de nascimentos desses pacientes na Tabela 3.

**Tabela 3** - Levantamento dos dados disponíveis sobre período do nascimento e sexo dos portadores da síndrome

Período de nascimento	Quantidade	Frequência
1975-1980	2	1 F / 1 M
1981-1985	3	1 F / 2 M
1986-1990	3	2 F / 1 M
1991-1995	11	8 F / 3 M
1996-2000	8	4 F / 4 M
2001-2005	15	11 F / 4 M
2006-2010	18	9 F / 9 M
2011-2015	16	8 F / 8 M
2016-2017	2	1 F / 1 M
Total:	-	78
		45 F / 33 M

**Legenda:** F – Sexo Feminino; M – Sexo Masculino.

As outras características obtidas nas categorias “Características neonatais”, “Antecedentes clínicos”, “Desenvolvimento cognitivo”, “Dismorfismos faciais” e “Alterações multissistêmicas” foram reunidas e organizadas de modo comparativo entre as frequências das características encontradas em estudos anteriores e neste estudo (Tabela 4).

**Tabela 4** - Tabela comparativa entre os achados clínicos dos pacientes deste estudo e em outros quatro estudos de referência (continuação)

Características clínicas / Frequências em outros estudos	Este estudo		Niebuhr, 1978		Van Buggenhout et al., 2000		Mainardi et al., 2006		Santo et al., 2016	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Microcefalia	19/22	86,4	279/288	96,9	6/7	85,7	ND*	-	4/6	66,7
Parto prematuro	8/30	26,7	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Baixo peso ao nascimento (< 2500g)	11/28	39,3	ND*	90,0	4/7	57,1	ND*	-	0/6	0,0
Hipotonia ao nascimento	7/26	26,9	ND	-	ND	-	ND	-	6/6	100,0
Choro agudo (miado) ao nascimento	29/30	96,7	267/284	94,0	5/5	100,0	141/147	95,9	6/6	100,0
Pneumonia	19/30	63,3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Infecções recorrentes (incluindo as respiratórias)	21/30	70,0	ND	-	ND	-	83/159	52,2	ND	-
Irritabilidade	19/27	70,4	ND*	-	ND	-	ND	-	6/6	100,0
Autoagressão	19/28	67,9	ND*	-	7/7	100,0	ND	-	3/6	50,0
Heteroagressão	16/28	57,1	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Deficiência intelectual	ND	ND	295/296	99,7	7/7	100,0	ND*	-	6/6	100,0
Atraso de fala	ND	ND	ND	-	6/7	85,7	ND*	86,0	3/6	50,0
Fala palavras	19/30	63,3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Forma frases	9/30	30,0	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Comunicação por meio de gestos	23/30	76,7	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Entende comandos	26/30	86,7	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Conhece cores?	14/30	46,7	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Conhece letras?	11/30	36,7	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Conhece números?	12/30	40,0	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Face arredondada	7/30	23,3	124/183	67,8	3/7	42,8	96/115	83,5	6/6	100,0
Assimetria facial	12/30	40,0	24/68	35,5	5/7	71,4	16/45	35,6	2/6	33,3
Hipertelorismo ocular	19/30	63,3	196/252	77,8	4/7	57,1	105/129	81,4	5/6	83,3
Estrabismo convergente/divergente	13/30	43,3	87/156	55,8	3/7	42,8	48/101	47,5	6/6	100,0

**Tabela 4** - Tabela comparativa entre os achados clínicos dos pacientes deste estudo e em outros quatro estudos de referência (conclusão)

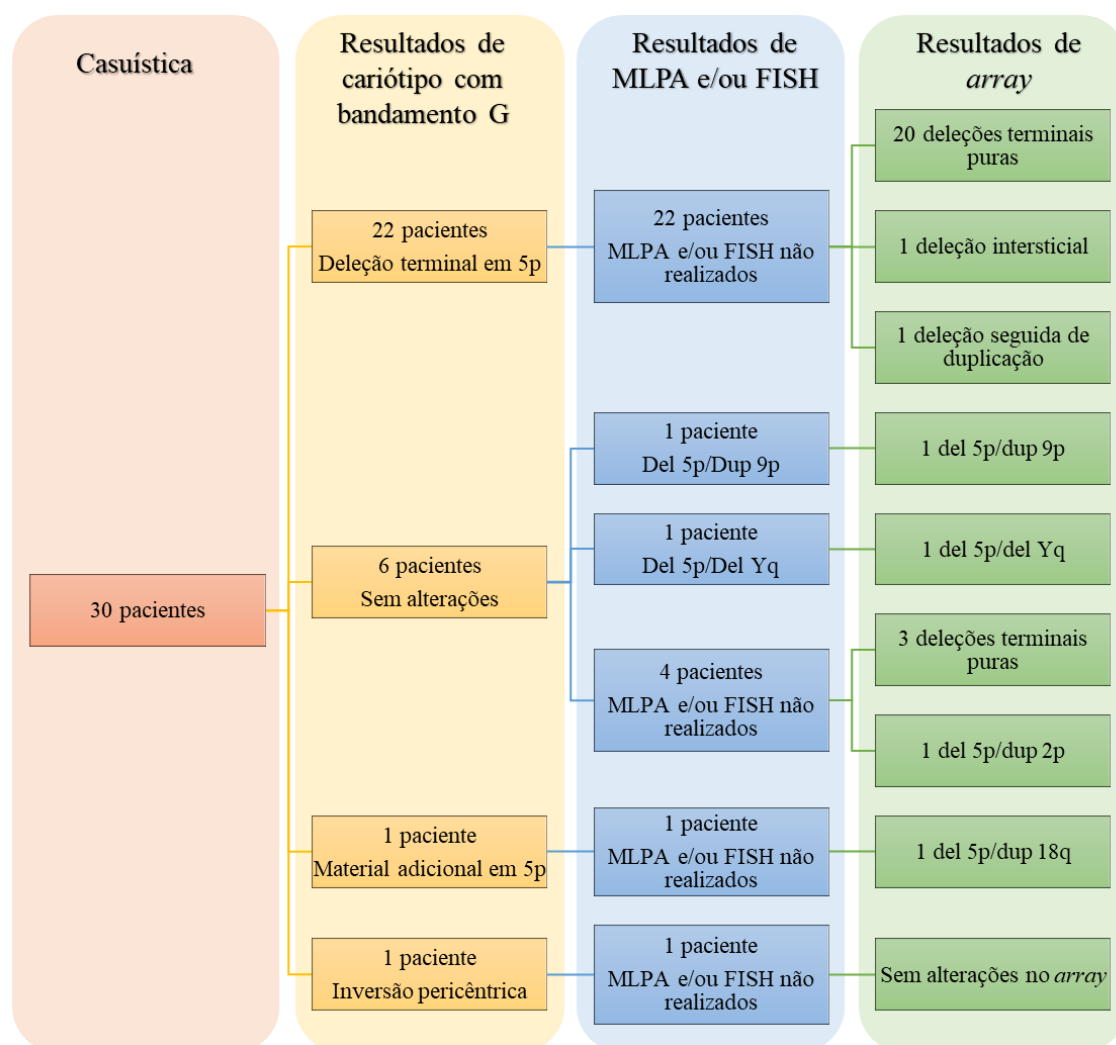
Características clínicas / Frequências em outros estudos	Este estudo		Niebuhr, 1978		Van Buggenhout et al., 2000		Mainardi et al., 2006		Santo et al., 2016	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Pregas epicânticas	21/30	70,0	223/252	88,5	6/7	85,7	119/132	90,2	5/6	83,3
Ponte nasal proeminente	17/30	56,7	248/261	95,0	1/7	14,3	102/117	87,2	6/6	100,0
Orelhas de implantação baixa	1/30	3,3	146/208	70,2	ND	-	81/116	69,8	2/6	33,3
Orelhas displásicas e/ou antivertidas	18/30	60,0	101/123	82,1	ND	-	ND	-	ND	-
Apêndices pre-auriculares	4/30	13,3	32/152	21,1	ND	-	ND*	-	ND	-
Filtro nasal curto	21/30	70,0	ND	-	ND	-	52/86	60,5	ND	-
Voz anasalada/rouca	7/30	23,3	ND	-	1/7	14,3	ND	-	3/6	50,0
Boca curva para baixo	14/30	46,7	ND	-	ND	-	81/100	81,0	5/6	83,3
Palato alto	17/27	62,9	ND*	-	ND	-	62/74	83,8	6/6	100,0
Refluxo gastro-esofágico	13/28	46,4	ND	-	ND	-	15/159	12,6	3/5	60,0
Microretrognatia	23/30	76,7	136/189	71,9	ND	-	119/123	96,7	6/6	100,0
SN - Hipertonia	0/30	0,0	39/118	33,1	ND	-	28/38	73,7	3/6	50,0
SN - Hipotonia	6/30	20,0	67/143	46,9	ND	-	78/108	72,2	ND	-
SN - Reflexos patelares	16/18	88,9	ND*	-	ND	-	ND*	-	ND	-
SN - Convulsões	4/29	13,8	9/331	2,7	2/7	28,6	25/159	15,7	ND	-
ADNPM	28/30	93,3	ND*	-	ND	-	ND*	-	ND*	-
Hiperatividade	16/30	53,3	ND	-	ND	-	18/47	38,3	5/6	83,3
Alteração cerebral e/ou neurológicas	14/28	50,0	ND*	-	5/7	71,4	17/57	29,8	ND	-
Alterações auditivas	8/29	27,6	ND	-	ND	-	ND	-	3/6	50,0
Alterações oculares	9/28	32,1	ND	-	ND	-	5/34	14,7	ND	-
Alterações cardíacas	12/29	41,4	ND*	-	ND	-	29/81	35,8	4/4	100,0
Alterações renais	4/29	13,8	ND*	-	ND	-	9/49	18,4	ND	-
Alterações genitais			ND	-	ND	-	20/159	12,6	ND	-
Alterações em pés	6/30	20,0	ND*	-	ND	-	83/159	52,2	ND	-
AME - Luxações	5/29	17,2	13/331	3,9	ND	-	ND*	-	ND	-
AME - Sandal gap	6/30	20,0	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
Escoliose	12/29	41,4	34/331	10,3	4/7	57,1	20/47	42,6	2/6	33,3
Alterações musculoesqueléticas	14/30	46,7	ND	-	ND	-	40/159	25,2	5/6	83,3

**Legenda:** % - Frequências identificadas; N - Número de pacientes; ND\* - os autores citam que a malformação já foi identificada anteriormente mas sem detalhar proporções e frequência

## 4.2. Resultados obtidos no *array*

Todas as amostras selecionadas para a técnica de *array* foram submetidas à verificação quanto à integridade e concentração do material e, por fim, consideradas adequadas para a execução da técnica.

As alterações detectadas pelo *array* foram organizadas e comparadas aos resultados anteriores que os pacientes já possuíam provenientes de cariótipos com bandamento G e/ou MLPA e/ou FISH (Figura 4). A descrição dos resultados obtidos anteriormente e os novos (após o *array*), conforme a nomenclatura do ISCN (do inglês, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) de 2016 (McGowan-Jordan et al., 2016) foram compilados no Quadro 2.



**Figura 4** - Fluxograma contendo os resultados simplificados que os pacientes apresentavam previamente e após o *array*. Legenda: q – Braço longo do cromossomo; p – Braço curto do cromossomo

**Quadro 2** - Resultados prévios obtidos por meio de técnicas citogenéticas e moleculares diversas (cariótipo, FISH, MLPA) comparados com os resultados obtidos por meio do *array* (continuação)

Paciente	Sexo	Resultados prévios (KT, MLPA, FISH)	Resultado após o <i>array</i>	Tamanho da deleção em 5p (Mb)
1	F	<b>KT:</b> 46,XX,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p13.2(25328_34402152)x1	34,4
2	F	<b>KT:</b> 46,XX,del(5p)	arr[GRCh37] 5p15.33p13.3(25328_33399200)x1	33,4
3	M	<b>KT:</b> 46,XY,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p13.3(25328_29971508)x1, 17q21.3(43996960_44002555)x1	29,9
4	M	<b>KT:</b> 46,XY,del(5)(p13)	arr[GRCh37] 5p15.33p13.3(25328_29863566)x1	29,8
5	F	<b>KT:</b> 46, XX, del (5)(p14)	arr[GRCh37] 5p15.33p13.3(25328_29305055)x1, 5p13.3(29320222_32402232)x3	29,3
6	M	<b>KT:</b> 46,XY,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p14.1(25328_28549181)x1	28,5
7	F	<b>KT:</b> 46,XX, del (5)(p14)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.1(25328_26551516)x1	26,5
8	F	<b>KT:</b> 46,XX,del(5)(p14),14pstk+,15cenh+pstk+	arr[GRCh37] 5p15.33p14.1(25328_25658882)x1	25,6
9	M	<b>KT:</b> 46,XY <b>MLPA</b> P036-E1: rsa 5p( <i>PDCD6</i> )x1; rsa 9p( <i>DMRT1</i> )x3 <b>FISH:</b> 46,XY.ish der(5)t(5;9)(p15;p24)(189N21-,43N6+)	arr[GRCh37]5p15.33p14.1(25328_25351609)x1; 9p24.3p21.3(46587_20642438)x3	25,3
10	F	<b>KT:</b> 46,XX,del(5)(p14)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.1(25328_25027618)x1	25,0
11	F	<b>KT:</b> 46,XX,add(5)(p15.3)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.2(113576_24272820)x1, 18q12.1q23(29782990_78013728)x3	24,2
12	F	<b>KT:</b> 46,XX,del(5)(p14)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_23243400)x1	23,2
13	M	<b>KT:</b> 46,XY,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_23210180)x1	23,2
14	F	<b>KT:</b> 46,XX,del(5)(p14.2)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_22039679)x1	22,0
15	F	<b>KT:</b> 46,XX,del(5)(p14.2)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_19892934)x1	19,9
16	M	<b>KT:</b> 46,XY,del(5)(p14)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_19087783)x1	19,1
17	M	<b>KT:</b> 46,XY	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_18921988)x1	18,9
18	M	<b>KT:</b> 46,XY,del(5)(14)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_18895407)x1	18,9

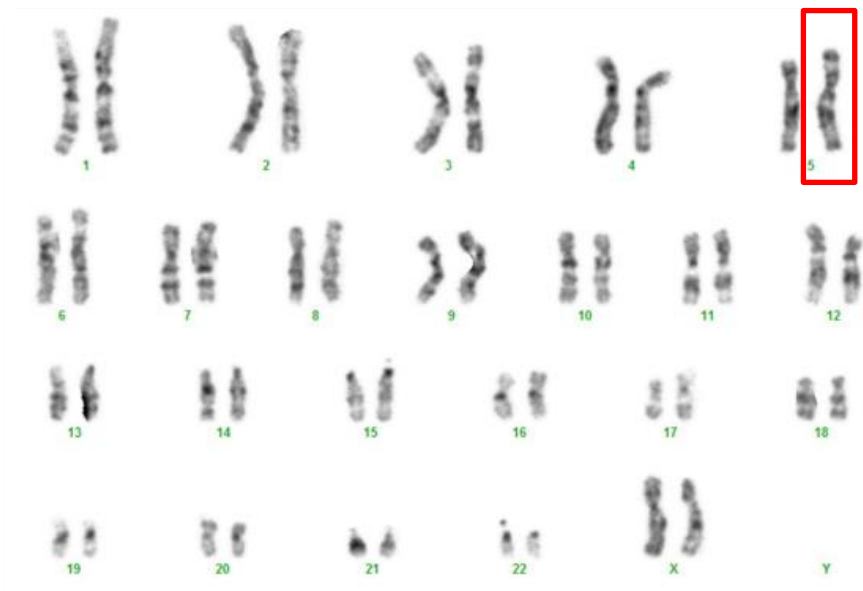
**Quadro 2** - Resultados prévios obtidos por meio de técnicas citogenéticas e moleculares diversas (cariótipo, FISH, MLPA) comparados com os resultados obtidos por meio do *array* (conclusão)

Paciente	Sexo	Resultados prévios (KT, MLPA, FISH)	Resultado após o <i>array</i>	Tamanho da deleção em 5p (Mb)
19	F	KT: 46,XX,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(25328_18168945)x1	18,1
20	F	KT: 46,XX,del(5)(p15)	arr[GRCh37] 5p15.33p14.3(25328_18099766)x1	18,1
21	F	KT: 46,XX,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(25328_18022107)x1	18,0
22	M	KT: 45,X MLPA P064/P036/P070: rsa 5p( <i>TERT</i> , <i>CLPTMIL</i> , <i>IRX4</i> , <i>CTNND2</i> , <i>PDCD6</i> , <i>CCDC127</i> )x1; rsa Y-PAR2( <i>VAMP7</i> )x1 FISH: 45,X.ish X(DXZ1+),der(5)(SRY+)	arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(22149_17812007)x1, Yq11.21q12(14852740_59335913)x0	17,8
23	F	KT: 46,XX,del(5)(p14)	arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(25328_17656351)x1	17,6
24	F	KT: 46,XX,del(5)(p14)	arr[GRCh37] 5p15.32p14.3(4788892_22219836)x1	17,4
25	F	KT: 46,XX,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(25328_17235998)x1, 22q12.3(36753803_36782997)x1,	17,2
26	F	KT: 46,XX,5p-	arr[GRCh37] 5p15.33p15.1(25328_16986171)x1	17,0
27	F	KT: 46,XX	arr[GRCh37] 2p25.3p24.1 (12770_23337574)x3, 5p15.33p15.1(113576_15713132)x1	15,6
28	F	KT: 46,XX MLPA: Del 5p ( <i>CLPTMIL</i> , <i>TERT</i> , <i>IRX4</i> ) - P064	arr[GRCh37] 5p15.33p15.32(25328_6197044)x1	6,2
29	M	KT: 46,XY MLPA: Del 5p ( <i>PDCD6</i> e <i>CCDC12</i> ) - P036/P070	arr[GRCh37] 5p15.33p15.32(25328_6189781)x1	6,2
30	F	KT: 46,XX,inv(5)(p15.3q31)	arr(1-22,X)x2	-

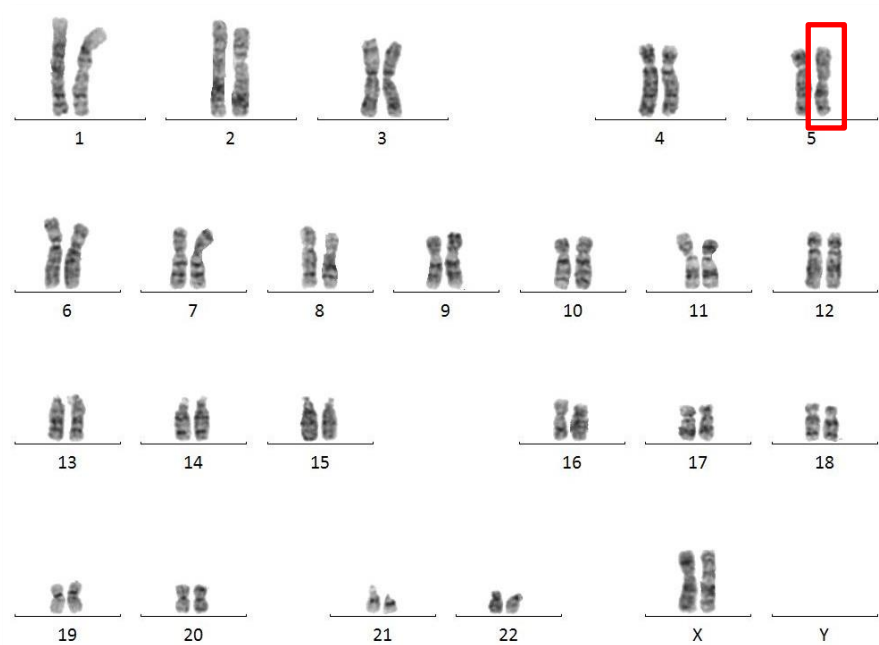
**Legenda:** Del - deleção; Inv - inversão; KT - Cariótipo em banda G; MLPA - do inglês, *Multiplex ligation probe amplification*; FISH - do inglês, *Fluorescence in situ hybridization*



De acordo com os resultados prévios, dos trinta pacientes, 22 apresentavam deleções terminais em 5p, seis apresentavam cariótipos sem anormalidades distinguíveis no cromossomo 5 (Pacientes 9, 17, 22, 27, 28, 29), uma paciente apresentava um material genético adicional em 5p (Paciente 11) (Fig. 5) e uma paciente (Paciente 30) apresentava inversão pericêntrica, envolvendo os braços curto e longo do cromossomo 5 (Fig. 6).



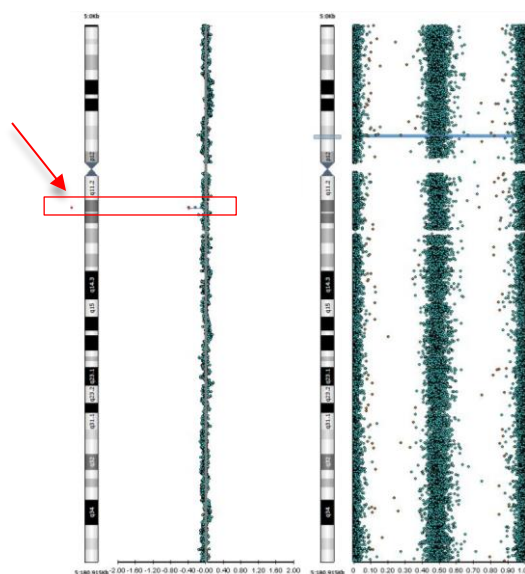
**Figura 5** – Cariótipo com bandamento G da Paciente 11, indicando o cromossomo 5 com material adicional ao final do braço curto (retângulo vermelho)



**Figura 6** – Cariótipo com bandamento G da Paciente 30. A inversão pericêntrica em 5p15.3q31 está em destaque no retângulo vermelho, atribuindo ao cromossomo 5 um perfil mais metacêntrico que o submetacêntrico esperado

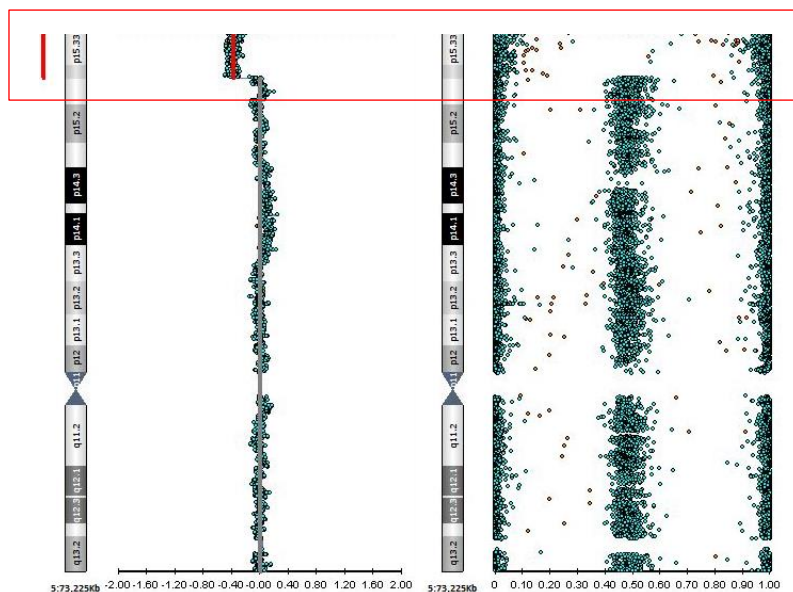
Após a realização do *array*, encontramos deleções terminais puras em 5p em 23 pacientes, uma deleção intersticial em 5p, uma deleção seguida imediatamente de duplicação em 5p, três casos em que o paciente apresentava a deleção do cromossomo 5 acompanhada de uma duplicação grande (> 20 Mb) de uma região em outro cromossomo (cromossomos 2, 9 e 18) e um caso em que o paciente apresentava a deleção em 5p acompanhada de outra deleção de tamanho bastante significativo (~44 Mb) em um cromossomo sexual (cromossomo Y).

No *array* da Paciente 30, não detectamos nenhuma CNV classificada como VUS, possivelmente patogênica ou patogênica no cromossomo 5 (tanto no braço curto quanto no braço longo). Identificamos somente uma pequena deleção de 33 kb no braço longo do cromossomo 5, classificada como CNV benigna (Fig. 7). Ademais, nenhum indicativo de deleção em 5p que se encaixasse nos critérios da SCDC ou nos fenótipos descritos desta paciente.

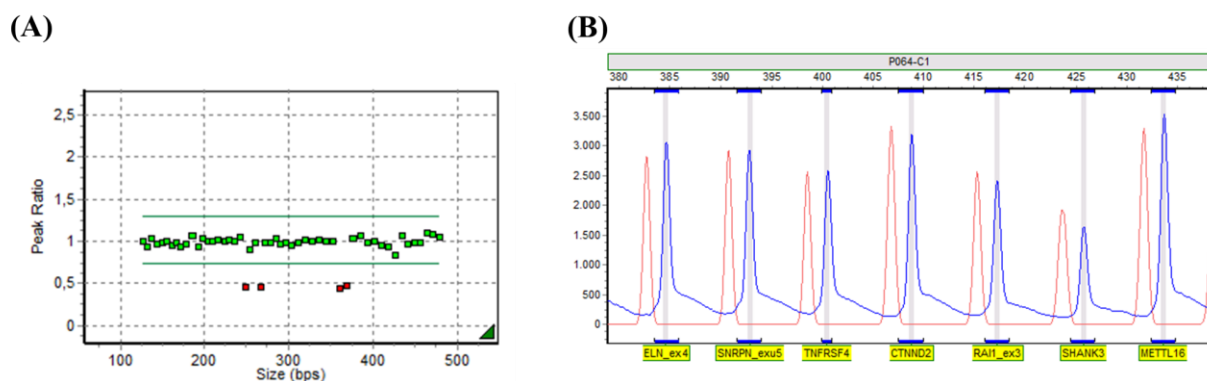


**Figura 7** – Imagem do cromossomo 5 completo da amostra da Paciente 30, observado no *array*, com uma pequena deleção no braço longo, representada pelo desvio dos alelos à esquerda (apontado pela seta vermelha) e classificada como benigna

Os Pacientes 28 e 29, que são irmãos, apresentaram deleções de tamanho bastante semelhante entre si (Fig. 8). A investigação genômica, por meio de MLPA (*kit* P064-C1), em amostras provenientes dos pais, indicou que a deleção foi herdada de forma materna (Fig. 9).



**Figura 8** – Imagem ampliada do braço curto do cromossomo 5 do Paciente 29, cuja deleção de 6 Mb (no retângulo no topo da imagem) é bastante similar à da irmã, Paciente 28



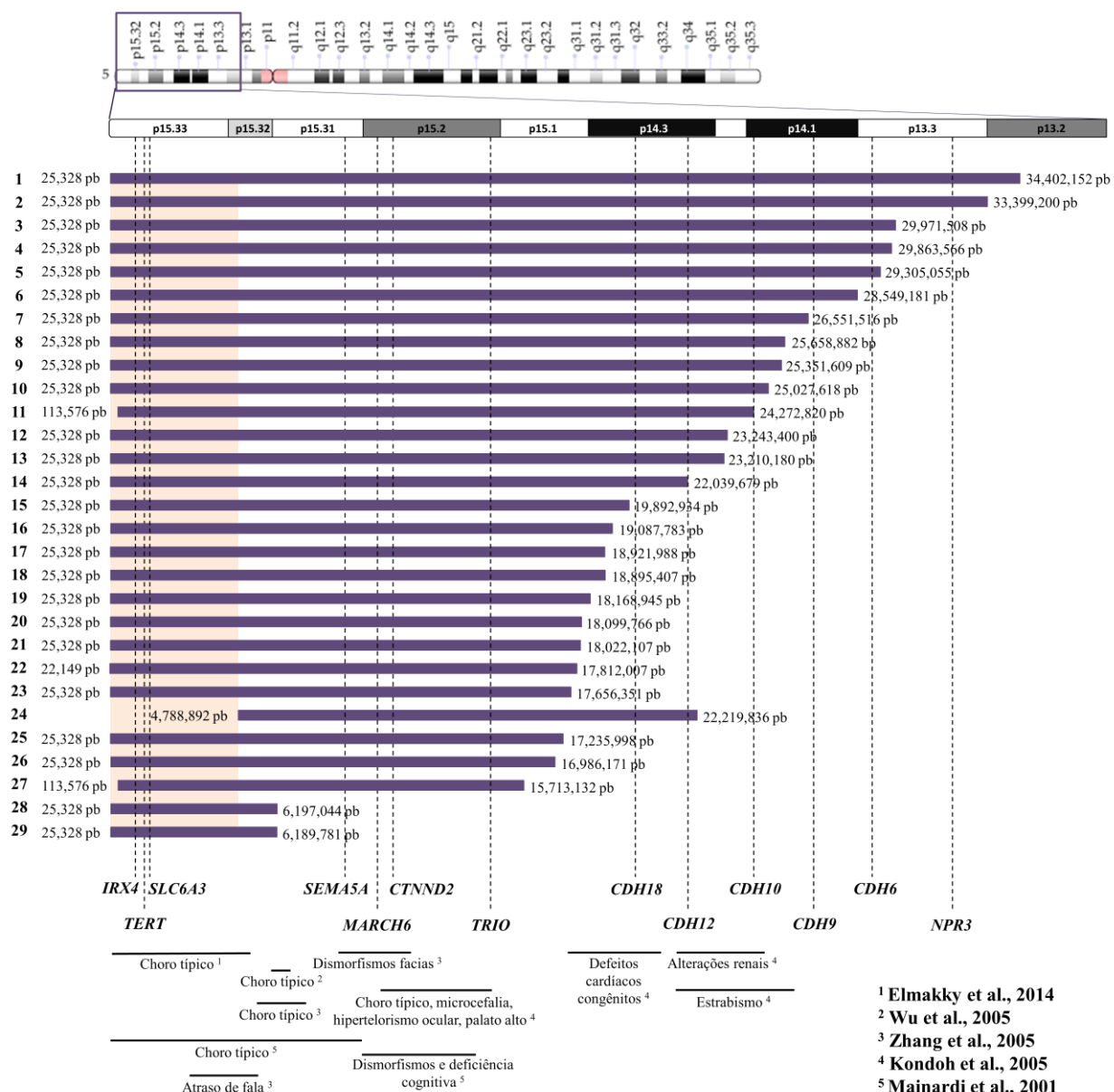
**Figura 9** – Resultados do MLPA (*kit* P064-C1) realizado em amostra de DNA proveniente da mãe dos pacientes 28 e 29. (A) Representação do *box plot* das sondas, indicando alteração (somente uma cópia) das sondas TERT\_ex2; TERT\_ex13; CLPTM1L; IRX4, todas localizadas no braço curto do cromossomo 5. (B) Representação do gráfico de picos das sondas incluídas no *kit* utilizado, indicando que a sonda CTNND2 (seta vermelha) não apresentou alterações em comparação ao controle

#### 4.3. CNVs identificadas exclusivamente no cromossomo 5 pela técnica de *array*

A técnica de *array* permitiu identificar CNVs no cromossomo 5 e em todo o genoma dos pacientes avaliados. Nos 30 pacientes, identificamos um total de 197 CNVs sendo uma região de ROH, 69 regiões duplicadas e 127 regiões deletadas, incluindo as deleções referentes ao cromossomo 5 (Anexo C, Quadro 3 - Quadro com todas as CNVs

identificadas nas amostras avaliadas pelo *Infinium CytoSNP-850K BeadChip®*). As deleções identificadas exclusivamente no cromossomo 5 estão organizadas na Figura 10.

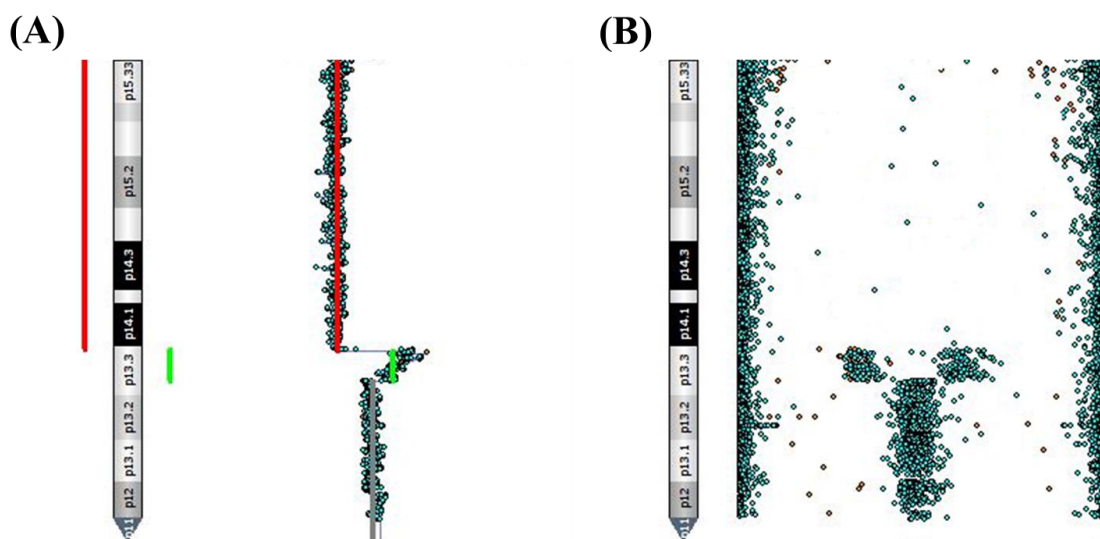
Na Figura 10 observamos que nenhum dos pacientes estudados apresentou os mesmos pontos de quebra iniciais e terminais, porém, alguns pacientes possuíam os mesmos pontos de quebra iniciais e os pontos terminais eram próximos (< 1 Mb), determinados pelo *array*, como por exemplo no caso dos Pacientes 19 e 20.



**Figura 10** – Representação esquemática da extensão das deleções detectadas (barras roxas) e os diferentes pontos de quebra alinhados com a posição genômica de genes selecionados e correlação entre genótipo-fenótipo de cinco estudos anteriores

Os Pacientes 11, 22 e 27 apresentaram pontos de quebra iniciais ligeiramente diferentes dos outros pois a técnica de *array* foi realizada usando plataformas de outros fabricantes. Para os pacientes avaliados pelo *Infinium CytoSNP-850K BeadChip*<sup>®</sup> observamos que o ponto inicial das deleções no *array* para todos os pacientes com deleções terminais foi em 25,328 pb (localização da primeira sonda do *BeadChip* utilizado), sendo esta sonda usada como parâmetro para a marcação de deleções terminais.

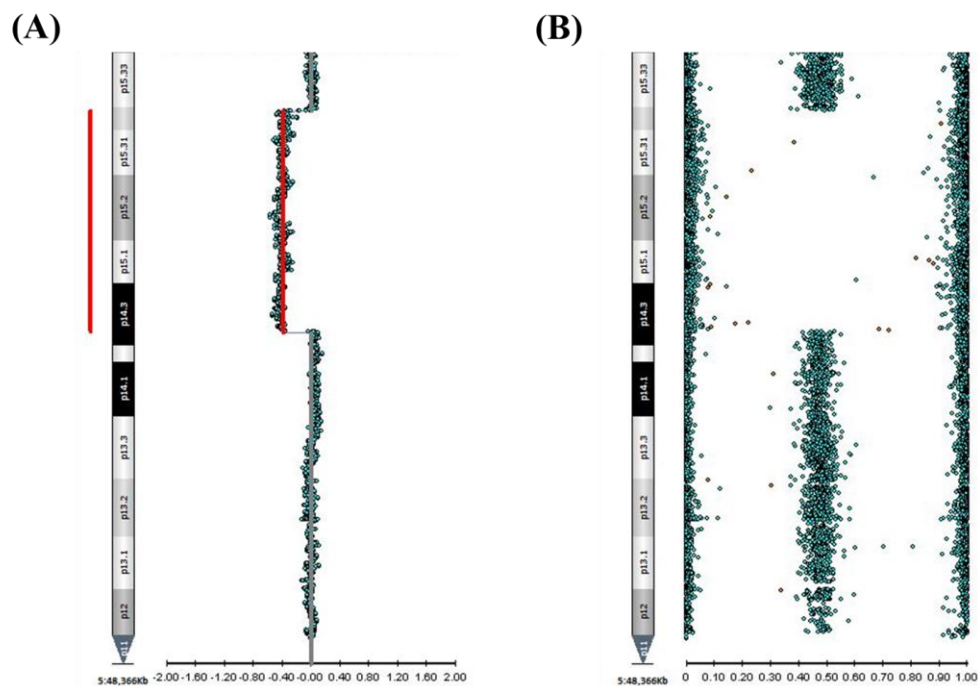
A paciente 5 apresentou concomitantemente uma deleção terminal no braço curto do cromossomo 5 seguida, imediatamente, de uma duplicação de 3 Mb envolvendo 19 genes, sendo 7 genes codificadores de proteína (Fig. 11).



**Figura 11** – Destaque do braço curto do cromossomo 5 observado na amostra da Paciente 5, representando a deleção de 29,3 Mb (linha vermelha) seguido imediatamente por uma duplicação de 3 Mb (linha verde). (A) Resultado do perfil alélico; (B) Resultado do desvio de sondas obtido no *array*

Observando outras diferenças em pontos de quebra, identificamos que a Paciente 24 teve um ponto de quebra inicial intersticial (Fig. 12) e, conforme indicado no Anexo B, não teve microcefalia evidenciada, de acordo com as curvas de avaliação do perímetro cefálico. Esta paciente também foi a única a não apresentar o choro fraco ao nascimento.

Ademais, também observamos uma grande discrepância nos tamanhos das deleções do cromossomo 5 que variaram desde 6,2 Mb até 34,4 Mb (Quadro 2 e na Figura 10).



**Figura 12** – Destaque do braço curto do cromossomo 5 observado na amostra da Paciente 24, representando a deleção intersticial encontrada neste caso. (A) Resultado do perfil alélico; (B) Resultado do desvio de sondas obtido no *array*

Apesar dos pontos de quebra inerentes a cada paciente, identificamos que 29 das 30 deleções em 5p envolviam os genes *IRX4*, *TERT* e *SLC6A3*, 28 das 30 deleções englobavam os genes *SEMA5A*, *TRIO*, *MARCH6* e *CTNND2*, quinze pacientes não possuíam o gene *CDH18*, catorze não possuíam o gene *CDH12*, dez pacientes possuíam o gene *CDH10* deletado, seis não possuíam o gene *CDH9*, cinco não apresentavam o gene *CDH6*, e somente dois pacientes abrangiam deleções do gene *NPR3*.

Em relação às sequências repetitivas que circundam a região do ponto de quebra no cromossomo 5, levantamos o tipo e quantidade de SINEs e LINEs nas regiões dos pontos de quebra, mais precisamente entre a sonda anterior e a sonda posterior à deleção ou considerando um distanciamento médio de 18 kb nos casos em que a plataforma de *array* utilizada não foi a da Illumina. Os dados referentes às sequências repetitivas encontram-se no Quadro 4.

A maior parte dos rearranjos apresentava sequências do tipo LINE nas regiões próximas aos pontos de quebra, principalmente da família L1 (grupo específico de elementos capazes de retrotransposição). Em relação às SINEs, o tipo mais frequentemente encontrado foram sequências *Alu*. Regiões de SD (ou LCRs) foram encontradas próximas dos pontos de quebra em somente uma paciente (Paciente 1).

**Quadro 4** - Levantamento do conteúdo de sequências repetitivas, incluindo SDs, LINEs e SINEs, próximos aos pontos de quebra, exclusivamente no cromossomo 5 (continuação)

Paciente	Localização	Posição da última sonda deletada	Sonda anterior	Sonda posterior	SG	Classe de repetições					Predomínio de:	Há genes no ponto de quebra?
						LINEs			SINEs			
						Família L1	Família L2	Família CR1	Família Alu	Família MIR		
1	PQ final del 5p	34402152	34392615	34410175	+	+	+	-	+	-	LINE	Não
2	PQ final del 5p	33399200	33375972	33401470	-	+	+	-	+	+	LINE	Não
3	PQ final del 5p	29971508	29955761	29978110	-	+	-	-	+	-	LINE	Não
4	PQ final del 5p	29863566	29851658	29873955	-	+	-	-	+	+	LINE	Não
5	PQ final del 5p	29305055	29298554	29320222	-	+	+	-	+	-	LINE	Não
	PQ inicial dup 5p	29320222	29305055	29321754	-	+	+	-	+	-	LINE	Não
	PQ final dup 5p	32402232	32384427	32403346	-	+	+	-	+	+	SINE	Sim, <i>ZFR</i>
6	PQ final del 5p	28549181	28548829	28560977	-	+	+	-	+	+	LINE	Não
7	PQ final del 5p	26551516	26537760	26555788	-	+	-	-	+	+	LINE	Não
8	PQ final del 5p	25658882	25650176	25668834	-	+	-	-	+	-	LINE	Não
9	PQ final del 5p	25351609	25340617	25355836	-	+	-	-	+	+	SINE	Não
10	PQ final del 5p	25027618	25027051	25030161	-	-	-	-	+	-	SINE	Não
11	PQ final del 5p	24272820*	-	-	-	+	+	-	+	-	LINE	Não
12	PQ final del 5p	23243400	23243079	23244025	-	-	-	-	-	-	Ausentes	Não
13	PQ final del 5p	23210180	23183672	23210213	-	+	+	-	+	+	LINE	Não
14	PQ final del 5p	22039679	22033716	22040806	-	+	-	-	+	-	LINE	Sim, <i>CDH12</i>
15	PQ final del 5p	19892934	19880618	19902953	-	+	-	+	+	+	LINE	Sim, <i>CDH18</i>
16	PQ final del 5p	19087783	19086655	19093749	-	+	-	-	-	-	LINE	Não
17	PQ final del 5p	18921988	18917828	18929720	-	+	-	-	-	-	LINE	Não

**Quadro 4** - Levantamento do conteúdo de sequências repetitivas, incluindo SDs, LINEs e SINEs, próximos aos pontos de quebra, exclusivamente no cromossomo 5 (conclusão)

Paciente	Localização	Posição da última sonda deletada	Sonda anterior	Sonda posterior	SG	Classe de repetições					Predomínio de:	Há genes no ponto de quebra?
						LINEs			SINEs			
						Família L1	Família L2	Família CR1	Família Alu	Família MIR		
18	PQ final del 5p	18895407	18892930	18908745	-	+	-	-	+	+	LINE	Não
19	PQ final del 5p	18168945	18157577	18173795	-	+	+	-	+	-	LINE	Não
20	PQ final del 5p	18099766	18095876	18116055	-	+	+	-	+	+	LINE	Não
21	PQ final del 5p	18022107	18017619	18030481	-	+	+	-	+	+	SINE	Não
22	PQ final del 5p	17812007*	-	-	-	+	+	-	+	+	LINE	Não
23	PQ final del 5p	17656351	17642516	17665529	-	+	-	-	+	-	LINE	Sim, <i>H3Y1</i>
24	PQ inicial del 5p	4788892	4785594	4795354	-	+	-	-	+	-	LINE	Não
	PQ final del 5p	22219836	22219503	22222461	-	+	+	-	-	+	LINE	Sim, <i>CDH12</i>
25	PQ final del 5p	17235998	17234794	17247021	-	+	-	-	+	+	SINE	Sim, <i>BASP1</i>
26	PQ final del 5p	16986171	16980857	16989839	-	-	+	+	+	+	SINE	Não
27	PQ final del 5p	15713132*	-	-	-	+	+	+	+	+	LINE	Sim, <i>FBXL7</i>
28	PQ final del 5p	6197044	6189781	6203128	-	+	+	-	+	-	LINE	Não
29	PQ final del 5p	6189781	6179771	6197044	-	+	+	-	+	+	SINE	Não

**Legenda:** 5p - Braço curto do cromossomo 5; Del - Deleção; Dup - Duplicação; LINEs - do inglês, *Long interspersed nuclear elements*; PQ - Ponto de Quebra; SD - do inglês, *Segmental duplications*; SINEs - do inglês, *Short interspersed nuclear elements*. \*Indica que em pacientes cujos *microarrays* foram feitos externamente, consideramos um espaço de 18 kb (a média de intervalo de espaçamento das sondas *Infinium CytoSNP-850K BeadChip*<sup>®</sup>).



#### 4.4. CNVs identificadas em outros cromossomos pela técnica de *array*

A análise e classificação de todas as CNVs identificadas pelo *array*, nos permitiu identificar alterações de relevância clínica em outros cromossomos, associadas ao fenótipo do paciente.

Quatro pacientes apresentavam a deleção do cromossomo 5 concomitante a uma duplicação grande (> 20 Mb) da região terminal de outros cromossomos, conforme Tabela 5.

**Tabela 5** - Alterações genômicas que não envolveram o cromossomo 5, classificadas como VUS ou patogênicas, detectadas por meio do *array*

Paciente	Alterações em outro cromossomo (posição genômica em pb)	Tamanho	Genes envolvidos (quantidade total de genes envolvidos)	Classificação
3	17q21.3(43996960_44002555)x1	5,6 kb	<i>MAPT</i> (1)	VUS
9	9p24.3p21.3(46587_20642438)x3	20,0 Mb	<i>DMRT1, JAK2, BNC2, SMARCA2</i> (178)	Patogênica
11	18q12.1q23(29782990_78013728)x3	48,2 Mb	<i>ASXL3, SETBP1, TCF4, SMAD4</i> (378)	Patogênica
22	Yq11.21q12(14852740_59335913)x0	44,5 Mb	<i>VAMP7, DAZ1</i> (316)	Patogênica
25	16p13.11 (15855484_15878289)x1	22,8 kb	<i>MYH11</i> (1)	VUS
	22q12.3(36753803_36782997)x1	29,2 kb	<i>MYH9</i> (1)	VUS
27	2p25.3p24.1 (12770_23337574)x3	23,3 Mb	<i>MYCN, APOB, SOX11, MYT1L</i> (193)	Patogênica

**Legenda:** kb – Kilobases; Mb – Megabases; pb – Pares de bases; VUS – do inglês, *Variants of Uncertain clinical Significance*

Avaliando as sequências repetitivas entre estes pontos de quebra, detectamos predomínio de sequências do tipo SINE nos rearranjos detectados nos Paciente 3, 22 e 25 e predomínio de sequências do tipo LINEs nos pontos de quebra mais próximos aos centrômeros nos pacientes 9, 11 e 27. Nenhum desses pontos de quebra investigados apresentava regiões de SG proximais.

# DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

O cromossomo 5 é um dos maiores cromossomos humanos, possuindo cerca de 180,8 Mb, e que, no entanto, possui uma das menores densidades gênicas (Schmutz et al., 2004). A maioria dos estudos com pacientes com a Síndrome do 5p- não busca justificativas para variação nos pontos de quebra ou avalia outros cromossomos para explicar fenótipos divergentes ao comum esperado da síndrome.

As técnicas citogenômicas, principalmente o *array*, despontam como o padrão ouro na detecção de CNVs e tornam-se a melhor ferramenta para delineamento dos pontos de quebra das alterações para investigar a correlação genótipo-fenótipo na SCDC. Além disso, a investigação dos tipos de sequências que circundam os pontos de quebra pode nos dar indícios dos mecanismos envolvidos na formação desses rearranjos e que poderiam se aplicar a outras síndromes de deleções terminais.

### 5.1. Dados clínicos e fenotípicos

De acordo com a literatura disponível, a SCDC ocorre em uma frequência de 1:15000 a 1:50000 em nascidos vivos (Niebuhr, 1978; Higurashi et al., 1990). Por meio de contato com a organização do Núcleo *Cri du chat*, soubemos do cadastro de 235 portadores da deleção de 5p em território brasileiro. Destes, 115 estão registrados somente no estado de São Paulo e os outros 120 encontram-se distribuídos em 22 estados nacionais. Não pudemos calcular a frequência populacional da síndrome no Brasil por falta de maior detalhamento de informações para este propósito e pelo enviesamento amostral, porém essa constatação é um forte indício de que a síndrome provavelmente está subdiagnosticada em estados cujos testes de cariótipo e outros testes moleculares estão indisponíveis ou são de difícil acesso. Como observado na Tabela 2, mais portadores de 5p- foram diagnosticados ao longo dos anos, o que pode ser devido à criação de uma rede de apoio de famílias para compartilhamento de informações sobre esta síndrome e outras síndromes raras.

Por este motivo, torna-se essencial reforçar a importância das avaliações clínicas e moleculares afim de oferecer um diagnóstico mais preciso às famílias e melhor conduta de aconselhamento genético, necessidade esta ressaltada a partir da coleta de

dados sobre famílias brasileiras com portadores de 5p- nos últimos anos (Honjo et al., 2018).

Na nossa casuística inicial de portadores da deleção de 5p- (10 do sexo masculino e 19 do sexo feminino), observamos que houve predomínio de pacientes do sexo feminino na razão de 0,53, apesar de ser uma síndrome que afeta um cromossomo autossomo. Na literatura, Niebuhr (1978) e Mainardi et al. (2006) também relataram prevalência de pacientes do sexo feminino em sua casuística, sendo as razões de 0,72 e 0,82, respectivamente, sem uma explicação precisa para esse predomínio. A expectativa de vida está de acordo com a população em geral (Niebuhr, 1978), sendo que as idades dos pacientes da casuística deste estudo, no dia da consulta clínica, variaram de 2 anos a 38 anos (média: 13,2 anos, mediana: 11 anos).

Avaliando os pacientes de forma geral, identificamos que todos os pacientes com 5p- possuíam deficiência intelectual e dismorfismos faciais comuns à síndrome (Niebuhr, 1978; Mainardi et al., 2001). A Paciente 30 apresentou dificuldade de aprendizado, mas não DI, uma vez que estava concluindo o ensino médio e realizando provas de vestibular conforme informado pela mesma.

Em relação aos parâmetros de altura, peso e perímetro cefálico há critérios padronizados, inclusive com curvas específicas, já descritos para pacientes com a Síndrome do 5p- (Marinescu et al., 2000; Hall et al., 2007). Os valores de altura e peso da maioria dos pacientes esteve abaixo do quinto percentil, concordantes com relato de Marinescu et al. (2000), ressaltando o baixo peso e baixa estatura comuns aos portadores da SCDC.

Em relação ao perímetro cefálico, não foi possível detectar sua presença ou ausência em oito pacientes, uma vez que as curvas de referência disponíveis para verificação de perímetro cefálico limitam-se à idade de 16 anos, porém observamos que três portadores da deleção não apresentavam microcefalia (Pacientes 24, 28 e 29). Uma das portadoras foi a paciente com a deleção intersticial (Paciente 24), que apresentou percentil igual a 10, o que nos instigou a investigar a região genômica compreendida entre 1 e 4,788,892 pb em busca de alguma evidência que pudesse justificar essa diferença em comparação aos outros portadores de 5p-.

Essa alteração do perímetro cefálico já foi atribuída anteriormente à outra região, localizada entre 10 e 15 Mb, que engloba o gene *MARCH6* (Kondoh et al., 2005). No entanto, esta região também foi associada a outras alterações como micrognatia, hipertelorismo e palato alto sem maior distinção ou precisão genômica. A discrepância

de dados pode ser remetida ao fato da casuística do autor ser menor (n=6) que a deste estudo e por ter se baseado na técnica de FISH, com sondas específicas somente para o cromossomo 5, sem considerar outras CNVs para inferir a correlação genótipo-fenótipo.

Contudo, mais recentemente, Elmakky et al. (2014) sugeriu uma região terminal de 5,5 Mb, localizada entre 5p15.32–33, como sendo responsável pelo desenvolvimento craniano ao longo do crescimento, também associado a outros distúrbios, sendo esta região compatível com nossos achados.

Além disso, a mesma paciente que não apresentou microcefalia foi a única na qual detectamos a ausência do choro agudo, cujo mesmo ao nascimento foi descrito como “bem forte e alto”. O choro de miado de gato, presente em 96,7% esteve próximo dos valores encontrados em outros estudos, conforme a Tabela 4. O choro característico é causado por anormalidades variadas na laringe, como laringomalácia e hipoplasia, e, também, por alterações na epiglote (Arisaka et al., 2006).

Na literatura, há discrepância quanto à localização precisa da região relacionada ao choro, sendo esta mais comumente atribuída à região 5p15.3, detectada por meio de sondas de FISH na década de 90 (Overhauser et al., 1994; Gersh et al., 1995). Outro estudo baseou-se no uso de PCR (Reação em cadeia de polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) para delimitar o choro típico a uma região crítica de 640 kb, localizada entre 6,365,349 pb e 7,003,686 pb, e que engloba o gene *FLJ25076* (Zhang et al., 2016). Este gene está altamente expresso em tecidos torácicos e escapulares, característica essa que explicaria e seria compatível com a presença do choro típico (Wu et al., 2005). Além disso, o gene *MARCH6* também já foi relacionado a este fenótipo (Kondoh et al., 2005; Wu et al., 2005).

Contudo, avaliando esses dados em conjunto com o que obtivemos, observamos que esta região entre 6 e 7 Mb não está deletada nessa paciente (24) e assim, inferimos uma nova posição, localizada mais próxima ao terminal cromossômico, entre 1 e 4,788,892 pb, relacionada ao impacto na malformação laríngea, que consequentemente provoca o choro característico (Chehimi et al., 2020).

Identificamos que o baixo peso e hipotonia ao nascimento estiveram presentes em 39,3% e 26,9% dos pacientes, respectivamente, sendo que outro estudo relatou um valor mais alto, por volta dos 50% (Marinescu et al., 2000) e conforme a Tabela 4, Niebuhr (1978) e Van Buggenhout et al. (2000) também identificaram valores maiores, o que pode estar relacionado ao tamanho e seleção de casuística.

A idade ao diagnóstico da deleção variou consideravelmente de um mês de vida a 12 anos, sendo que só foi possível identificar o caso nos irmãos (Pacientes 28 e 29) mais tardiamente, aos 12 anos, por meio de métodos moleculares, uma vez que não era uma deleção visível na resolução de um cariótipo. Essa alteração genômica foi investigada nos pais dos pacientes e detectada na mãe, que apresentava DI e fenótipo semelhante ao dos filhos, contudo, características que não sugerem a SCDC por não apresentarem hipertelorismo ocular, microretrognatia, pregas epicânticas, entre outras características comuns à síndrome.

Os outros achados relacionados aos antecedentes clínicos como pneumonias e infecções recorrentes, como as respiratórias e as otites, estiveram presentes em 19 de 30 pacientes (63,3%) e em 21 de 30 pacientes (70%), respectivamente, e estiveram condizentes com estudos anteriores (Niebuhr, 1978; Van Buggenhout et al., 2000; Mainardi et al., 2001).

No que diz respeito à irritabilidade, autoagressão e heteroagressão, por meio de mordidas, beliscões e/ou arranhões, estas são condutas já relatadas na literatura e frequentemente associadas à SCDC (Cornish e Pigram, 1996; Collins e Cornish, 2002; Arron et al., 2011). Entretanto, estas características não foram avaliadas da mesma forma em outros estudos, de modo a estimar sua frequência e detalhar sua ocorrência, contudo, ainda assim, foram características ressaltadas pelos autores como estando presentes na população de 5p- investigada (Niebuhr, 1978; Collins e Cornish, 2002). Observamos que não foi possível fazer associação entre pontos de quebra específicos no cromossomo 5 e nem que esteve restrito a um sexo só.

Em relação ao desenvolvimento cognitivo, o questionário realizado na avaliação médica não possuía escalas especializadas para mensuração de desenvolvimento cognitivo e intelectual, e, por isso, conduziu-se uma série de perguntas sobre a linguagem verbal e gestual do paciente em questão. Palavras soltas são proferidas por 63,3% dos portadores avaliados, porém a formulação de frases completas foi descrita em 9 de 30 dos pacientes (30%). A forma de comunicação mais identificada foi a gestual, dada por meio de comandos e gestos indicativos de uma ação, vontade ou comportamento como o fato de apontar e indicar algo ou agir conforme orientações dos responsáveis. A identificação de cores, letras e números foi relatada em cerca de metade dos pacientes avaliados (46,7%, 36,7% e 40%, respectivamente).

Ainda relacionando alterações no cromossomo 5 às características do tópico “Antecedentes Clínicos”, muitos deles pronunciavam palavras diversas e repetiam o que

era dito. Foi interessante observar que apesar de todos os pacientes possuírem DI, três deles (Pacientes 8, 13 e 25) conseguiam se comunicar e se expressar por meio de palavras e frases completas, ainda que com alguma dificuldade para a compreensão do que diziam, durante as avaliações clínicas. Avaliando as deleções no cromossomo 5 destes pacientes, observamos grande divergência entre os tamanhos, sendo uma de 17,2 Mb, outra de 23,2 Mb e a última de 25,6 Mb.

Na literatura, a maioria dos estudos relata consonância entre maiores deleções associadas a maior deficiência intelectual. Porém, Marinescu et al. (1999) apresentaram um trabalho discordante, no qual não identificaram essa relação entre tamanho e gravidade da DI, corroborando com este estudo até o momento.

Aferindo os achados do tópico “Dismorfismos faciais”, nas análises iniciais observamos que pacientes mais jovens, com 2 a 4 anos de idade (Pacientes 15, 17 e 20) apresentavam um rosto arredondado e os mais velhos um rosto afinado. Apesar da existência de descrição clara na literatura em relação às mudanças das características fenotípicas dos pacientes com 5p- entre a infância e a vida adulta, na qual indica-se que o rosto mais afinado na vida adulta seja semelhante àquele exibido pelos portadores da Síndrome de Angelman, não há uma idade precisa relatada para essa transição e nós não identificamos uma faixa etária no qual isso ocorre (Van Buggenhout et al., 2000; Santo et al., 2016).

No campo dos dismorfismos faciais, a frequência da presença de alterações fenotípicas variou consideravelmente, sendo as mais comuns: microretrognatia (76,7%), filtro nasal curto e pregas epicânticas (ambas com 70%), seguido de hipertelorismo ocular aparente (63,3%) e palato alto (62,9%).

Em relação às características de hipertelorismo ocular, estrabismo convergente e divergente, pregas epicânticas, apêndices pré-auriculares, filtro nasal curto, voz anasalada/rouca, refluxo gastro-esofágico e microretrognatia, encontramos frequências semelhantes a estudos anteriores, conforme observado na Tabela 4.

Ponte nasal proeminente, orelhas de implantação baixa, orelhas displásicas e/ou antivertidas, boca curva pra baixo e palato alto, estiveram menos frequentes em nosso estudo quando comparados ao encontrado em estudos maiores como o de Niehubr (1978) e Mainardi et al. (2006). Alguns motivos podem explicar essa diferença sendo a principal a variação no tamanho das casuísticas investigadas e, além disso, é necessário considerar a miscigenação que a população brasileira apresenta em comparação a outros povos, uma vez que outros estudos consideram, em sua maioria, populações europeias.

No estudo de Rodríguez-Caballero et al. (2010), relatou-se uma frequência próxima à nossa de filtro nasal curto e palato em uma frequência de 87,8% e 50% respectivamente, semelhante à nossa de 70% e 62,9%.

Nenhum dos pacientes apresentou hipertonia e menos pacientes apresentaram hipotonia, conforme observado, quando equiparados a outros estudos. Quanto às convulsões identificadas em quatro pacientes (13,8%), não há estudos específicos referentes à associação entre a síndrome do 5p- e convulsões. Niebuhr (1978) descreveu convulsões em 2,7% de uma casuística de 331 casos, uma estimativa consideravelmente menor que a encontrada neste estudo, e Van Buggenhout et al. (2000) identificaram uma frequência de 29%, muito mais alta que a de Niebuhr (1978). A justificativa mais provável para essa discrepância é o fato do distúrbio cerebral poder estar associado à outras variações genômicas que não foram investigadas.

Os quatro pacientes que apresentaram convulsões foram os Pacientes 3, 5, 9 e 11, que possuíam outros rearranjos de impacto patogênico além da deleção em 5p, como será discutido mais a frente. As investigações acerca de outras alterações concomitantes à deleção do cromossomo 5 ressaltam a necessidade de um bom detalhamento do quadro fenotípico do paciente, que permite melhor investigação de todas CNVs em casos de translocações e/ou fenótipos sobrepostos e incomuns para a síndrome principal, como as convulsões.

Quanto às outras características, observamos que quase todos os pacientes (93,3%) apresentavam ADNPM e, apesar de outros estudos não citarem em número a frequência deste achado, todos ressaltam que é comum à SCDC. Estudos anteriores que mensuraram hiperatividade apresentaram valores bastante variados sendo que o nosso estudo detectou sua presença em 53,3% dos casos, Mainardi et al. (2006) em 38,3% e Santo et al. (2016) em 83,3%. Provavelmente critérios diferentes foram usados para avaliar essa característica o que refletiu nos números divulgados.

Alterações no sistema nervoso (reflexo avaliado em consulta e exames trazidos pelos responsáveis dos portadores) foram assinaladas em 50% dos pacientes, e apesar de frequências variadas, também foram encontradas em outros estudos.

Dentre os pacientes deste estudo que levaram exames de ressonância magnética (RNM) encefálica à consulta, encontramos descrições variadas: fossa posterior pequena, redução de hemisférios cerebelares e hipoplasia de vérmis cerebelar, com aumento de cisterna magna (Paciente 21); agenesia de corpo caloso, agenesia do giro do cíngulo, ausência do septo pelúcido, mastoidopatia bilateral (Paciente 17); dilatação



ventricular supratentorial assimétrica maior à esquerda, discreta hipoplasia de tronco cerebral, especialmente de ponte (Paciente 1); redução de espessura do corpo caloso, leve redução de substância branca e cinzenta supratentorial, com pequenos focos de hipersinal em T2/FLAIR na substância branca periventricular posterior (Paciente 23); entre outros achados em outros pacientes.

Estas alterações podem ou não estar relacionadas a outras CNVs, uma vez que há alguns relatos constatando a presença da deleção do cromossomo 5 e desenvolvimento irregular de estruturas cranianas e cerebrais, além de alterações de sinal encefálico. Dentre as alterações apresentadas na literatura em pacientes com SCDC, encontram-se hipoplasia de vérmis cerebelar (De Michele, 1993), hipoplasia do tronco cerebral (Hong et al., 2013), ventriculomegalia moderada, hipoplasia pontina e aumento do espaço subaracnóide (Kaymak et al., 2020).

A Paciente 30, que não apresentou deleções do braço curto do cromossomo 5 no *array* e nenhuma das CNVs detectadas foi classificada como VUS, provavelmente patogênica ou patológica, também apresentou um RNM encefálico alterado com a seguinte descrição: “alteração morfológica da sulcação cortical à esquerda na topografia dos giros pré e pós-centrais, área cortical anômala, podendo estar associada a córtex displásico e/ou alterações sequelares em córtex anômalo, focos de hipersinal em T2/FLAIR na substância branca encefálica, inespecíficos, que podem estar associados a gliose ou rarefação mielínica”. Apesar do teste de *array* não indicar nenhuma alteração patogênica no caso desta paciente que justifique os achados clínicos, provavelmente a causa genética é uma disrupção gênica que deve ser avaliada pela investigação nos pontos de quebra da inversão por sequenciamento de nova geração ou utilização de técnicas de *array* de maior densidade e menos espaçamento entre as sondas.

Seguindo com a análise das alterações multissistêmicas, na literatura, observamos que alguns pacientes com a deleção em 5p apresentaram complicações que levaram à surdez, sem uma frequência estabelecida (Mainardi et al., 2006; Rodríguez-Caballero et al., 2010). Estas alterações foram ressaltadas neste estudo por estarem presentes em 27,6% dos pacientes que apresentavam alterações em BERA (Potencial evocado auditivo, do inglês, *Brainstem Evoked Response Audiometry*,) com emissões otoacústicas ausentes e perdas neurosensoriais. Encontramos alterações variadas como: a ausência do refluxo estapediano bilateral e ausência de disfunção retrococlear (Paciente 9); déficit auditivo à direita e atraso de onda S (Paciente 8); no BERA, ouvido direito normal e ouvido esquerdo com perda neurosensorial profunda (Paciente 20);

comprometimento de orelha média bilateral, avaliação em campo e limiar de reconhecimento de fala que sugerem perda auditiva de grau leve (Paciente 29).

Estudos anteriores sugerem que pacientes com 5p- podem apresentar hipersensibilidade acústica (Cornish e Pigram, 1996), perda auditiva sensorineural (Baccichetti et al., 1988) e neuropatia auditiva baseados em potenciais evocados anormais (Swanepoel, 2007), portanto, nossos achados podem realmente justificar alterações auditivas associadas à região terminal de 5p deletada mas sem referência a uma posição cromossômica ou genômica específica.

As malformações oculares estiveram presentes em 32,1% dos casos, sendo principalmente encontrados casos de miopia e hipermetropia. Outros autores não quantificaram essas características de forma isolada para critérios de comparação, porém o banco de dados da sociedade americana “The 5p minus Family Database” reportou 46% de achados oftalmológicos (Nguyen et al., 2015). Dentre os achados mais comuns da SCDC encontram-se: extropia ou o estrabismo divergente, erros de refração ocular (miopia, hipermetropia, astigmatismo), veias da retina tortuosas e atrofia óptica (Howard, 1972; Mainardi et al., 2006). Nos pacientes deste estudo, encontramos três casos de miopia e um de hipermetropia, sem relatos de outros tipos de malformações oculares.

Neste estudo, identificamos também malformações cardíacas variadas, como válvula bicúspide, comunicação interatrial, forame oval patente, persistência do canal arterial e comunicação interventricular em 41,4% dos casos, bem próximos do valor encontrado por Mainardi et al. (2006).

Quanto às alterações renais e genitais, vimos que estiveram de acordo com os achados de outros autores, com destaque para as luxações e escoliose que estiveram mais evidentes neste estudo que no de Niebuhr (1978), como por exemplo no caso da Paciente 1 que apresentou uma ressonância de coluna dorsal com escoliose acentuada à esquerda com rotação vertebral e no caso da Paciente 14 com torácica à direita com vértice em D9 e siringomielia desde C4 até cone medular.

## **5.2. Resultados anteriores e resultados obtidos pelo *array***

De forma geral, por meio do *array*, nós constatamos 23 deleções terminais, uma deleção intersticial, uma deleção seguida de duplicação em 5p, um rearranjo entre os cromossomos 5 e 9, os cromossomos 5 e 18, os cromossomos 2 e 5 e entre os cromossomos 5 e Y. Dentre os casos em que os pais foram investigados, detectamos que

todas as alterações foram *de novo*, com exceção do cromossomo derivado dos cromossomos 5 e 18, proveniente de um rearranjo complexo materno, herdado de forma não balanceada, e com exceção dos Pacientes 28 e 29, que são irmãos de mesmo pai e mesma mãe, que herdaram a deleção de forma materna, confirmada por MLPA. Essa frequência de alterações detectadas corresponde ao encontrado na literatura, inclusive no caso da Paciente 30 com inversão do cromossomo 5 por herança paterna (Niebuhr, 1978; Mainardi et al., 2001; Zhang et al., 2016).

O fato de não termos detectado CNVs relevantes no cromossomo 5 da Paciente 30 indica que essa alteração foi equilibrada, sem aparente perda ou ganho de material genético, ou que a resolução do *BeadChip* selecionado não foi suficiente para a detecção de uma alteração pequena. Na literatura, há casos de inversões familiares sendo transmitidas ao longo de gerações (Goodart et al., 1996; Concolino et al., 2002) mas não há relatos de outros pacientes com inversão nos mesmos pontos de quebra de nossa paciente para comparação de fenótipo e nem associação dessa alteração à SCDC.

A paciente 30 foi incluída no estudo especialmente pelo relato da mãe de choro agudo ao nascimento, fato este que ressaltou a necessidade de investigar deleções em 5p. Ao nos aprofundarmos no caso, constatamos que o pai apresentava a mesma alteração cromossômica no cariótipo, sendo, portanto, uma inversão pericêntrica no cromossomo 5 de herança paterna. Além disso, o pai também apresentava baixa estatura (152 cm), microcefalia e deficiência intelectual. Tias paternas e avó paterna da portadora investigada também apresentavam sintomas de depressão, sem investigação cariotípica.

Porém, ainda assim, essa paciente apresentou diversas malformações como as cerebrais e cardíacas citadas anteriormente, além de alterações como *pectus excavatum* com assimetria, braço direito com restrição em extensão de cotovelo articular, braço esquerdo com prono-supinação com protuberância em região medial de cotovelo, prega palmar única, prega acessória, clinodactilia de 5º dedo, desvio medial de 3º quirodáctilo, restrição à elevação de membro superior direito, sendo que a força muscular nesse membro foi de grau 4 e de grau 5 em membro superior esquerdo. Por este motivo, é necessário explorar mais este caso em busca da causa desses fenótipos que provavelmente se deve à disrupção gênica ou efeito de posição, por meio do qual se altera a expressão de genes próximos aos pontos de quebra (Lupski e Stankiewicz, 2005).

Observamos que o *array* alterou alguns resultados prévios de cariótipo aparentemente sem anormalidades no cromossomo 5 para deleções terminais (nos casos dos Pacientes 17, 28 e 29), uma deleção terminal era, na verdade, uma deleção intersticial

e, além disso, esclareceu os rearranjos observados nos Pacientes 9, 11, 22 e 27 com outros cromossomos concomitantemente, além de ter trazido à tona uma deleção seguida de duplicação na Paciente 5. Particularmente em relação ao Paciente 9, foi essencial realizar o teste de *array*, uma vez que ele já havia sido submetido a outros testes citogenômicos, como MLPA e FISH (Lincoln-de-Carvalho et al., 2011).

Além disso, o *array* foi capaz de precisar e alterar diversos pontos de quebra em 5p nas deleções terminais, além de estimar os tamanhos das deleções em pares de base, conforme visto na Figura 10. É sabido que o cariótipo possui uma resolução inferior ao *array* e por isso, torna-se uma opção pouco interessante a ser usada em casos familiares como no caso dos Pacientes 28 e 29. Ademais, o *array* esclareceu que o material adicional no cromossomo 5 da Paciente 11 era originário de uma duplicação terminal do braço longo do cromossomo 18, como será discutido adiante.

Nós encontramos tamanhos de deleções variando de 6,2 Mb até 34,4 Mb. Em um estudo realizado por Zhang et al. (2005), eles não identificaram pacientes com deleções terminais maiores que 33 Mb, sugerindo que monossomias com perdas de material genético maiores poderiam não ser compatíveis com a vida. Nossos resultados refutam essa ideia e aumentam em 1,4 Mb o possível limite máximo inferido de deleção compatível com a vida.

A técnica de *array* alterou o resultado da Paciente 24, que anteriormente havia sido caracterizada com uma deleção terminal com ponto de quebra final em 5p14, e passou a ter resultado de deleção intersticial entre as bandas 5p15.32 a 5p14.3.

Além disso, observamos que em um caso, da Paciente 23, houve mudança da banda do ponto de quebra terminal descrito em 5p14 para 5p15.1 e mudanças em bandas descritas por cariótipo. Em outros casos em que o resultado continha somente a região e banda cromossômica de ponto de quebra terminal, pudemos identificar a sub-banda, como na Paciente 20 com o resultado anterior de 46,XX,del(5)(p15) e passou a ser 46,XX,del(5)(p15.1).

Os estudos anteriores feitos para identificar as deleções em 5p utilizaram, como artifício de análise dos pontos de quebra, técnicas clássicas de citogenética, como cariótipo e FISH. No entanto, o cariótipo não possui resolução suficiente para precisar os pontos de quebra e o FISH investiga somente regiões específicas por meio do direcionamento das sondas a serem utilizadas. Dessa forma, o *array* destaca-se por um delineamento mais preciso dos pontos de quebra, detecção de microdeleções e microduplicações e permite inferir a relação entre genótipo-fenótipo.

### 5.3. CNVs no cromossomo 5 e correlação genótipo-fenótipo

O cromossomo 5 inteiro possui cerca de 180 Mb sendo que o braço curto ocupa 45 Mb e o resto de sua densidade cromossômica está localizada no braço longo. Uma das características mais marcantes do cromossomo 5 é sua baixa densidade gênica (Schmutz et al., 2004). Contudo, há estudos mostrando que existem atividades gênicas regulatórias mesmo a distâncias muito grandes do gene a ser expresso (Miele e Dekker, 2008).

Uma vez identificados os pontos de quebra no cromossomo 5 e realizada a associação fenotípica, foi necessário buscar na literatura genes de interesse e associar sua localização aos achados clínicos.

Sendo assim, a Figura 10 foi construída com os resultados obtidos pelo *array*, com algumas regiões genômicas específicas do cromossomo 5 associadas a fenótipos peculiares, descritos em estudos anteriores (Overhauser et al., 1994; Gersh et al., 1995; Kondoh et al., 2005; Zhang et al., 2005; Mainardi et al., 2006) e incluímos genes de relevância clínica e de relevância investigativa para este estudo.

De acordo com o DECIPHER, o braço curto do cromossomo 5 possui cerca de 254 genes, sendo que 138 deles são codificadores de proteínas. O ClinGen classifica os genes haploinsuficientes da seguinte forma: os genes *TERT* e *DNAJC21* com pontuação 1 (pouca evidência sugerindo sensibilidade à dosagem em associação com o fenótipo clínico), *CTNND2* com pontuação 2 (evidências emergentes sugestivas de sensibilidade à dosagem associadas ao fenótipo clínico) e os genes *TRIO*, *NIPBL* e *FGF10* com pontuação 3 (evidências suficientes sugerindo que a sensibilidade à dosagem está associada ao fenótipo clínico).

Dos genes sensíveis à dosagem destacados pelo ClinGen, três deles estão localizados fora dos trechos genômicos deletados nos pacientes deste estudo (*DNAJC2*, *NIPBL* e *FGF10*) e não foram considerados para análise.

Em revisão bibliográfica, Nguyen et al. (2015) avaliaram genes no braço curto do cromossomo 5 quanto aos seus efeitos de dosagem e encontraram que: 37 genes (12%) são insensíveis à dosagem, cinco genes foram classificados como haploinsuficientes (*TERT*, *SEMA5A*, *MARCH6*, *CTNND2*, *NPR3*), seis genes foram classificados como haploinsuficientes condicionais, sendo necessário outro fator, como outra alteração genética ou uma influência ambiental para terem um efeito no fenótipo (*SLC6A3*, *CDH18*, *CDH12*, *CDH10*, *CDH9*, *CDH6*) e dois genes foram classificados

como haploletais (*RICTOR*, *DAB2*). Os dados reunidos sobre genes de potencial haploinsuficiente e de efeito patogênico no fenótipo foram usados na construção da Figura 10.

Conforme a Figura 10, observamos que as deleções de 27 dos 29 pacientes com 5p- englobavam os genes *SEMA5A*, *CTNND2*, *MARCH6* e *TRIO*. Os genes *SEMA5A* e *CTNND2*, que podem levar à DI e comportamentos do espectro autista (Duan et al., 2014), justificam os achados clínicos dos pacientes. Evidências mostram que a deficiência intelectual se manifesta nos casos em que ambos os genes *SEMA5A* e *CTNND2* são deletados (Medina et al., 2000; Lu et al., 2016). Porém, outros genes podem estar associados ao quadro clínico de DI, uma vez que os pacientes 28 e 29 não apresentaram a deleção nessa região mas apresentam a DI.

O gene *MARCH6* foi associado ao choro característico da síndrome, juntamente com o gene *FLJ25076*, que está envolvido na mesma via de sinalização para degradação (Wu et al., 2005). Conforme dito neste trabalho, encontramos incongruências entre a relação entre esse gene e o choro e, por fim, consideramos que a localização do gene responsável por essa característica pode estar em uma posição anterior a 4,788,892 pb, uma vez que a paciente com este ponto de quebra inicial não apresentava esse traço.

Porém, como mais de um gene já foi associado ao choro característico, podemos supor que múltiplos genes e regiões podem ser responsáveis por esse traço fenotípico.

Mutações no gene *TRIO* estão associadas à deficiência intelectual com microcefalia, de padrão autossômico dominante. Esse gene é altamente expresso no cérebro em desenvolvimento. Mutações intragênicas, com consequente perda de função, foram associadas à deficiência intelectual moderada combinada com características do espectro autista, hiperatividade e/ou comportamento de agressividade. Além disso, Ba et al. (2016) observaram que três dos quatro pacientes investigados com mutações em *TRIO* apresentaram infecções recorrentes e que o gene apresentou diminuição na expressão no estágio inicial de desenvolvimento neuronal e impacto no desenvolvimento de neuritos, filamentos originários de células neuronais (Ba et al., 2016; Tao et al., 2019). As infecções recorrentes também foram observadas nos pacientes estudados, indicando que esse gene pouco estudado em pacientes com SCDC pode ter um alto impacto funcional.

Já os genes *IRX4*, *TERT* e *SLC6A3* foram deletados em todos os pacientes, exceto na Paciente 24. O gene *IRX4*, apesar de não ter sido citado anteriormente ou ressaltado em revisões de genes de impacto na haploinsuficiência, foi incluído porque ele

está sendo avaliado como gene candidato pela sua relação com malformações cardíacas (Cheng et al., 2011; Nelson et al., 2016). Neste estudo encontramos malformações cardíacas variadas em 41,4% dos pacientes. No entanto, todos eles possuem deleções de tamanhos e pontos de quebra diferentes, tornando impraticável inferir uma região responsável ou atribuir a causa exclusivamente ao gene *IRX4*, especialmente porque ainda permanece sem uma validação precisa das consequências fenotípicas da heterozigose do gene em humanos. Ademais, Kondoh et al. (2005) assimilaram um fragmento genômico referente às malformações cardíacas, localizado entre 17,770,293 pb e 21,394,873 pb porém essa constatação não se reproduziu nos pacientes estudados aqui.

Quanto ao gene *TERT*, nenhum paciente exibiu os sintomas clássicos da disqueratose congênita, causa por uma herança recessiva, que compreendem pigmentação reticulada da pele, distrofia ungueal e leucoceratose de mucosas. Dois pacientes (4 e 25) exibiram fios de cabelo branco, porém não é evidência suficiente para relacionar a disqueratose congênita à SCDC, principalmente porque nenhum dos pais a apresentava ou a relatou nas avaliações clínicas.

Apesar dos estudos do gene *SLC6A3* envolverem mutações e não CNVs para justificar a relação com TDAH, alterações nesse gene ainda poderiam explicar mudanças e diferenças comportamentais nos pacientes, mesmo naqueles que apresentam deleções de tamanhos semelhantes. Da mesma forma, os genes da família das caderinas (*CDH18*, *CDH12*, *CDH10*, *CDH9*, *CDH6*), deletados em proporções variadas nos pacientes com 5p-, também sugerem a alta suscetibilidade à manifestação do espectro autista (Wang et al., 2009).

Quanto ao gene *NPR3*, que esteve deletado em duas pacientes (1 e 2), nós não observamos nenhuma evidência de hipertensão, sugerindo a necessidade de mais estudos em humanos.

Em relação aos outros dados da Figura 10, especificamente os fenótipos descritos por publicações da literatura que ressaltam a correlação genótipo-fenótipo, encontramos incongruências. Observamos, por exemplo, que a região relacionada por Kondoh et al. (2005) a anomalias renais estava deletada em sete pacientes deste estudo mas nenhum deles apresentava essa alteração. Podemos inferir que, por terem usado a técnica de FISH apenas para o cromossomo 5, outras CNVs possivelmente patogênicas para esse tipo de alteração não foram investigadas. Além disso, podemos inferir que essas regiões fenotípicas não são precisas devido às técnicas utilizadas e podem estar sujeitas a variações.

Cabe ressaltar ainda que a paciente 5 apresentou, além da deleção em 5p, uma duplicação na região adjacente ao ponto de quebra da deleção. Duplicações e deleções concomitantes no mesmo cromossomo já foram identificados em outros cromossomos autossômicos, como o 4 (Novo-Filho et al., 2016). A trissomia de 5p é uma síndrome rara, cujo tamanho varia consideravelmente desde a porção 5p15 até o braço curto do cromossomo inteiro, com poucos relatos disponíveis. A região crítica da síndrome compreende as bandas 5p10-5p13.1, sendo responsável principalmente por atraso de fala, deficiência intelectual, macrocefalia, malformações em orelhas, malformações cardíacas e cerebrais, alterações em membros e ligamentos, hipotonia, convulsões, entre outros. Diversos relatos disponíveis apontam com frequência para rearranjos envolvendo duplicações e deleções no mesmo cromossomo (Cervera et al., 2005; Vera-Carbonell et al., 2009; Izzo et al., 2012; Krgovic et al., 2014).

A paciente 5 foi uma das quatro pacientes que apresentou convulsões e analisando o caso, observamos que havia outras causas não relacionadas a 5p-. Kluger et al. (2013) reportaram o caso de duas pacientes que apresentavam epilepsia generalizada e a análise cromossômica evidenciou duplicações em diferentes regiões em 5p, sendo que a região 5p13.1 estava sobreposta em ambas as situações. Os autores especularam sobre a patogenicidade da região sobreposta, apontando que o gene *FYB* poderia estar envolvido na epileptogênese, apesar de diversas ressalvas por ser uma região herdada de um pai saudável e sem esta característica. Portanto, apesar da paciente 5 deste estudo não possuir a região 5p13.1 envolvida na duplicação, restringindo a duplicação somente à região 5p13.3, não podemos descartar a responsabilidade desta região nas ocorrências da epilepsia, uma vez que ainda são escassos os dados sobre a duplicação de 5p e sua associação com epilepsia.

#### **5.4. CNVs em outros cromossomos**

Além de identificar alterações no braço curto do cromossomo 5, o *array* nos permitiu detectar desbalanços genômicos em outros cromossomos e classificá-los, conforme as normas da ACMG (Riggs et al., 2020), para possivelmente detectar outras alterações que estejam contribuindo com o fenótipo do paciente.

Nós avaliamos todas as 197 CNVs detectadas pelo *software BlueFuse™*. Encontramos 35 CNVs com tamanho superior à 500 kb (35/197; 17,8%) e 100 CNVs possuíam tamanho menor que 100 kb (100/197; 50,1%). A relevância do tamanho de uma



CNV se faz evidente no estudo de uma casuística de 15000 crianças com deficiência intelectual e malformações congênitas, no qual inferiu-se que, em cerca de 14,2% dos casos, a causa encontrava-se em CNVs maiores que 400 kb (Cooper et al., 2011). Contudo, não restringimos um tamanho de corte para a análise das CNVs indicadas pelo *software*, uma vez que diferentes estudos consideram tamanhos variados de corte e patogenicidade em CNVs menores que 100 kb (Carter, 2007; Gross et al., 2019).

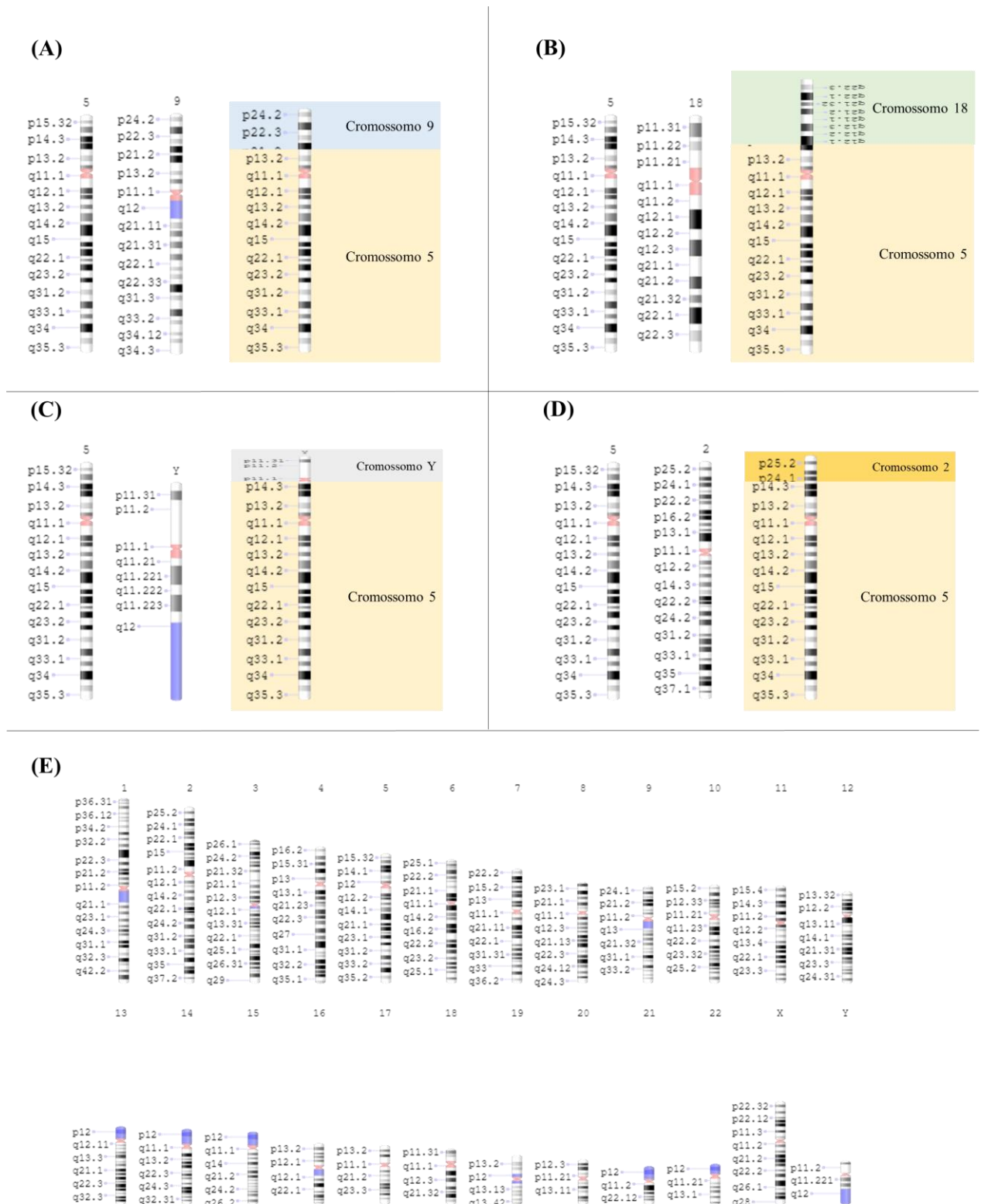
Além das já discutidas deleções patogênicas em 5p responsáveis pela SCDC, quatro outras CNVs grandes (> 20 Mb) foram classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas e estão abordadas a seguir.

#### 5.4.1. Paciente 9: duplicação de 20,6 Mb em 9p

O Paciente 9 apresentava um cariótipo sem anormalidade para o sexo masculino, porém a deleção de 5p e duplicação em 9p foram identificadas por meio das técnicas de MLPA (*kits* P036 e P070, com sondas para regiões subteloméricas) e FISH publicados anteriormente (Lincoln-de-Carvalho et al., 2011) e em seguida, confirmadas com o *array* neste estudo (arr[GRCh37]5p15.33p14.1(25328\_25351609)x1; 9p24.3p21.3(46587\_20642438)x3). A combinação das técnicas indicou que a deleção no cromossomo 5 era de 25,3 Mb, a duplicação do cromossomo 9 possuía cerca de 20,6 Mb e a duplicação se localizava no braço curto do cromossomo 5.

A combinação dos resultados obtidos nas técnicas de cariótipo, FISH, MLPA e *array* nos permitiram inferir como é esse cromossomo derivado das translocações entre os cromossomos 5 e 9 (Fig. 13-A). Com o *array* detectamos outras 14 CNVs, além da deleção em 5p e duplicação em 9p, todas classificadas como benignas ou provavelmente benignas.

Duplicações no cromossomo 9 estão relacionadas a alterações fenotípicas faciais bem características como nariz largo, ponta bulbosa, olhos fundos, microcefalia, filtro nasal curto, baixa estatura, entre outros. Há diversos relatos de associações entre a duplicação do cromossomo 9 com outras CNVs concomitantemente, causando sobreposição de fenótipos (Guilherme et al., 2014).



**Figura 13** – Representação gráfica dos rearranjos inferidos a partir dos dados moleculares obtidos dos pacientes que apresentavam translocações grandes entre o cromossomo 5 e outros cromossomos. (A) Paciente 9; (B) Paciente 11; (C) Paciente 22; (D) Paciente 27; (E) Representação de todo o conjunto cromossômico para referência sobre tamanho e proporções dos cromossomos

Outra característica associada a trissomia de 9p são as convulsões. Essa trissomia está associada a anormalidades cerebrais, neurológicas e episódios epiléticos (Stern, 1996). Além disso, na literatura, foram relatados os casos de dois pacientes com aberrações cromossômicas envolvendo a deleção de 8p e duplicação de 9p, que apresentavam epilepsias de status elétrico durante o sono (Nakayama et al., 2012).

#### 5.4.2. Paciente 11: duplicação de 48,2 Mb em 18q

A Paciente 11, da qual se suspeitou inicialmente de deleção em 5p, mostrava um cariótipo com um material genético adicional no braço curto do cromossomo 5, sem indicação da origem do mesmo. O teste de *array* indicou que, no caso, havia uma deleção em 5p, de 24,1 Mb, e uma duplicação em 18q, de 48,2 Mb (arr[GRCh37] 18q12.1q23(29782990\_78013728)×3).

Investigações familiares mostraram que a paciente havia herdado um cromossomo derivado da translocação entre os cromossomos 5 e 18 da mãe, que apresentava um cariótipo com rearranjo complexo entre os cromossomos 5, 10 e 18 com o seguinte resultado: 46,XX,t(18;5;10)(18qter-->18q11.1::5p 11.1; inv (5) (5pter-->p(11.1)::10q 11.1; 10qter-->10q 11.1::18q 11.1) (Fig. 14).

Investigações complementares traçaram a herança do rearranjo complexo até a avó materna da paciente estudada, que desenvolveu sete gestações, sendo cinco filhos já falecidos (conforme informado: um falecimento foi por rubéola aos seis meses e dos outros quatro ocorreram entre os 24 e 28 anos de vida, sem causa esclarecida), e sendo que os dois filhos vivos (a mãe da paciente e o tio materno) apresentavam o mesmo cariótipo com rearranjo complexo, inclusive herdado pela irmã mais velha da paciente, com 11 anos à época da investigação, e fenotipicamente sem anormalidades detectadas e relatadas.

O caso da Paciente 11 é único no que diz respeito aos cromossomos e pontos de quebra envolvidos, mas outros casos de rearranjos complexos já foram reportados anteriormente e com destaque para a necessidade de uma combinação de técnicas para se chegar a um resultado preciso. Pan et al. (2016) encaminharam uma investigação citogenômica para uma paciente que aparentava, no cariótipo, ter herdado os cromossomos 3 e 8 de forma desbalanceada, com duplicação de 35,4 Mb na região 15q21.3-q26.2. Contudo, uma investigação materna, utilizando a combinação de

cariótipo, *array* e sequenciamento de nova geração concluiu que tratava-se de um rearranjo complexo envolvendo os cromossomos 3, 5, 8 e 11.



**Figura 14** – Cariótipo com bandamento G da mãe da Paciente 11, indicando os cromossomos 5, 10 e 18 alterados (retângulos vermelhos)

A paciente em questão apresenta concomitantemente a deleção em 5p e a duplicação em 18q. A trissomia do cromossomo 18 é uma síndrome bem descrita, também conhecida como Síndrome de Edwards, e em muitos casos pode ser identificada em estágio pré-natal quando há duplicação completa e livre do cromossomo 18. As principais características da síndrome compreendem dismorfismos faciais e esqueléticos com destaque para a mão fechada em garra, com sobreposição dos dedos que, geralmente, são subdesenvolvidos. Também apresentam dificuldades de alimentação, anomalias cardíacas e renais congênitas (Cereda e Carey, 2012). A sobreposição da síndrome causada pela duplicação de 18q e pela deleção de 5p resultou em uma paciente dependente de cadeira de rodas, traqueostomizada, que não se comunica de forma verbal e nem gestual e apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

Além disso, como descrito anteriormente, apresenta episódios de convulsões. Diversos tipos de epilepsia já foram relatados em pacientes com duplicação de 18q, sendo essa uma característica comum à síndrome, com prevalência de 65% (Verrotti et al., 2015). Em um estudo investigativo de três irmãos com duplicação de 18q21.31-q22.2 (12 Mb), observou-se DI moderada e poucos dismorfismos como ponte nasal proeminente,

pescoço curto e escoliose, sendo que o irmão mais novo também apresentou episódios de convulsões (Ceccarini et al., 2007). A duplicação na paciente investigada é muito maior que a do relato citado, compreendendo quase o braço longo inteiro do cromossomo 18 e que ocupou a região deletada do braço curto do cromossomo 5 (Fig. 13-B).

#### 5.4.3. Paciente 22: deleção de 44,5 Mb em Yq

Inicialmente, devido à dificuldade de amamentação, pelo hipertelorismo e pelo choro fraco semelhante a um miado de gato solicitou-se o teste do cariótipo, cujo resultado foi 45,X, apesar do paciente possuir características primárias masculinizadas. Testes moleculares complementares foram realizados e a junção dos resultados de MLPA, FISH e *array* determinou que o caso se tratava de um rearranjo com uma deleção terminal de 17,8 Mb em 5p e uma deleção terminal de 44,5 Mb em Yq (arr[GRCh37] Yq11.21q12(14852740\_59335913)x0).

De acordo com as informações moleculares disponíveis, infere-se que o restante do material genético não deletado do cromossomo Y se juntou ao 5p que estava alterado e o cromossomo derivado desse rearranjo é possivelmente dicêntrico pelo ponto de quebra delimitado pelo *array* (Fig. 13-C), tornando-se outra característica crítica para os tipos de mecanismos de rearranjos mais favoráveis a esse tipo de cromossomo.

Este é outro caso de relevância clínica porque os únicos casos de homens com translocações entre os cromossomos 5 e Y foram publicados há mais de 30 anos atrás, sendo um deles descrito em mosaico (45,X,del(5)(p14)/45,X,t(Y;5)(q11;p14)) (Vignetti et al., 1977; Weber et al., 1987). Outros estudos mais recentes descrevem translocações do cromossomo Y com outros cromossomos autossomos, como 1 (Hiraki et al., 2006; Braun-Falco et al., 2007); 13 (Ing e Smith, 1983); e 17 (Bellucco et al., 2017).

Geralmente, microdeleções no cromossomo Y estão associadas à infertilidade masculina e azoospermia (Franchim et al., 2020). Estudos anteriores envolvendo translocações entre os cromossomos 5 e Y não apontam para nenhuma alteração específica associada à deleção de Y (inclusive os relatos citam genitália masculina externa presente e sem anormalidades) e apontam características fenotípicas comumente associadas à 5p-, como hipertelorismo e micrognatia, com exceção de um relato de 1977 que cita uma malformação da mão esquerda, mas que provavelmente está associada a outra alteração cromossômica não investigada (Vignetti et al., 1977; Weber

et al., 1987). Nosso caso corrobora com achados fenotípicos anteriores com maior detalhamento molecular e atualização sobre translocações entre o cromossomo 5 e o Y.

#### 5.4.4. Paciente 27: duplicação de 23,3 Mb em 2p

Inicialmente, devido ao fenótipo da paciente e, principalmente, por causa do choro semelhante ao miado de um gato, a paciente e os pais foram referidos a um geneticista para condução de testes citogenéticos. O cariótipo não apresentou anormalidades visíveis para um cariograma do sexo feminino, o que levou a família à uma investigação por meio do *array*, cujos achados indicaram uma deleção terminal de 15,6 Mb em 5p e uma duplicação de 23,3 Mb em 2p (arr[GRCh37] 2p25.3p24.1 (12770\_23337574)x3). De acordo com os resultados, inferimos que o rearranjo ocorreu conforme indicado na Figura 13-D.

Não há muita literatura disponível sobre a duplicação de 2p isolada em pacientes, apresentando-se normalmente de forma concomitante a outra alteração cromossômica. Os fenótipos descritos em portadores da duplicação isolada em 2p estão associados a baixo peso, hipertelorismo, ponte nasal baixa, malformações oculares, mandíbula pequena, orelhas de baixa implantação, pescoço curto, dificuldade para respiração, entre outros (Mégarbané et al., 1997).

Um caso parecido com este caso é o relato de uma caracterização molecular de dois irmãos portadores da trissomia de 2p24.3-pter e monossomia de 5p14.3-pter, herdados de forma paterna, na qual um dos irmãos apresenta espinha bífida como defeito da formação do tubo neural, em consequência à duplicação em 2p (Fukushi et al., 2017). Outro estudo cita uma translocação entre os cromossomos 2 e 5 em um paciente com obesidade por hiperfagia, contudo envolvendo uma microdeleção em 2q23.1 e não em 2p (Shichiji et al., 2013). Nenhuma das duas principais características apresentadas anteriormente, espinha bífida e obesidade, está presente nesta paciente, indicando como a interação entre os rearranjos moleculares é complexa.

A maior parte de estudos entre translocação dos cromossomos 2 e 5 (2p;5q) referem-se a diversos casos de leucemias e linfomas, envolvendo o braço longo do cromossomo 5 e não o braço curto como neste caso estudado. Outros estudos ainda relatam translocações entre os cromossomos 2 e 5 não associadas a cânceres mas os pontos de quebra são bastante variados (Kiss e Osztovics, 1990; Toral-López et al., 2012),

não sendo possível delimitar características específicas para cada uma das síndromes de deleção e/ou duplicação.

#### 5.4.5. CNVs menores em outros cromossomos

Além dessas alterações grandes (> 1 Mb), identificamos outras CNVs menores (entre 5 e 30 kb), classificadas como VUS após a análise e classificação de todas as CNVs encontradas em todos os pacientes:

- Paciente 3 apresentou uma deleção de 5,6 kb (arr[GRCh37] 17q21.31 (43996960\_44002555)x1). Essa alteração deletou parte do gene *MAPT* (OMIM #157140) relacionado à neurodegeneração e demência fronto-temporal associada ou não à doença de Parkinson. O paciente apresenta epilepsia, muitos movimentos repetitivos e no eletroencefalograma (EEG) trazido pela mãe do paciente no dia da consulta, constatava “anormalidade paroxística fronto-temporal bilateral e por vezes generalizada”. Sanchez et al. (2018) relatam que a presença de convulsões em pacientes acometidos com Doença de Alzheimer, paralisia supranuclear progressiva e demência frontotemporal, entre outras, é mais comum que na população em geral por causar alterações no sistema nervoso, o que poderia justificar sua presença no paciente investigado. No DGV não encontramos outros relatos de pacientes com deleções semelhantes, indicando que não é uma alteração populacional frequente, enquanto no DECIPHER, que envolve variações patogênicas, encontramos evidências de pacientes com sobreposição da alteração genômica e diversos quadros malformativos associados.

- Paciente 25 apresentou duas CNVs classificadas como VUS (arr[GRCh37] 16p13.11(15855484\_15878289)x1; 22q12.3(36753803\_36782997)x1): a primeira é uma deleção de 22,8 kb no gene *MYH11* (OMIM #132900) que codifica uma proteína relacionada à miosina de músculo liso, relacionada a aneurisma aórtico torácico, e que também apresenta potencial patogênico em decorrência da fusão com outros genes. A paciente em questão apresenta valva aórtica bicúspide, fator já associado ao aneurisma e que pode se tornar ainda mais agravante pelo gene *MYH11* envolvido. No DGV, há somente menção a três pacientes investigados em dois estudos, tornando a casuística muito baixa para ser considerada uma variação populacional. A segunda CNV, de 29,2 kb, envolve o gene *MYH9* com relatos de associação à perda auditiva sensorial não-

sindrômica, sendo que a paciente apresenta perda auditiva neurossensorial leve. Apesar da ausência de maior detalhamento da alteração auditiva, uma vez que essa característica não possui associação direta com o fenótipo da síndrome, a deleção no cromossomo 22 torna-se mais relevante e de significado incerto quanto ao seu potencial benigno ou patogênico.

Em casos de VUS, a indicação é prosseguir com o *array* dos pais do portador também para verificar a herança e esclarecer a patogenicidade ou não da CNV. Contudo, a limitação da classificação das CNVs é justamente a ausência de amostragem parental do paciente investigado que daria indícios da alteração ser herdada de um dos pais assintomático, tendendo assim à classificação de possivelmente benigno, ou se é uma alteração *de novo*, que reforçaria mais um critério para a patogenicidade da CNV.

### **5.5. Considerações sobre os mecanismos de formação e estabilização das alterações detectadas em 5p**

Diversos mecanismos já foram propostos para explicar como ocorre a estabilização de uma deleção terminal e esses mecanismos dependem do tipo de material genético que constitui a região envolvida nos pontos de quebra da dupla fita de DNA.

Uma das características que influenciam a recombinação por NAHR é a presença de sequências do tipo LINE, que estão mais sujeitas a sofrerem rearranjos quanto maior for a similaridade entre as sequências e o mesmo ocorre com as regiões de SDs: quanto maior a similaridade de sequências (>97%), maiores as chances de ocorrer um rearranjo por NAHR (Liu et al., 2011). Neste estudo, observamos que a maior parte dos pontos de quebra observados nos pacientes com SCDC era flanqueado por sequências do tipo LINE, da família L1 (LINE-1), a família mais abundante dentro das LINES.

Em relação às LINES, Startek et al. (2015) demonstraram que LINES retrotransposons possuíam alta capacidade de mediar rearranjos por NAHR a uma distância de 10 Mb de seu substrato inicial e afirmaram que as recorrências de uma relação LINE-LINE (maiores que 4 kb e com mais de 95% de similaridade) entre as CNVs em seis pacientes saudáveis estudados está mais frequente do que se imaginava inicialmente e provavelmente, sua presença e influência na diversidade genômica está subdiagnosticada. Essa informação é particularmente interessante a ser analisada no



contexto do cromossomo 5, uma vez que este possui baixa densidade gênica, sendo necessário recorrer a regulações e mediações de rearranjos feitas à distância.

A importância dos rearranjos LINE-LINE é ainda mais evidente nos casos dos rearranjos entre o cromossomo 5 e outros cromossomos, cujos pontos de quebra também apresentavam sequências do tipo LINE. Ao avaliar os rearranjos pequenos intracromossomais, como nos Pacientes 3 e 25, observamos maior frequência de sequências do tipo SINE, indicando que rearranjos maiores necessitem de sequências repetitivas mais longas.

Já no que diz respeito às sequências da família *Alu*, o método de rearranjo não compreende somente NAHR, sendo mais frequentemente associado a outros mecanismos como FoSTeS (do inglês, *Fork Stalling and Template Switching*) e MMBIR (Boone et al., 2014) demonstrando o impacto da arquitetura genômica no rearranjo ocorrido. Recentemente, um estudo sugeriu que a recombinação somática entre *Alu* e LINE-1 é comum no genoma humano e os elementos retrotransposons atuam como *hotspots* para recombinação gênica (Gu et al., 2015; Pascarella et al., 2020).

A captura de telômeros, outro mecanismo para estabilização da deleção terminal, ocorre em 17% dos casos e pode envolver cromátides-irmãs ou cromossomos homólogos e não homólogos. Esse mecanismo pode gerar rearranjos constitucionais crípticos, identificados somente por técnicas moleculares (Ballif et al., 2000; Ballif et al., 2004). A presença de sequências repetitivas ricas em guanina em pontos de quebra de deleções terminais é um indício de que essa alteração estrutural pode favorecer a aderência de um novo telômero (Bose et al., 2014).

Os casos dos pacientes que possuem rearranjos entre cromossomo 5 deletado e uma CNV proveniente de outro cromossomo (Pacientes 9, 11, 22 e 27), juntamente com a Paciente 24 que apresenta uma deleção intersticial e a Paciente 5 que possui deleção seguida de duplicação, corroboram com os achados de pesquisadores que identificaram uma série de alterações teloméricas crípticas evidenciando que muitas das deleções terminais consideradas puras, eram, na verdade, deleções intersticiais ou terminais estabilizadas pelo mecanismo de captura do telômero de outro cromossomo (Ballif et al., 2004; Santo et al., 2016).

Em relação aos pacientes portadores de inversões, como no caso da Paciente 30, observaram que pacientes saudáveis estão altamente sujeitos a sofrerem inversões cromossômicas provenientes por NAHR, sendo esse mecanismo recorrente na população e tornando essa alteração um polimorfismo (Flores et al., 2007).

Inversões podem se espalhar na população por diversos efeitos: supressão de recombinações para causar uma adaptação local de *loci* mais vantajosos, seleção epistática para alelos mais favoráveis em determinada população ou supressão de uma mutação deletéria; efeito de deriva em inversões que não são dominantes; reparo de quebras cromossomais, efeitos de posição ou distorções na meiose; seleção de alelos altamente favoráveis para a população provocando uma permanência genética com rápida disseminação populacional ao longo das gerações (Kirkpatrick e Barton, 2006).

Contudo, dependendo do conteúdo genético e da arquitetura genômica envolvida na inversão, nem sempre ela será favorável aos portadores. Um estudo de *clusters* de receptores olfatórios em 8p demonstra como a inversão em heterozigose torna maior a chance de recombinações desiguais e, conseqüentemente, alterações congênitas no portador (Giglio et al., 2001).

Dentre outras alterações detectadas neste estudo, tivemos também um caso de deleção terminal seguida por uma duplicação de 3 Mb no mesmo cromossomo. A teoria mais aceita para explicar a formação de uma deleção seguida por uma duplicação invertida é que o cromossomo com a quebra na dupla fita de DNA se dobra e para consigo mesmo, levando à formação de um cromossomo dicêntrico após a replicação do DNA, sofrendo um ciclo de quebra-fusão-ponte, que causa amplificação da região gênica e instabilidade cromossômica. Além disso, detectou-se a presença de pequenos espaçadores dissômicos (não detectados por meio de *arrays* convencionais pela sua baixa resolução para esse tipo de alteração) entre sequências invertidas e sequências não invertidas na região da duplicação. Esse mecanismo também poderia justificar duplicações invertidas justapostas a translocações e cromossomos em anel duplicados invertidos (Hermetz et al., 2014; Weckselblatt e Rudd, 2015).

Os mecanismos de rearranjos variados ressaltam a complexidade da geração de cada alteração na arquitetura do genoma, que serão desmistificados à medida que novas técnicas são desenvolvidas com resoluções mais profundas para investigar o DNA humano.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síndrome do 5p-, apesar de ser uma síndrome rara, é uma síndrome que tem sido estudada desde sua descoberta em 1967. Compreender exatamente os pontos de quebra e quais outros cromossomos ou CNVs estão impactando o fenótipo do paciente afetado fornece informações aos pais sobre como conduzir os cuidados mais adequados e estimular o desenvolvimento motor e intelectual o mais precocemente vislumbrando uma qualidade de vida mais favorável ao portador. Além disso, identificar a origem da deleção e/ou do rearranjo cromossômico proporciona um atendimento mais direcionado para o aconselhamento genético para futuras gestações.

Neste trabalho, identificamos que o *array* foi uma ferramenta essencial para a delimitação de pontos de quebra e alteração de resultados prévios obtidos no cariótipo. A mudança de um resultado estabelecido previamente pode ter um impacto na família e, portanto, o mais recomendado é que sempre se recorra a essa ferramenta em casos de dúvida ou mais detalhamento. Não podemos desconsiderar o cariótipo como uma opção acessível e ainda válida, principalmente por ser, até o momento, a única opção molecular coberta integralmente, de forma gratuita, pelo Sistema Único de Saúde.

Além disso, o contato com os pacientes e familiares e a consulta clínica detalhada com o médico geneticista proporcionou uma coleta grande de dados, principalmente em relação ao desenvolvimento dos pacientes e seus dismorfismos faciais e físicos. Esses dados permitirão um estudo fenotípico da síndrome do 5p- na população brasileira, semelhante ao que já foi realizado por outros grupos de referência em SCDC.

Dentre os achados genômicos deste estudo, destacam-se a presença de rearranjos entre o cromossomo 5 e outros cromossomos autossomos e sexuais em pontos de quebra que não foram abordados anteriormente na literatura, enriquecendo ainda mais as informações disponíveis sobre a síndrome. Deleções intersticiais, deleções seguidas de duplicações e inversões constituem outras alterações estruturais associadas à SCDC, em concordância com o que foi descrito anteriormente em estudos de grandes casuísticas de pacientes com 5p-, porém este trabalho soma novos rearranjos não descritos anteriormente.

Em um caso (Paciente 24), a ausência do choro agudo de miado de gato dificultou a identificação da síndrome, uma vez que essa é a característica que mais

encaminha para a investigação em 5p, realçando ainda mais a indicação do *array* em casos de pacientes sem etiologia suspeita, porém com MC e ADNPM.

Ademais, o desenvolvimento de um *checklist* feito em parceria entre os pesquisadores e analistas de CNVs e em conjunto com uma equipe de médicos geneticistas, favoreceu a coleção de dados muito ricos para sinalizar possíveis associações genótipo-fenótipo. Além disso, houve a criação de um banco de dados detalhado que poderá ser ampliado mediante a inclusão de mais pacientes e, conseqüentemente, aumento de casuística, que permitirá observar se as proporções de características clínicas detectadas permance. Um bom detalhamento fenotípico é essencial para a avaliação de CNVs de forma mais precisa e objetiva.

Neste trabalho, por meio do estudo das sequências repetitivas e dos pontos de quebra, pudemos inferir que o mecanismo mais comumente associado às quebras e deleções terminais no braço curto do cromossomo 5 é o mecanismo de NAHR, que depende de longas sequências de homologia (neste estudo identificadas com as LINEs), para promover o mecanismo de estabilização da quebra cromossômica.

Inferimos o impacto da NAHR nas nossas deleções, porém técnicas e abordagens mais sensíveis e com maior resolução são necessárias para confirmar nossas hipóteses. Uma combinação de *arrays* genômicos de alta resolução combinados a métodos de captura customizada, sequenciamento de nova geração e PCR de fragmentos longos pode ser a alternativa para investigar os pontos de quebra e tipos de rearranjos genômicos em pacientes com ADNPM e múltiplas MC (Hermetz et al., 2014).

Um das técnicas às quais pode se recorrer também é o sequenciamento de RNA de células individuais (do inglês, *single-cell RNA sequencing*), por meio da qual se faz uma identificação massiva de células de interesse (selecionadas e filtradas anteriormente) com código de barras para que sejam restreadas ao fim do experimento, traçando, assim, os impactos da expressão gênica no fenótipo observado. Também permite avaliar variações de expressão a níveis celulares e permite identificar os grupos celulares mais relevantes no que se estuda, de modo a atuar diretamente neles em modelos de intervenção ou modificações genéticas (Lafzi et al., 2018).

Um dos exemplos do que poderíamos conduzir a partir dos achados neste estudo sobre SCDC seria o sequenciamento *single-cell* de células T para identificar marcadores de expressão de alterações no sistema imune, principalmente considerando as infecções recorrentes que os pacientes apresentam. Conforme observado na nossa análise de dados dos genes em 5p, o gene *TRIO* pode estar relacionado à recorrência de

infecções e estudar o perfil individual das células poderiam nos indicar *clusters* mais relevantemente envolvidos nessa situação.

A investigação de outras modificações acima da arquitetura genômica do cromossomo 5, como, por exemplo, o estudo dos perfis epigenéticos, proteômicos, lipidômicos e proteômicos, também pode oferecer respostas para a investigação do fenótipo dos pacientes com SCDC e para avaliar a consequência das alterações estruturais do cromossomo 5. Análise em ácidos orgânicos de amostras de urina de pacientes com SCDC indicaram que estes apresentavam maior sinal de nove metabólitos envolvidos em diversas vias de sinalização bioquímica quando comparadas a amostras do grupo controle, indicando possível associação das alterações de metabólitos a condições neuropsiquiátricas, transformação de produtos na microbiota intestinal e/ou deficiência enzimática (Araujo et al., 2020) e recuperação de energia e glicólise (Furtado et al., 2020).

Os resultados obtidos neste trabalho, por meio da caracterização do cromossomo 5, permitiram um melhor delineamento do papel dos diferentes tamanhos da deleção em 5p na variabilidade fenotípica nos portadores da SCDC, impacto de outros rearranjos além das deleções nestes pacientes e, além disso, proporcionou maior conhecimento dos fatores envolvidos nos mecanismos de estabilização dos desarranjos genômicos.

# CONCLUSÕES

## 7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, pudemos caracterizar a região da deleção de 5p utilizando técnicas citogenômicas, principalmente a técnica de *array*.

Foi possível também delinear com maior precisão os pontos de quebra por meio dos resultados obtidos por meio do *array*, e assim alterando ou aprimorando resultados anteriores provenientes do cariótipo e outras técnicas. Juntamente às variações em 5p, pudemos associar regiões genômicas a fenótipos específicos.

A análise combinada das técnicas moleculares favoreceu a investigação de rearranjos equilibrados, como no caso da inversão de 5, e de translocações não-balanceadas entre o cromossomo 5 e outros cromossomos autossomos e sexuais.

Além disso, classificamos todas as CNVs detectadas, abrindo novas constatações acerca dos achados clínicos diferenciais dos pacientes.

E por fim, os resultados obtidos permitiram a inferência do tipo de mecanismo molecular responsável pela estabilização das alterações identificadas.



**ANEXOS**

## 8. ANEXOS

### ANEXO A

#### Ficha clínica para coleta de dados sobre a Síndrome *Cri du chat*

Nome do(a) paciente: \_\_\_\_\_

Registro HC/ICr: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo do(a) paciente: ( ) F ( ) M Data de atendimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Contato: \_\_\_\_\_

#### EVOLUÇÃO

Acompanhamentos atuais

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Acompanhamentos pregressos

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Uso de medicamentos

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

#### Exames prévios (físicos e complementares)

Cariótipo do(a) paciente e local: \_\_\_\_\_

MLPA: \_\_\_\_\_

FISH: \_\_\_\_\_

Array: \_\_\_\_\_

Cariótipo dos pais: Mãe \_\_\_\_\_

Pai \_\_\_\_\_

Outros exames e resultados: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Você foi informado sobre o risco de ter outro filho com a síndrome de *Cri du Chat*? Sim ( ) Não ( )

Se sim, qual foi o risco informado? \_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES PESSOAIS****Pré-concepção**

Idade da mãe quando engravidou: \_\_\_\_\_ anos

Foi o(a) primeiro(a) filho(a)? Sim ( ) Não ( )

Teve outras gestações após o nascimento do paciente? Sim ( ) Não ( )

Número total de gestações: \_\_\_\_\_ Número de abortos: \_\_\_\_\_

Todas as gestações foram do mesmo parceiro? Sim ( ) Não ( )

Pais consanguíneos? Sim ( ) Não ( ) Algum familiar afetado? Sim ( ) Não ( )

**Gestação e nascimento**

Teve alguma complicação na gestação? Sim ( ) Não ( )

(Qual? \_\_\_\_\_)

O(a) paciente nasceu de quantas semanas? \_\_\_\_\_

Onde nasceu? \_\_\_\_\_

Parto: ( ) Normal ( ) Cesárea (Motivo? \_\_\_\_\_)

Ao nascimento: Peso \_\_\_\_\_ Altura \_\_\_\_\_ P.Torácico \_\_\_\_\_ P.Cefálico \_\_\_\_\_

Chorou logo ao nascer? Sim ( ) Não ( ) APGAR: \_\_\_\_\_

Teve complicações no berçário? Sim ( ) Não ( ) (Quais? \_\_\_\_\_)

Recebeu alta da maternidade com quantos dias de vida? \_\_\_\_\_

Como era o choro do seu bebê? Forte ( ) Fraco ( )

Você percebeu algo diferente no seu bebê? Sim ( ) Não ( )

(O que? \_\_\_\_\_)

Tomou leite materno? Sim ( ) Não ( ) (Até quando? \_\_\_\_\_)

**Infância**

Teve dificuldade de alimentação no primeiro ano de vida? Sim ( ) Não ( )

Se sim, por que e até quando? (\_\_\_\_\_)

Baba(va) muito? Sim ( ) Não ( )

Engasga(va) muito? Sim ( ) Não ( )

Teve dificuldade de ganhar peso e altura quando criança? Sim ( ) Não ( )

Cirurgias: \_\_\_\_\_

Internações: \_\_\_\_\_

Infecções: \_\_\_\_\_

Diarréias: \_\_\_\_\_

**Desenvolvimento Motor**

Sustento cefálico: \_\_\_\_\_

Primeiros passos: \_\_\_\_\_

Sentou sem apoio: \_\_\_\_\_

Ficar em pé: \_\_\_\_\_

**Desenvolvimento Cognitivo**

Falou?	Sim ( )	Não ( )	Com que idade? _____
Forma frases?	Sim ( )	Não ( )	
Comunica através de gestos?	Sim ( )	Não ( )	
Entende comando?	Sim ( )	Não ( )	
Conhece cores?	Sim ( )	Não ( )	
Conhece letras?	Sim ( )	Não ( )	
Conhece números?	Sim ( )	Não ( )	
Sabe ler?	Sim ( )	Não ( )	
Sabe escrever?	Sim ( )	Não ( )	
Manipula dinheiro?	Sim ( )	Não ( )	
Come sozinho?	Sim ( )	Não ( )	
Higiene pessoal sozinho?	Sim ( )	Não ( )	
Auto-agressão?	Sim ( )	Não ( )	
Heteroagressão?	Sim ( )	Não ( )	
TOC?	Sim ( )	Não ( )	
Espectro autista?	Sim ( )	Não ( )	
Sente irritabilidade?	Sim ( )	Não ( )	
Fez terapia com fonoaudióloga?	Sim ( )	Não ( )	
Frequenta ou frequentou escola?	Sim ( )	Não ( )	
Se sim, escola normal ( ) ou especial ( )?			Até que idade? _____
Faz xixi sozinho?	Sim ( )	Não ( )	Desde que idade? _____
Faz cocô sozinho?	Sim ( )	Não ( )	Desde que idade? _____

Avaliação psicológica:

---



---

O que seu filho sabe ou gosta de fazer?

---



---



---

Na sua opinião, quais são as principais dificuldades no cuidado de seu(sua) filho(a)?

---



---



---

**EXAME PRESENCIAL****Antropometria**

Idade do paciente ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ p( )

Altura: \_\_\_\_\_ p( )

Perímetro Cefálico Atual: \_\_\_\_\_ p( )

Distância Intercantal Interna: \_\_\_\_\_ p( )

Distância Intercantal Externa: \_\_\_\_\_ p( )

Mão: \_\_\_\_\_ p( )

Dedo médio: \_\_\_\_\_ p( )

**Dismorfologia**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Rosto arredondado                    | <input type="checkbox"/> Filtro curto                                       |
| <input type="checkbox"/> Rosto afinado                        | <input type="checkbox"/> Cranioestenose                                     |
| <input type="checkbox"/> Assimetria facial                    | <input type="checkbox"/> Coloboma ocular                                    |
| <input type="checkbox"/> Hipertelorismo                       | <input type="checkbox"/> Voz anasalada                                      |
| <input type="checkbox"/> Estrabismo                           | <input type="checkbox"/> Fissuras palpebrais laterais inclinadas para baixo |
| <input type="checkbox"/> Dobras epicânticas                   | <input type="checkbox"/> Boca curva para baixo                              |
| <input type="checkbox"/> Ponte nasal proeminente              | <input type="checkbox"/> Língua protrusa                                    |
| <input type="checkbox"/> Orelhas de baixa implantação         | <input type="checkbox"/> Palato alto  |
| <input type="checkbox"/> Orelhas displásicas ( ) antivertidas | <input type="checkbox"/> Refluxo gastro-esofágico                           |
| <input type="checkbox"/> Hiperpigmentação                     | <input type="checkbox"/> Microretrognatia                                   |
| <input type="checkbox"/> Hipopigmentação                      | <input type="checkbox"/> Clinodactilia                                      |
| <input type="checkbox"/> Estreitamento bitemporal             | <input type="checkbox"/> Outros: _____                                      |
| <input type="checkbox"/> Fenda labial                         | _____   |
| <input type="checkbox"/> Fenda palatina                       | _____   |

**Sistema Nervoso**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Hipertonia         | <input type="checkbox"/> ADNPM                |
| <input type="checkbox"/> Hipotonia          | <input type="checkbox"/> Hiperatividade       |
| <input type="checkbox"/> Reflexos patelares | <input type="checkbox"/> Malformação cerebral |
| <input type="checkbox"/> Convulsões         | <input type="checkbox"/> Outro: _____         |

**Sistema Sensorial**

- Baixa visão
- Deficiência auditiva; tipo: \_\_\_\_\_
- Malformação ocular, tipo: \_\_\_\_\_

**Sistema Cardíaco**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Comunicação interatrial          | <input type="checkbox"/> Coarctação da aorta  |
| <input type="checkbox"/> Comunicação interventricular     | <input type="checkbox"/> Tetralogia de Fallot |
| <input type="checkbox"/> Defeito do septo atroventricular | <input type="checkbox"/> Outro: _____         |

**Malformações do trato geniturinário**

- |  |  |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Genitália ambígua | <input type="checkbox"/> Criptorquidia     |
| <input type="checkbox"/> Hidronefrose      | <input type="checkbox"/> Obstrução uretral |
| <input type="checkbox"/> Má formação renal | <input type="checkbox"/> Outro: _____      |

**Malformações musculoesqueléticas**

- Pé torto congênito
- Hérnia diafragmática
- Anomalia de membros
- Polidactilia
- Luxações \_\_\_\_\_
- Sandal gap*
- Sindactilia
- Escoliose
- Anomalia vertebral
- Outro: \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura e carimbo do médico

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data de atendimento

## ANEXO B

Quadro 1 - Quadro das principais alterações clínicas coletadas (continuação)

Paciente / Características	Exame antropométrico presencial						Características neonatais					Antecedentes clínicos				
	Sexo	Idade na avaliação (anos)	Peso (kg)	Altura (cm)	Perímetro cefálico (cm)	Microcefalia	Parto prematuro	Baixo peso ao nascer (<2500g)	Hipotonia ao nascimento	Choro agudo (miado) ao nascimento	Idade ao diagnóstico (meses)	Pneumonia	Infecções recorrentes	Irritabilidade	Autoagressão	Heteroagressão
1	F	15	30,4	143	47,5	+	+	+	+	+	7	+	-	-	+	-
2	F	9	18,4	118	45,8	+	-	-	-	+	5	+	+	+	-	+
3	M	26	67,6	170	55,4	ND	+	ND	-	+	12	+	+	+	+	-
4	M	38	NA	168	51	ND	-	-	-	+	6	+	-	-	+	-
5	F	22	52,8	154,5	48,5	ND	-	-	-	+	60	+	+	-	-	-
6	M	20	39,7	155	50	ND	-	+	ND	+	1	+	+	+	+	-
7	F	14	52,15	144	50	+	+	+	-	+	24	+	+	+	-	+
8	F	11	30	139	47	+	-	-	-	+	ND	-	+	+	+	-
9	M	8	14,2	111	43	+	-	+	-	+	3	+	+	+	+	+
10	F	8	27,4	124	48,5	+	+	+	-	+	72	-	+	+	+	+
11	F	2	11	75	39,5	+	-	-	+	+	24	-	+	+	-	-
12	F	9	22,65	124	46,5	+	-	-	ND	+	ND	+	+	ND	+	+
13	M	18	45,9	159	51,5	ND	+	+	-	+	10	-	-	-	+	-
14	F	14	34	143	48	+	+	+	+	+	20	+	+	+	+	+
15	F	4	10,2	88,5	44	+	-	-	+	+	1	-	+	-	-	+
16	M	10	36	136,5	48,5	+	-	-	-	+	18	+	+	+	+	+
17	M	3	11	95	46	+	-	-	-	+	10	+	+	+	+	+
18	M	10	25	125	49	+	-	-	-	+	5	-	+	+	+	+
19	F	5	15,5	102	45	+	+	+	+	+	6	-	+	+	+	+
20	F	2	8,5	78	43	+	-	-	-	+	6	+	+	ND	ND	ND
21	F	22	63,1	156	53,5	ND	-	-	-	+	1	-	-	+	+	+
22	M	5	12	94	41	+	-	-	-	+	4	+	+	+	+	+
23	F	9	26,9	129	47	+	-	-	+	+	12	-	+	+	+	+
24	F	13	44	151	52	-	-	ND	ND	-	6	+	-	+	+	+
25	F	16	46,2	151	47,5	+	+	+	-	+	7	+	+	-	-	-
26	F	34	38,3	143	50	ND	-	-	-	+	12	-	-	-	+	-
27	F	3	9,5	90	42,5	+	-	+	ND	+	36	+	+	+	-	-
28	F	15	65,35	156,6	56,3	-	-	-	-	+	144	+	-	ND	ND	ND
29	M	11	23,5	124	51	-	-	-	-	+	72	-	-	+	-	+
30	F	19	26	140	46,5	ND	-	+	+	+	48	+	-	-	-	-
Frequência	20 F/ 10 M	NA	NA	NA	NA	19/22	8/30	11/28	7/26	29/30	NA	19/30	21/30	19/27	19/28	16/28
%	NA	NA	NA	NA	NA	86,4	26,7	39,3	26,9	96,7	NA	63,3	70,0	70,4	67,9	57,1

## ANEXO B

Quadro 1 - Quadro das principais alterações clínicas coletadas (continuação)

Paciente / Características	Desenvolvimento cognitivo							Dismorfismos faciais														
	Fala palavras	Forma frases	Comunicação por meio de gestos	Entende comandos	Conhece cores?	Conhece letras?	Conhece números?	Face arredondada	Assimetria facial	Hipertelorismo ocular	Estrabismo	Pregas epicânticas	Ponte nasal proeminente	Orelhas de baixa implantação	Orelhas displásicas e/ou antivertidas	Apêndices pré-auriculares	Filtro nasal curto	Voz anasalada	Boca curva para baixo	Palato alto	Refluxo gastro-esofágico	Microretrognatia
1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
3	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
5	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
10	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
12	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
13	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	ND	ND	+
14	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
15	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
17	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
18	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	ND	ND	+
19	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
21	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
22	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
23	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
25	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
26	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
27	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	ND	-	+
28	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
29	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
30	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Frequência	19/30	9/30	23/30	26/30	14/30	11/30	12/30	7/30	12/30	19/30	14/30	21/30	17/30	1/30	18/30	4/30	21/30	7/30	14/30	17/27	13/28	23/30
%	63,3	30,0	76,7	86,7	46,7	36,7	40,0	23,3	40,0	63,3	46,7	70,0	56,7	3,3	60,0	13,3	70,0	23,3	46,7	63,0	46,4	76,7



## ANEXO B

Quadro 1 - Quadro das principais alterações clínicas coletadas (conclusão)

Paciente / Características	Alterações multissistêmicas															Tamanho da deleção detectada no array (em Mb)	
	SN - Hipertonia	SN - Hipotonia	SN - Reflexos patetares	SN - Convulsões	ADNPM	Hiperatividade	Alteração cerebral e/ou neurológicas	Alterações auditivas	Alterações oculares	Alterações cardíacas	Alterações no trato genitourinário	AME - Pé torto congênito	AME - Luxações	AME - <i>Sandal gap</i>	AME - Escoliose		AME - Outras alterações
1	-	-	+	-	+	+	+	-	-	FOP / CIA	-	+	-	-	+	+	34,4
2	-	-	+	-	+	+	-	-	-	PCA	-	-	-	+	+	+	33,4
3	-	-	-	+	+	+	+	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	29,9
4	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	29,8
5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,3
6	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	28,5
7	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	26,5
8	-	+	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	-	LP	+	-	-	25,6
9	-	-	+	+	+	+	ND	+	-	PCA	+	-	LQ, LC	+	+	-	25,3
10	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	LQ	-	-	+	25
11	-	-	+	+	+	-	+	+	+	CIA/CIV	-	+	-	-	-	-	24,2
12	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23,2
13	-	-	ND	-	+	+	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	-	23,2
14	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	22
15	-	+	ND	-	+	+	-	-	-	PCA	-	-	-	-	+	-	19,9
16	-	-	ND	-	+	+	-	-	-	PCA	+	+	-	-	+	+	19,1
17	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	18,9
18	-	-	ND	ND	+	+	ND	-	+	-	-	-	-	-	-	-	18,9
19	-	+	ND	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	18,1
20	-	-	ND	-	+	-	+	+	-	FOP / PCA	+	-	-	-	-	+	18,1
21	-	-	ND	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,0
22	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,8
23	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	17,6
24	-	-	ND	-	+	+	-	-	-	CIA	-	+	LP	-	+	-	17,4
25	-	-	ND	-	+	-	-	+	-	VB	-	-	-	-	+	+	17,2
26	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	17,0
27	-	-	ND	-	+	+	+	-	-	VB/CIA/ CIV	-	-	LQ	-	-	-	15,6
28	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6,2
29	-	-	ND	-	+	-	-	+	+	FOP	-	-	-	-	+	-	6,2
30	-	-	+	-	-	-	+	-	+	CIV	-	-	-	-	+	+	NA*
Frequência	0/30	6/30	16/18	4/29	28/30	16/30	14/28	8/29	9/28	12/29	4/29	6/30	5/29	6/30	12/29	14/30	NA
%	0,0	20,0	88,9	13,8	93,3	53,3	50,0	27,6	32,1	41,4	13,8	20,0	17,2	20,0	41,4	46,7	NA

**Legenda:** + (símbolo de positivo): Indicação da presença da característica; - (símbolo de negativo): Indicação da ausência da característica; A: Autoagressão; ADNPM: Atraso do Desenvolvimento Neuropsicomotor; AME: Alterações musculoesqueléticas; CIA: Comunicação interatrial; CIV: Comunicação interventricular; F: Feminino; FOP: Forame oval patente; H: Heteroagressão; LC: Luxação de cotovelos; LP: Luxação de patelas; LQ: Luxação no quadril; M: Masculino; Mb: Megabase; NA: Não aplicável; NA\*: Paciente com cariótipo 46,XX,inv(5)(p15.3q31); ND: Dado não disponível; PCA: Persistência de canal arterial; RGE: Refluxo gastroesofágico; SN: Sistema nervoso; VB: Válvula aórtica bicúspide.

## ANEXO C

**Quadro 3** - Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo *Infinium Cyto*SNP-850K *BeadChip*® (continuação)

Paciente	Posição citogenética	Tipo	Primeira sonda deletada	Última sonda deletada	Tamanho (pb)
1	1p36.13	Dup	16,367,339	16,381,718	14,380
	1p36.11	Del	25,598,276	25,760,920	162,645
	5p15.33-p13.2	Del	25,328	34,402,152	34,376,825
	6p21.33	Del	31,778,831	31,803,745	24,915
	8p23.2	Del	4,475,968	4,484,498	8,531
	9q32	Dup	115,417,171	115,589,251	172,081
	10q24.32	Del	103,992,122	104,000,307	8,186
	10q26.3	Dup	135,351,137	135,477,883	126,747
	16p13.3	Del	6,871,840	7,080,129	208,290
	17q21.31	Del	43,986,462	44,003,446	16,985
	19q13.2-q13.31	Del	43,294,394	43,542,847	248,454
	22q11.23-q12.1	Del	25,671,815	25,914,593	242,779
22q12.3	Del	33,711,322	33,728,657	17,336	
2	4q34.3	Del	181,461,281	181,572,822	111,542
	5p15.33-p13.3	Del	25,328	33,399,200	33,373,873
	6p21.31	Dup	35,503,576	35,548,236	44,661
	7p14.1	Del	38,297,145	38,329,818	32,674
	9p24.2	Del	2,728,881	2,744,472	15,592
3	1p36.11	Del	25,598,276	25,753,638	155,363
	3q12.2	Dup	100,354,524	100,445,958	91,435
	5p15.33-p13.3	Del	25,328	29,971,508	29,946,181
	14q32.33	Dup	106,071,832	106,190,145	118,314
	17q21.31	Del	43,996,960	44,002,555	5,596
4	5p15.33-p13.3	Del	25,328	29,863,566	29,838,239
	14q11.2	Del	19,280,733	20,416,499	1,135,767
	17p13.3	Dup	732,283	970,413	238,131
	17q21.31	Dup	44,168,225	44,326,245	158,021
5	1p21.1	Dup	104,107,068	104,155,944	48,877
	5p15.33-p13.3	Del	25,328	29,305,055	29,279,728
	5p13.3	Dup	29,320,222	32,402,232	3,082,011
	6q11.1	Dup	61,961,519	62,097,088	135,570
	8p21.3	Del	19,150,829	19,189,757	38,929
	15q26.3	Del	99,210,418	99,229,185	18,768
	18p11.21	Dup	14,747,958	14,899,917	151,960
	19q13.31	Del	43,779,007	43,852,461	73,455

**Quadro 3** - Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo *Infinium CytoSNP-850K BeadChip®* (continuação)

Paciente	Posição citogenética	Tipo	Primeira sonda deletada	Última sonda deletada	Tamanho (pb)
6	5p15.33-p14.1	Del	25,328	28,549,181	28,523,854
	6q22.31	Del	124,189,423	124,217,985	28,563
	6q26	Del	163,915,715	163,946,360	30,646
	13q31.1	Del	84,103,707	84,223,852	120,146
7	5p15.33-p14.1	Del	25,328	26,551,516	26,526,189
	6p21.33	Del	31,336,644	31,343,100	6,457
	16q23.2	Del	80,452,240	80,508,055	55,816
	22q13.33	Del	51,170,777	51,195,728	24,952
	Xq28	Dup	148,882,559	148,977,479	94,921
8	4q28.3	Dup	131,946,375	132,351,655	405,281
	5p15.33-p14.1	Del	25,328	25,658,882	25,633,555
	6q26	Dup	162,724,247	162,912,514	188,268
	11q24.2	Del	126,176,578	126,204,161	27,584
	14q11.2	Del	22,851,830	22,918,677	66,848
	16q23.1	Dup	75,539,436	75,575,410	35,975
	19q13.31	Del	43,647,130	43,765,830	118,701
	Xq13.2-q21.1	LOH	73,641,569	77,540,472	3,898,904
9	2p25.3	Del	72,184	251,673	179,490
	2p22.1	Del	39,252,851	39,289,958	37,108
	3p26.1	Del	4,088,576	4,286,700	198,125
	5p15.33-p14.1	Del	25,328	25,351,609	25,326,282
	5p13.2	Del	36,883,618	36,895,270	11,653
	5q15	Del	93,260,835	93,297,187	36,353
	7p12.2	Del	49,991,697	50,109,325	117,629
	8p11.1	Del	43,426,617	43,530,830	104,214
	9p24.3-p21.3	Dup	46,587	20,642,438	20,595,852
	12p12.1	Del	23,957,847	23,965,822	7,976
	12p12.1	Del	24,147,116	24,156,368	9,253
	15q13.3	Del	32,509,892	32,926,065	416,174
	15q14	Del	38,558,974	38,573,864	14,891
	17q11.2	Del	29,550,701	29,557,764	7,064
	21q11.2	Del	15,548,798	15,594,495	45,698
	22q11.23-q12.1	Del	25,671,815	25,914,593	242,779

**Quadro 3** - Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo *Infinium CytoSNP-850K BeadChip*® (continuação)

Paciente	Posição citogenética	Tipo	Primeira sonda deletada	Última sonda deletada	Tamanho (pb)
10	4q35.2	Dup	189,133,207	189,528,831	395,625
	5p15.33-p14.1	Del	25,328	25,027,618	25,002,291
	10q26.3	Dup	135,252,347	135,358,664	106,318
	12p11.21	Dup	31,266,287	31,406,907	140,621
	14q11.2	Del	22,794,295	22,913,520	119,226
	17q21.31	Dup	44,239,958	44,250,433	10,476
	19q13.31	Dup	43,491,087	43,652,230	161,144
	19q13.42	Del	53,913,651	53,951,725	38,075
12	1p21.1	Del	106,164,864	106,215,029	50.166
	3q26.32	Dup	175,893,082	175,937,783	44.702
	4q13.3	Del	71,165,491	71,272,547	107.057
	5p15.33-p14.3	Del	25.328	23,243,400	23,218,073
	7q11.23	Dup	76,137,375	76,557,212	419.838
	12p13.31	Dup	8,021,932	8,086,083	64.152
	14q11.2	Del	22,787,541	22,865,063	77.523
	14q11.2	Del	22,875,443	22,913,575	38.133
	15q26.3	Del	99,209,470	99,243,598	34.129
	22q11.23-q12.1	Del	25,687,568	25,924,444	236.877
13	5p15.33-p14.3	Del	25,328	23,210,180	23,184,853
	10q11.21	Dup	45,216,112	45,359,483	143,372
	13q31.1	Del	84,103,707	84,171,548	67,842
	19q13.2	Dup	41,350,996	41,365,095	14,100
	19q13.31	Dup	44,858,873	44,889,660	30,788
14	5p15.33-p14.3	Del	25,328	22,039,679	22,014,352
	7p14.3	Dup	33,135,246	33,178,254	43,009
	8p23.3	Dup	2,143,681	2,164,712	21,032
	14q21.1	Dup	40,254,333	40,347,357	93,025
	20q13.33	Dup	59,569,516	59,589,272	19,757
15	5p15.33-p14.3	Del	25,328	19,892,934	19,867,607
	6q22.31	Dup	124,434,003	124,474,595	40,593
	7q31.1	Del	111,073,710	111,265,262	191,553
	8p23.2	Del	5,790,102	5,835,671	45,570
	10q26.3	Dup	135,252,347	135,378,802	126,456
	14q11.2	Del	22,625,374	22,795,270	169,897
	15q22.33	Del	67,373,378	67,392,631	19,254

**Quadro 3** - Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo *Infinium CytoSNP-850K BeadChip®* (continuação)

Paciente	Posição citogenética	Tipo	Primeira sonda deletada	Última sonda deletada	Tamanho (pb)
16	2p15	Dup	61,531,694	61,713,526	181,833
	5p15.33-p14.3	Del	25,328	19,087,783	19,062,456
	12p11.21	Dup	31,266,287	31,406,907	140,621
	19q13.2-q13.31	Del	43,286,158	43,530,840	244,683
	22q11.23-q12.1	Dup	25,707,472	25,910,879	203,408
17	1q23.2	Del	159,995,633	160,006,809	11.177
	5p15.33-p14.3	Del	25.328	18,921,988	18,896,661
	8q22.2	Del	100,307,349	100,346,236	38.888
	14q21.2	Del	45,181,337	45,225,953	44.617
	17q12	Dup	34,443,811	34,472,963	29.153
	19q13.41q13.42	Del	53,537,923	53,694,223	156.301
	20q13.31	Del	55,407,859	55,426,819	18.961
Xq21.31-121.32	Dup	91,783,608	92,249,593	465.986	
18	5p15.33-p14.3	Del	25,328	18,895,407	18,870,080
	5q15	Del	97,795,382	97,918,829	123,448
	10q11.22	Dup	47,543,322	47,703,869	160,548
	13q21.33	Dup	69,108,325	69,601,840	493,516
	13q21.33	Del	70,744,882	70,773,398	28,517
	13q22.1	Dup	74,010,099	74,386,793	376,695
	16q23.1	Dup	75,539,436	75,574,424	34,989
19	3p26.3	Del	1,186,687	1,230,424	43,738
	5p15.33-p15.1	Del	25,328	18,168,945	18,143,618
	10p14	Dup	12,100,735	12,154,833	54,099
	10q11.21	Dup	45,203,658	45,359,483	155,826
	13q13.3	Del	38,070,549	38,121,560	51,012
	14q11.2	Del	22,765,112	22,913,575	148,464
	14q21.1	Del	41,332,323	41,686,695	354,373
20	1p36.11	Del	25,598,276	25,647,782	49,507
	1p34.2	Del	43,398,476	43,422,401	23,926
	5p15.33-p15.1	Del	25,328	18,099,766	18,074,439
	5p12	Del	45,858,842	45,881,268	22,427
	7p21.3	Del	8,825,260	8,856,074	30,815
	7p14.3	Dup	33,133,742	33,179,557	45,816
	7q34	Del	142,430,044	142,496,293	66,250
	9q32	Del	115,821,485	115,881,664	60,180
	10q26.3	Dup	135,256,762	135,358,664	101,903

**Quadro 3** - Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo *Infinium CytoSNP-850K BeadChip®* (continuação)

Paciente	Posição citogenética	Tipo	Primeira sonda deletada	Última sonda deletada	Tamanho (pb)
21	5p15.33-p15.1	Del	25,328	18,022,107	17,996,780
	6q27	Dup	168,339,197	168,595,832	256,636
	10q11.22	Dup	47,049,547	47,703,869	654,323
	20p12.1	Del	14,705,888	14,776,940	71,053
	20q12	Del	40,498,908	40,526,564	27,657
	Xp22.31	Dup	6,336,577	8,229,990	1,893,414
23	1p12	Del	120,491,213	120,580,212	89,000
	2q13	Dup	110,863,095	110,980,346	117,252
	2q37.3	Del	242,853,745	243,034,519	180,775
	3p13	Del	71,126,314	71,151,070	24,757
	5p15.33-p15.1	Del	25,328	17,656,351	17,631,024
	5q31.2	Del	138,408,956	138,532,199	123,244
	6p21.31	Del	36,019,352	36,041,270	21,919
	11p13	Del	31,424,603	31,573,838	149,236
	11q12.2	Del	61,198,070	61,247,995	49,926
	12q21.31	Del	82,158,129	82,434,628	276,500
	16p13.11	Del	15,864,406	15,870,309	5,904
	17q21.31	Del	43,994,386	44,004,924	10,539
	17q21.31	Del	44,013,938	44,058,629	44,692
	19p12	Del	20,630,360	20,715,228	84,869
24	5p15.32-p14.3	Del	4,788,892	22,219,836	17,430,945
	14q11.2	Del	21,358,155	21,422,666	64,512
	19q13.41	Dup	53,324,520	53,356,610	32,091
	22q11.21	Dup	18,915,347	19,001,744	86,398
	Xq28	Dup	148,882,559	148,977,479	94,921
25	3q21.1	Del	121,923,326	121,939,770	16,445
	5p15.33-p15.1	Del	25,328	17,235,998	17,210,671
	9p23	Del	11,820,083	11,880,552	60,470
	16p13.11	Del	15,855,484	15,878,289	22,806
	22q12.2	Del	30,009,261	30,016,515	7,255
	22q12.3	Del	36,753,803	36,782,997	29,195
	Xq23	Dup	112,197,450	112,703,796	506,347

**Quadro 3** - Quadro com todas as CNVs identificadas nas amostras avaliadas pelo *Infinium CytoSNP-850K BeadChip®* (conclusão)

Paciente	Posição citogenética	Tipo	Primeira sonda deletada	Última sonda deletada	Tamanho (pb)
26	2p22.2	Dup	37,687,770	37,754,020	66,251
	4p15.2	Dup	23,663,235	23,714,895	51,661
	5p15.33-p15.1	Del	25,328	16,986,171	16,960,844
	12p11.21	Dup	31,259,372	31,406,907	147,536
	14q11.2	Del	22,794,295	22,903,931	109,637
	19p12	Del	20,630,360	20,715,228	84,869
	Xp22.31	Dup	6,507,158	8,091,350	1,584,193
28	5p15.33-p15.32	Del	25,328	6,197,044	6,171,717
	17q21.31	Del	43,996,960	44,003,599	6,640
	18p11.23	Dup	7,164,754	7,192,456	27,703
	18q22.1	Del	65,848,177	65,896,088	47,912
	19q13.42	Dup	53,609,534	53,763,720	154,187
29	2q12.3	Dup	108,545,409	109,099,477	554,069
	5p15.33-p15.32	Del	25,328	6,189,781	6,164,454
	7q11.21	Del	62,037,105	62,126,629	89,525
	14q11.2	Dup	20,895,646	20,903,906	8,261
	18p11.23	Dup	7,164,754	7,199,531	34,778
	19p13.3	Dup	474,588	511,453	36,866
	19p12	Del	20,190,141	20,314,416	124,276
Xp11.21	Del	57,628,448	57,875,542	247,095	
30	1p36.22	Dup	9,324,571	9,364,634	40,064
	5q12.1	Del	61,428,137	61,461,609	33,473
	6q25.1	Del	151,120,686	151,161,086	40,401
	7p22.2-p22.1	Dup	4,366,797	4,534,797	168,001
	7p14.3	Dup	33,144,827	33,169,258	24,432
	10q11.22	Dup	47,590,956	47,703,869	112,914

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):16-26.

Alkaya DU, Karaman B, Tüysüz B. Three Offspring with Cri-du-Chat Syndrome from Phenotypically Normal Parents. *Mol Syndromol.* 2020;11(2):97-103.

Araújo BR, Furtado DZS, de Moura Leite FBV, de Assunção NA, Carrilho E. Metabolic profiling of organic acids in urine samples of Cri Du Chat syndrome individuals by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1153:122267.

Arisaka H, Sakuraba S, Matsumoto M, Kitahama H, Furuya M, Yoshida K, Takeda J. Airway evaluation by CT imaging for cri-du-chat syndrome. *J Anesth.* 2006;20(3):258-9.

Armanios, M., Chen, J.-L., Chang, Y.-P. C., Brodsky, R. A., Hawkins, A., Griffin, C. A., Eshleman, J. R., Cohen, A. R., Chakravarti, A., Hamosh, A., Greider, C. W. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 15960-15964, 2005.

Arron K, Oliver C, Berg K, Moss J, Burbidge C. Prevalence, phenomenology of self-injurious and aggressive behavior in genetic syndromes. *J Intellect Disabil Res.* 2011;55(2):109-20.

Ba W, Yan Y, Reijnders MR, Schuurs-Hoeijmakers JH, Feenstra I, Bongers EM, Bosch DG, De Leeuw N, Pfundt R, Gilissen C, De Vries PF, Veltman JA, Hoischen A, Mefford HC, Eichler EE, Vissers LE, Nadif Kasri N, De Vries BB. TRIO loss of function is associated with mild intellectual disability and affects dendritic branching and synapse function. *Hum Mol Genet.* 2016;25(5):892-902.

Baccichetti C, Lenzini E, Artifoni L, Caufin D, Marangoni P. Terminal deletion of the short arm of chromosome 5. *Clin Genet*. 1988;34(4):219-23.

Ballif BC, Kashork CD, Shaffer LG. FISHing for mechanisms of cytogenetically defined terminal deletions using chromosome-specific subtelomeric probes. *Eur J Hum Genet*. 2000;8(10):764-70.

Ballif BC, Wakui K, Gajicka M, Shaffer LG. Translocation breakpoint mapping and sequence analysis in three monosomy 1p36 subjects with der(1)t(1;1)(p36;q44) suggest mechanisms for telomere capture in stabilizing de novo terminal rearrangements. *Hum Genet*. 2004;114(2):198-206.

Bellucco FT, Nunes N, Colovati MES, Malinverni ACM, Caneloi TP, Soares MF, A Perez AB, Melaragno MI. Miller-Dieker Syndrome due to a 5.5-Mb 17p Deletion in a 17;Y Pseudodicentric Chromosome. *Cytogenet Genome Res*. 2017;152(1):29-32.

Boone PM, Yuan B, Campbell IM, Scull JC, Withers MA, Baggett BC, Beck CR, Shaw CJ, Stankiewicz P, Moretti P, Goodwin WE, Hein N, Fink JK, Seong MW, Seo SH, Park SS, Karbassi ID, Batish SD, Ordóñez-Ugalde A, Quintáns B, Sobrido MJ, Stemmler S, Lupski JR. The Alu-rich genomic architecture of SPAST predisposes to diverse and functionally distinct disease-associated CNV alleles. *Am J Hum Genet*. 2014;95(2):143-61.

Bose P, Hermetz KE, Conneely KN, Rudd MK. Tandem repeats and G-rich sequences are enriched at human CNV breakpoints. *PLoS One*. 2014;9(7):e101607.

Braun-Falco M, Schempp W, Nevinny-Stickel-Hinzpeter C, Köhn FM. Azoospermia due to a unique de novo balanced reciprocal translocation (Y;1)(q12;q25). *J Androl*. 2007;28(5):647-51.

Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(9-10):1042-8.

Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet*. 2007;39(7 Suppl):S16-S21.

Ceccarini C, Sinibaldi L, Bernardini L, De Simone R, Mingarelli R, Novelli A, Dallapiccola B. Duplication 18q21.31-q22.2. *Am J Med Genet A*. 2007;143(4):343-8.

Cereda A, Carey JC. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7:81.

Cervantes RB, Lundblad V. Mechanisms of chromosome-end protection. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(3):351-6.

Cervera M, Sánchez S, Molina B, Alcántara MA, Del Castillo V, Carnevale A, González-del Angel A. Trisomy of the short arm of chromosome 5 due to a de novo inversion and duplication (5)(p15.3 p13.3). *Am J Med Genet A*. 2005;136A(4):381-5.

Chalmers IJ, Höfler H, Atkinson MJ. Mapping of a cadherin gene cluster to a region of chromosome 5 subject to frequent allelic loss in carcinoma. *Genomics*. 1999;57(1):160-3.

Cehimi SN, Zanardo ÉA, Ceroni JRM, Nascimento AM, Madia FAR, Dias AT, Filho GMN, Montenegro MM, Damasceno J, Costa TVMM, Gasparini Y, Kim CA, Kulikowski LD. Breakpoint delineation in 5p- patients leads to new insights about microcephaly and the typical high-pitched cry. *Mol Genet Genomic Med*. 2020;8(2):e957.

Cheng Z, Wang J, Su D, Pan H, Huang G, Li X, Li Z, Shen A, Xie X, Wang B, Ma X. Two novel mutations of the IRX4 gene in patients with congenital heart disease. *Hum Genet*. 2011;130(5):657-62.

Collins MS, Cornish K. A survey of the prevalence of stereotypy, self-injury and aggression in children and young adults with Cri du Chat syndrome. *J Intellect Disabil Res*. 2002;46(Pt 2):133-40.

Concolino D, Iembo MA, Rossi E, Giglio S, Coppola G, Miraglia Del Giudice E, Strisciuglio P. Familial pericentric inversion of chromosome 5 in a family with benign neonatal convulsions. *J Med Genet*. 2002 Mar;39(3):214-6.

Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiess H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder

C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011;43(9):838-46.

Cornish KM, Pigram J. Developmental and behavioural characteristics of cri du chat syndrome. *Arch Dis Child.* 1996;75(5):448-50.

Corrêa T, Feltes BC, Riegel M. Integrated analysis of the critical region 5p15.3-p15.2 associated with cri-du-chat syndrome. *Genet Mol Biol.* 2019;42(1 suppl 1):186-196.

De Michele G, Presta M, Di Salle F, Serra L, Mazzaccara A, Della Rocca G, Ambrosio G, Filla A. Cerebellar vermis hypoplasia in a case of cri-du-chat syndrome. *Acta Neurol (Napoli).* 1993 Apr;15(2):92-6.

Du HY, Idol R, Robledo S, Ivanovich J, An P, Londono-Vallejo A, Wilson DB, Mason PJ, Bessler M. Telomerase reverse transcriptase haploinsufficiency and telomere length in individuals with 5p- syndrome. *Aging Cell.* 2007;6(5):689-97.

Duan Y, Wang SH, Song J, Mironova Y, Ming GL, Kolodkin AL, Giger RJ. Semaphorin 5A inhibits synaptogenesis in early postnatal- and adult-born hippocampal dentate granule cells. *Elife.* 2014;3:e04390.

Elmakky A, Carli D, Lugli L, Torelli P, Guidi B, Falcinelli C, Fini S, Ferrari F, Percesepe A. A three-generation family with terminal microdeletion involving 5p15.33-32 due to a whole-arm 5;15 chromosomal translocation with a steady phenotype of atypical cri du chat syndrome. *Eur J Med Genet.* 2014;57(4):145-50.

Flores M, Morales L, Gonzaga-Jauregui C, Domínguez-Vidaña R, Zepeda C, Yañez O, Gutiérrez M, Lemus T, Valle D, Avila MC, Blanco D, Medina-Ruiz S, Meza K, Ayala E, García D, Bustos P, González V, Girard L, Tusie-Luna T, Dávila G, Palacios R. Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(15):6099-106.

Foroud T, Pankratz N, Martinez M; PROGNI/GSPD-European Consortium. Chromosome 5 and Parkinson disease. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(10):1106-10.

Franchim CS, Soares-Junior JM, Serafini PC, Monteleone PAA, Coccuzza MS, Zanardo EA, Montenegro MM, Dias AT, Kulikowski LD, Baracat EC. Efficacy of MLPA for detection of Y-chromosome microdeletions in infertile Brazilian patients. *J Assist Reprod Genet.* 2020 May;37(5):1251-1259.

Fukushi D, Kurosawa K, Suzuki Y, Suzuki K, Yamada K, Watanabe S, Yokochi K, Wakamatsu N. Clinical and molecular genetic characterization of two siblings with trisomy 2p24.3-pter and monosomy 5p14.3-pter. *Am J Med Genet A.* 2017;173(8):2201-2209.

Furtado DZS, Leite FBVM, Jedlicka LDL, Souza DS, Barreto CN, da Silva HDT, Assunção NA. Targeted analysis reveals alteration in pathway in 5p minus individuals. *Biomed Chromatogr.* 2020;34(1):e4673.

Gersh M, Goodart SA, Pasztor LM, Harris DJ, Weiss L, Overhauser J. Evidence for a distinct region causing a cat-like cry in patients with 5p deletions. *Am J Hum Genet.* 1995;56(6):1404-10.

Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O. Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet.* 2001;68(4):874-83.

Goodart SA, Butler MG, Overhauser J. Familial double pericentric inversion of chromosome 5 with some features of cri-du-chat syndrome. *Hum Genet.* 1996;97(6):802-7.

Greeley ET, Kessler KA, Vohra N. Clinical Applications of Noninvasive Prenatal Testing. *J Fetal Med.* 2015;2:11-17.

Gross AM, Ajay SS, Rajan V, Brown C, Bluske K, Burns NJ, Chawla A, Coffey AJ, Malhotra A, Scocchia A, Thorpe E, Dzidic N, Hovanes K, Sahoo T, Dolzhenko E, Lajoie B, Khouzam A, Chowdhury S, Belmont J, Roller E, Ivakhno S, Tanner S, McEachern J, Hambuch T, Eberle M, Hagelstrom RT, Bentley DR, Perry DL, Taft RJ. Copy-number

variants in clinical genome sequencing: deployment and interpretation for rare and undiagnosed disease. *Genet Med*. 2019;21(5):1121-1130.

Gu S, Yuan B, Campbell IM, Beck CR, Carvalho CM, Nagamani SC, Erez A, Patel A, Bacino CA, Shaw CA, Stankiewicz P, Cheung SW, Bi W, Lupski JR. Alu-mediated diverse and complex pathogenic copy-number variants within human chromosome 17 at p13.3. *Hum Mol Genet*. 2015;24(14):4061-77.

Guilherme RS, Hermetz KE, Varela PT, Perez AB, Meloni VA, Rudd MK, Kulikowski LD, Melaragno MI. Terminal 18q deletions are stabilized by neotelomeres. *Mol Cytogenet*. 2015;8(32):1-7.

Guilherme RS, Meloni VA, Perez AB, Pilla AL, de Ramos MA, Dantas AG, Takeno SS, Kulikowski LD, Melaragno MI. Duplication 9p and their implication to phenotype. *BMC Med Genet*. 2014;15:142.

Hall JG, Allanson JE, Gripp KW, Slavotinek AM. *Handbook of physical measurements*. 2a ed. New York: Oxford University Press; 2007.

Hermetz KE, Newman S, Conneely KN, Martin CL, Ballif BC, Shaffer LG, Cody JD, Rudd MK. Large inverted duplications in the human genome form via a fold-back mechanism. *PLoS Genet*. 2014;10(1):e1004139.

Higurashi M, Oda M, Iijima K, Iijima S, Takeshita T, Watanabe N, Yoneyama K. Livebirth prevalence and follow-up of malformation syndromes in 27,472 newborns. *Brain Dev*. 1990;12(6):770-3.

Hiraki Y, Fujita H, Yamamori S, Ohashi H, Eguchi M, Harada N, Mizuguchi T, Matsumoto N. Mild craniosynostosis with 1p36.3 trisomy and 1p36.3 deletion syndrome caused by familial translocation t(Y;1). *Am J Med Genet A*. 2006;140(16):1773-7.

Hong JH, Lee HY, Lim MK, Kim MY, Kang YH, Lee KH, Cho SG. Brain stem hypoplasia associated with Cri-du-Chat syndrome. *Korean J Radiol*. 2013;14(6):960-2.

Honjo RS, Mello CB, Pimenta LSE, Nuñez-Vaca EC, Benedetto LM, Khoury RBF, Befi-Lopes DM, Kim CA. Cri du Chat syndrome: Characteristics of 73 Brazilian patients. *J Intellect Disabil Res.* 2018;62(6):467-473.

Howard RO. Ocular abnormalities in the cri du chat syndrome. *Am J Ophthalmol.* 1972;73(6):949-54.

Ing PS, Smith SD. Cytogenetic studies of a patient with mosaicism of isochromosome 13q and a dicentric (Y;13) translocation showing differential centromeric activity. *Clin Genet.* 1983;24(3):194-9.

Izzo A, Genesio R, Ronga V, Nocera V, Marullo L, Cicatiello R, Sglavo G, Paladini D, Conti A, Nitsch L. 40 Mb duplication in chromosome band 5p13.1p15.33 with 800 kb terminal deletion in a foetus with mild phenotypic features. *Eur J Med Genet.* 2012;55(2):140-4.

Kaymak D, Alpay V, Erenel H, Adaletli İ, Comunoglu N, Madazli R. Prenatal Diagnosis of 5p Deletion Syndrome with Brain Abnormalities by Ultrasonography and Fetal Magnetic Resonance Imaging: A Case Report. *Fetal Pediatr Pathol.* 2020;39(5):446-451.

Kirkpatrick M, Barton N. Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics.* 2006;173(1):419-34.

Kiss P, Osztovcics M. Familial translocation, t(2;5)(p23;q31) follow-up after 15 years. *Clin Genet.* 1990;38(5):397-8.

Kluger G, Koehler U, Neuhan TM, Pieper T, Staudt M, von Stülpnagel C. Generalized epilepsy in two patients with 5p duplication. *Neuropediatrics.* 2013;44(4):225-9.

Kolodner RD, Putnam CD, Myung K. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 2002;297(5581):552-7.

Kondoh T, Shimokawa O, Harada N, Doi T, Yun C, Gohda Y, Kinoshita F, Matsumoto T, Moriuchi H. Genotype-phenotype correlation of 5p-syndrome: pitfall of diagnosis. *J Hum Genet.* 2005;50(1):26-9.

Krgovic D, Blatnik A, Burmas A, Zagorac A, Kokalj Vokac N. A coalescence of two syndromes in a girl with terminal deletion and inverted duplication of chromosome 5. *BMC Med Genet.* 2014;15:21.

Kuang DB, Zhou JP, Li MP, Tang J, Chen XP. Association of NPR3 polymorphism with risk of essential hypertension in a Chinese population. *J Clin Pharm Ther.* 2017;42(5):554-560.

Lafzi A, Moutinho C, Picelli S, Heyn H. Tutorial: guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies. *Nat Protoc.* 2018 Dec;13(12):2742-2757.

Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem.* 2008;283(1):1-5.

Lincoln-de-Carvalho CR, Vicente FM, Vieira TA, de Mello MP, Marques-de-Faria AP. A de novo cryptic 5p deletion and 9p duplication detected by subtelomeric MLPA in a boy with cri du chat syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(2):450-4.

Liu P, Lacaria M, Zhang F, Withers M, Hastings PJ, Lupski JR. Frequency of nonallelic homologous recombination is correlated with length of homology: evidence that ectopic synapsis precedes ectopic crossing-over. *Am J Hum Genet.* 2011;89(4):580-8.

Lu Q, Aguilar BJ, Li M, Jiang Y, Chen YH. Genetic alterations of  $\delta$ -catenin/NPRAP/Neurojungin (CTNND2): functional implications in complex human diseases. *Hum Genet.* 2016;135(1sim0):1107-1116.

Luo Y, Hermetz KE, Jackson JM, Mulle JG, Dodd A, Tsuchiya KD, Ballif BC, Shaffer LG, Cody JD, Ledbetter DH, Martin CL, Rudd MK. Diverse mutational mechanisms cause pathogenic subtelomeric rearrangements. *Hum Mol Genet.* 2011;20(19):3769-78.

Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 2005;1(6):e49.

Mainardi PC, Pastore G, Castronovo C, Godi M, Guala A, Tamiazzo S, Provera S, Pierluigi M, Bricarelli FD. The natural history of Cri du Chat Syndrome. A report from the Italian Register. *Eur J Med Genet.* 2006;49(5):363-83.



- Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M, Dagna Bricarelli F. Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. *J Med Genet.* 2001;38:151-8.
- Manning M, Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med.* 2010;12(11):742-5.
- Marinescu RC, Johnson EI, Dykens EM, Hodapp RM, Overhauser J. No relationship between the size of the deletion and the level of developmental delay in cri-du-chat syndrome. *Am J Med Genet.* 1999;86(1):66-70.
- Marinescu RC, Mainardi PC, Collins MR, Kouahou M, Coucourde G, Pastore G, Eaton-Evans J, Overhauser J. Growth charts for cri-du-chat syndrome: an international collaborative study. *Am J Med Genet.* 2000;94(2):153-62.
- McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. *An International System for Human Cytogenomic Nomenclature.* Switzerland: Karger; 2016.
- Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS. Hemizyosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics.* 2000;63(2):157-64.
- Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet.* 2002;3(2):91-102.
- Mégarbané A, Souraty N, Prieur M, Theophile D, Chédid P, Augé J, Vekemans M. Interstitial duplication of the short arm of chromosome 2: report of a new case and review. *J Med Genet.* 1997;34(9):783-6.
- Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(18):7049-53.
- Miele A, Dekker J. Long-range chromosomal interactions and gene regulation. *Mol Biosyst.* 2008;4(11):1046-57.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749-64.

Myers P. Tandem repeats and morphological variation. *Nat Educ.* 2007;1(1):1.

Nakayama T, Nabatame S, Saito Y, Nakagawa E, Shimojima K, Yamamoto T, Kaneko Y, Okumura K, Fujie H, Uematsu M, Komaki H, Sugai K, Sasaki M. 8p deletion and 9p duplication in two children with electrical status epilepticus in sleep syndrome. *Seizure.* 2012;21(4):295-9.

Nelson DO, Lalit PA, Biermann M, Markandeya YS, Capes DL, Adesso L, Patel G, Han T, John MC, Powers PA, Downs KM, Kamp TJ, Lyons GE. Irx4 Marks a Multipotent, Ventricular-Specific Progenitor Cell. *Stem Cells.* 2016;34(12):2875-2888.

Nguyen JM, Qualmann KJ, Okashah R, Reilly A, Alexeyev MF, Campbell DJ. 5p deletions: Current knowledge and future directions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2015;169(3):224-38.

Niebuhr E. The Cri du Chat syndrome: epidemiology, cytogenetics, and clinical features. *Hum Genet.* 1978;44(3):227-75.

Novo-Filho GM, Montenegro MM, Zanardo ÉA, Dutra RL, Dias AT, Piazzon FB, Costa TV, Nascimento AM, Honjo RS, Kim CA, Kulikowski LD. Subtelomeric Copy Number Variations: The Importance of 4p/4q Deletions in Patients with Congenital Anomalies and Developmental Disability. *Cytogenet Genome Res.* 2016;149(4):241-246.

Overhauser J, Huang X, Gersh M, Wilson W, McMahon J, Bengtsson U, Rojas K, Meyer M, Wasmuth JJ. Molecular and phenotypic mapping of the short arm of chromosome 5:

sublocalization of the critical region for the cri-du-chat syndrome. *Hum Mol Genet.* 1994;3(2):247-52.

Pan Q, Hu H, Han L, Jing X, Liu H, Yang C, Zhang F, Hu Y, Yue H, Ning Y. Mapping Breakpoints of Complex Chromosome Rearrangements Involving a Partial Trisomy 15q23.1-q26.2 Revealed by Next Generation Sequencing and Conventional Techniques. *PLoS One.* 2016;11(5):e0154574.

Pascarella G, Hashimoto K, Busch A, Luginbühl J, Parr C, Hon CC, Yip WH, Kratz A, Bonetti A, Agostini F, Severin J, Murayama S, Gustincich S, Frith M, Carninci P. Non-allelic homologous recombination of Alu and LINE-1 elements generates somatic complexity in human genomes. *bioRxiv*; 2020.

Pennaneach V, Putnam CD, Kolodner RD. Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 2006;59(5):1357-68.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:2934-8.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006;444(7118):444-54.

Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, Raca G, Ritter DI, South ST, Thorland EC, Pineda-Alvarez D, Aradhya S, Martin CL. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020;22(2):245-57.

Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Rodríguez-Pérez A, Serrera-Figallo MA, Hernández-Guisado JM, Machuca-Portillo G. Cri du chat syndrome: a critical review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(3):e473-8.

Sánchez MP, García-Cabrero AM, Sánchez-Elexpuru G, Burgos DF, Serratosa JM. Tau-Induced Pathology in Epilepsy and Dementia: Notions from Patients and Animal Models. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1092.

Santo LDE, Moreira LM, Riegel M. Cri-Du-Chat Syndrome: clinical profile and chromosomal microarray analysis in six patients. *Biomed Res Int*. 2016;1-9.

Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, Gordon LA, Scott D, Xie G, Huang W, Hellsten U, Tran-Gyamfi M, She X, Prabhakar S, Aerts A, Altherr M, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caoile C, Challacombe JF, Chan YM, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Lopez F, Lou Y, Martinez D, Medina C, Morgan J, Nandkeshwar R, Noonan JP, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Priest J, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wheeler J, Wu K, Yang J, Dickson M, Cheng JF, Eichler EE, Olsen A, Pennacchio LA, Rokhsar DS, Richardson P, Lucas SM, Myers RM, Rubin EM. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature*. 2004;431(7006):268-74.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004;305(5683):525-8.

Shichiji M, Ito Y, Shimojima K, Nakamu H, Oguni H, Osawa M, Yamamoto T. A cryptic microdeletion including MBD5 occurring within the breakpoint of a reciprocal

translocation between chromosomes 2 and 5 in a patient with developmental delay and obesity. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(4):850-5.

Simmons AD, Püschel AW, McPherson JD, Overhauser J, Lovett M. Molecular cloning and mapping of human semaphorin F from the Cri-du-chat candidate interval. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(3):685-91.

Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet*. 2008;124(1):1-17.

Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet*. 2002;18(2):74-82.

Startek M, Szafranski P, Gambin T, Campbell IM, Hixson P, Shaw CA, Stankiewicz P, Gambin A. Genome-wide analyses of LINE-LINE-mediated nonallelic homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(4):2188-98.

Stern JM. The epilepsy of trisomy 9p. *Neurology*. 1996;47(3):821-4.

Sun Y, Grimmler M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B. Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum Mutat*. 2005;25(1):64-71.

Swanepoel D. Auditory pathology in cri-du-chat (5p-) syndrome: phenotypic evidence for auditory neuropathy. *Clin Genet*. 2007;72(4):369-73.

Tao T, Sun J, Peng Y, Wang P, Chen X, Zhao W, Li Y, Wei L, Wang W, Zheng Y, Wang Y, Zhang X, Zhu MS. Distinct functions of Trio GEF domains in axon outgrowth of cerebellar granule neurons. *J Genet Genomics*. 2019;46(2):87-96.

Tong JH, Cummins TD, Johnson BP, McKinley LA, Pickering HE, Fanning P, Stefanac NR, Newman DP, Hawi Z, Bellgrove MA. An association between a dopamine transporter gene (SLC6A3) haplotype and ADHD symptom measures in nonclinical adults. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015 Mar;168B(2):89-96.

Toral-López J, Buentello-Volante B, Balderas-Minor MM, Amezcua-Herrera C, Valdes-Miranda JM, González-Huerta LM, Gudiño M, Cuevas-Covarrubias SA, Zenteno JC. An

intellectually disabled patient with the 5q14.3q15 microdeletion syndrome associated with an apparently de novo t(2;5)(q13;q14). *Am J Med Genet A*. 2012;158A(4):942-6.

Vado Y, Errea-Dorronsoro J, Llano-Rivas I, Gorria N, Pereda A, Gener B, Garcia-Naveda L, Perez de Nanclares G. Cri-du-chat syndrome mimics Silver-Russell syndrome depending on the size of the deletion: a case report. *BMC Med Genomics*. 2018;11(1):124.

Van Buggenhout GJ, Pijkels E, Holvoet M, Schaap C, Hamel BC, Fryns JP. Cri du chat syndrome: changing phenotype in older patients. *Am J Med Genet*. 2000;90(3):203-15.

Varley H, Di S, Scherer SW, Royle NJ. Characterization of terminal deletions at 7q32 and 22q13.3 healed by de novo telomere addition. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):610-22.

Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merkx G, van Cleef B, van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, van Kessel AG. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet*. 2002;70(5):1269-76.

Vera-Carbonell A, Bafalliu JA, Guillén-Navarro E, Escalona A, Ballesta-Martínez MJ, Fuster C, Fernández A, López-Expósito I. Characterization of a de novo complex chromosomal rearrangement in a patient with cri-du-chat and trisomy 5p syndromes. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(11):2513-21.

Verrotti A, Carelli A, di Genova L, Striano P. Epilepsy and chromosome 18 abnormalities: A review. *Seizure*. 2015;32:78-83.

Vignetti P, Chessa L, Bruni L, Ferrante E, Dallapiccola B. Translocation Y/5 resulting in Cri du Chat syndrome. *Clin Genet*. 1977;12(6):319-22.

Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet*. 2010;47(5):289-97.

Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM, Kim CE, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere CM, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J,

Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Herman EI, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney JA, Brune CW, Cantor RM, Bernier R, Gilbert JR, Cuccaro ML, McMahon WM, Miller J, State MW, Wassink TH, Coon H, Levy SE, Schultz RT, Nurnberger JI, Haines JL, Sutcliffe JS, Cook EH, Minshew NJ, Buxbaum JD, Dawson G, Grant SF, Geschwind DH, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Hakonarson H. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*. 2009;459(7246):528-33.

Weber B, Schempp W, Orth U, Seidel H, Gal A. A Y/5 translocation in a 45,X male with cri du chat syndrome. *Hum Genet*. 1987;77(2):145-50.

Weckselblatt B, Rudd MK. Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. *Trends Genet*. 2015;31(10):587-99.

World Health Organization. *Growth reference data*. Geneva: WHO, 2007.

Wu Q, Niebuhr E, Yang H, Hansen L. Determination of the 'critical region' for cat-like cry of Cri-du-chat syndrome and analysis of candidate genes by quantitative PCR. *Eur J Hum Genet*. 2005;13(4):475-85.

Zanardo ÉA, Dutra RL, Piazzon FB, Dias AT, Novo-Filho GM, Nascimento AM, Montenegro MM, Damasceno JG, Madia FAR, da Costa TVMM, Melaragno MI, Kim CA, Kulikowski LD. Cytogenomic assessment of the diagnosis of 93 patients with developmental delay and multiple congenital abnormalities: The Brazilian experience. *Clinics (Sao Paulo)*. 2017;72(9):526-537.

Zhang A, Zheng C, Hou M, Lindvall C, Li KJ, Erlandsson F, Bjorkholm M, Gruber A, Blennow E, Xu D. Deletion of the telomerase reverse transcriptase gene and haploinsufficiency of telomere maintenance in cri du chat syndrome. *Am J Hum Genet*. 2003;72:940-948.

Zhang B, Willing M, Grange DK, Shinawi M, Manwaring L, Vineyard M, Kulkarni S, Cottrell CE. Multigenerational autosomal dominant inheritance of 5p chromosomal deletions. *Am J Med Genet A*. 2016 Mar;170(3):583-93.

Zhang X, Snijders A, Seagraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, Yang H, Gray J, Niebuhr E, Bolund L, Pinkel D. High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *Am J Hum Genet.* 2005;76(2):312-26.



# APÊNDICES

# APÊNDICES

Abstract dos artigos publicados durante o período da realização deste doutorado

Received: 24 August 2018 | Revised: 14 July 2019 | Accepted: 7 August 2019

DOI: 10.1002/mgg3.957

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Genetics & Genomic Medicine  WILEY

## Breakpoint delineation in 5p- patients leads to new insights about microcephaly and the typical high-pitched cry

Samar N. Chehimi<sup>1,2</sup>  | Évelin A. Zanardo<sup>1</sup>  | José R. M. Ceroni<sup>2</sup>  |  
Amom M. Nascimento<sup>1</sup>  | Fabrícia A. R. Madia<sup>1</sup>  | Alexandre T. Dias<sup>1</sup>  | Gil M. N. Filho<sup>1</sup>  |  
Marília M. Montenegro<sup>1</sup>  | Jullian Damasceno<sup>1</sup>  | Thaís V. M. M. Costa<sup>1</sup>  |  
Yanca Gasparini<sup>1</sup>  | Chong A. Kim<sup>2</sup>  | Leslie D. Kulikowski<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

### Correspondence

Leslie D. Kulikowski, Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, Cerqueira César PAMB, 2º andar, Bloco 12, sala 07—CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brazil. Email: lesliekulik@usp.br

### Funding information

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo) grants number 2016/09452-0 and FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) grants number FINEP/CT-INFRA-01/2011.

### Abstract

**Background:** Cri du chat syndrome (CdCS) is a rare syndrome caused by a partial or complete deletion of the short arm of chromosome 5 (5p-). The main clinical features include a high-pitched cry, facial asymmetry, microcephaly, round face at birth, epicanthal folds, hypotonia, delayed growth and development.

**Methods:** We studied 14 Brazilian patients with CdCS using genomic array in order to better define the 5p breakpoints and recognize copy number variations (CNVs) that contribute to clinical manifestations associated with the syndrome.

**Results:** Array confirmed terminal deletions in 13 patients and an interstitial deletion in one patient. It was also possible to map the breakpoints and associate a genomic region of 4.7 Mb to the development of head circumference and cat-like cry. We also found other CNVs concomitant to the 5p deletion including a 9p duplication, a 17q deletion, and a 22q deletion in three different patients.

**Conclusion:** With advancements of molecular cytogenomic methods in the last two decades, it was possible to evidence cryptic alterations and improve the genotype–phenotype correlation. In this work, we describe a new genomic region associated with microcephaly and cat-like cry and highlight the importance of precise delineation of 5p deletion breakpoints and detection of other CNVs in CdCS patients to improve genotype–phenotype correlation to perform a complete clinical and molecular diagnosis.

### KEYWORDS

Brazilian patients, cri du chat, cytogenomic, genomic array

## Mosaic Trisomy 12 Associated with Overgrowth Detected in Fibroblast Cell Lines

Yanca Gasparini<sup>a</sup> Marília M. Montenegro<sup>a</sup> Gil M. Novo-Filho<sup>a</sup>  
José R.M. Ceroni<sup>b</sup> Rachel S. Honjo<sup>b</sup> Évelin A. Zanardo<sup>a</sup> Alexandre T. Dias<sup>a</sup>  
Amom M. Nascimento<sup>a</sup> Thaís V.M.M. Costa<sup>a</sup> Fabrícia A. Madia<sup>a</sup>  
Samar N. Chehimi<sup>a</sup> Jullian G. Damasceno<sup>a</sup> Chong A. Kim<sup>b</sup>  
Leslie D. Kulikowski<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, and <sup>b</sup>Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

### Keywords

Cutaneous mosaicism · Cytogenetics · Fibroblasts · FISH · Genotype-phenotype correlation · Trisomy 12

### Abstract

Mosaic trisomy 12 is a rare anomaly, and only 9 cases of live births with this condition have been reported in the literature. The clinical phenotype is variable, including neuropsychomotor developmental delay, congenital heart disease, microcephaly, cutaneous spots, facial asymmetry, prominent ears, hypotonia, retinopathy, and sensorineural hearing loss. A 2-year-old female presented with neuropsychomotor developmental delay, prominent forehead, dolichocephaly, patchy skin pigmentation, and unexpected over-growth at birth. Cytogenetic analysis of her peripheral blood showed normal results, suggesting the presence of a chromosomal alteration in other tissues. Further studies using G-banding and FISH performed on fibroblasts from both hyper- and hypopigmented regions identified a 47,XX,+12/46,XX karyo-

type. To the best of our knowledge, no patients with mosaic trisomy 12 associated with overgrowth have been reported to date. Congenital overgrowth and neonatal overgrowth have been frequently linked to Pallister-Killian syndrome (PKS; OMIM 601803). This case suggests the possibility of an association of genes present in the 12p region with fetal overgrowth, considering that chromosomal duplications could lead to an increase in the production of aberrant transcripts and disturbing gene dosage effects. This case highlights the importance of cytogenetic analysis in different tissues to provide relevant information to the specific genotype/phenotype correlation.

© 2019 S. Karger AG, Basel






KARGER

© 2019 S. Karger AG, Basel

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/cgr

Yanca Gasparini  
Laboratório de Citogenômica, LIM 03  
Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo  
CEP 05403-000, São Paulo, SP (Brazil)  
E-Mail yanca.g@gmail.com

## Gene expression profile suggesting immunological dysregulation in two Brazilian Bloom's syndrome cases

Marília M. Montenegro<sup>1,2</sup>  | Caio R. Quaió<sup>2</sup> | Patricia Palmeira<sup>3</sup> | Yanca Gasparini<sup>1</sup> |  
Andréia Rangel-Santos<sup>3</sup> | Julian Damasceno<sup>1</sup> | Estela M. Novak<sup>4</sup> | Thamires M. Gimenez<sup>5</sup> |  
Guilherme L. Yamamoto<sup>2</sup> | Rachel S. Ronjo<sup>2</sup> | Gil M. Novo-Filho<sup>1,2</sup> | Samar N. Chehimi<sup>1</sup> |  
Evelin A. Zanardo<sup>1</sup> | Alexandre T. Dias<sup>1</sup> | Amom M. Nascimento<sup>1</sup> | Thais V. M. M. Costa<sup>1</sup> |  
Alberto J. da S. Duarte<sup>1</sup>  | Luiz L. Coutinho<sup>6</sup>  | Chong A. Kim<sup>2</sup>  |  
Leslie D. Kulikowski<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Pediatria Clínica, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>4</sup>Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Pesquisa Translacional em Oncohematologia, Instituto de Tratamento de Câncer Infantil (ITACI), São Paulo, SP, Brazil

<sup>6</sup>Centro de Genômica Funcional, Departamento de Zootecnia, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ-USP, Piracicaba, Brazil

### Correspondence

Marília Moreira Montenegro, Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.  
Email: mariliamontenegro@gmail.com

### Funding information

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) FINEP/CT-INFRA-PROINFRA 01/2011 and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) process 2017/08981-1)

### Abstract

**Background:** Bloom syndrome (BS) is a rare autosomal recessive chromosome instability disorder. The main clinical manifestations are growth deficiency, telangiectatic facial erythema, immunodeficiency, and increased risk to develop neoplasias at early age. Cytogenetic test for sister chromatid exchanges (SCEs) is used as a diagnostic marker for BS. In addition, most patients also present mutations in the *BLM* gene, related to defects in the DNA repair mechanism. However, the molecular mechanism behind the pathogenicity of BS is still not completely understood.

**Methods:** We describe two patients confirmed with BS by SCE and molecular analysis. Also, we performed the gene expression profile by the RNA-seq methodology in mRNA transcripts for differential gene expression analysis using as a biological condition for comparison BS versus health controls.

**Results:** We detected 216 differentially expressed genes related to immunological pathways such as positive regulation and activation of B cells, immune effector process and absence of difference of DNA repair genes expression. In addition; we also observed differentially expressed genes associated with apoptosis control, such as *BCL2L1*, *CASP7*, *CDKN1A*, *E2F2*, *ITPR*, *CD274*, *TNFAIP6*, *TNFRSF25*, *TNFRSF13C*, and *TNFRSF17*.

**Conclusion:** Our results suggest that the combination of altered expression of genes involved in signaling pathways of immune response and apoptosis control may contribute directly to the main characteristics observed in BS, such as recurrent infections, growth failure, and high risk of cancer. Transcriptome studies of other instability syndromes could allow a more accurate analysis of the relevant gene interactions associated with the destabilization of the genome. This is a first description of

the profile of differential gene expression related to immunological aspects detected in patients with BS by RNA-seq.

### KEYWORDS

*BLM* gene, Transcriptome, Bloom's syndrome, Immunology, RNA-Seq



Contents lists available at ScienceDirect

Mutat Res Gen Tox En

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gentox](http://www.elsevier.com/locate/gentox)

## The Iberian legacy into a young genetic xeroderma pigmentosum cluster in central Brazil



L.P. Castro<sup>a</sup>, M. Sahbatou<sup>b</sup>, F.S.G. Kehdy<sup>c</sup>, A.A. Farias<sup>d,e</sup>, A.A. Yurchenko<sup>f</sup>, T.A. de Souza<sup>a</sup>, R.C.A. Rosa<sup>g</sup>, C.T. Mendes-Junior<sup>h</sup>, V. Borda<sup>i</sup>, V. Munford<sup>h</sup>, É.A. Zanardo<sup>j</sup>, S.N. Chehimi<sup>l</sup>, L.D. Kulikowski<sup>k</sup>, M.M. Aquino<sup>k</sup>, T.P. Leal<sup>k</sup>, E. Tarazona-Santos<sup>k</sup>, S.C. Chaibub<sup>l</sup>, B. Gener<sup>m,n</sup>, N. Calmels<sup>o</sup>, V. Laugel<sup>o</sup>, A. Sarasin<sup>p,1</sup>, C.F.M. Menck<sup>a,1,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Fondation Jean Dausset – CEPH, Paris, France

<sup>c</sup> Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Human Genome and Stem-Cell Center, Institute of Biosciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Department of Genetics and Evolutionary Biology, Biosciences Institute, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

<sup>f</sup> Inserm U981, Gustave Roussy Cancer Campus, Université Paris Saclay, Villejuif, France

<sup>g</sup> Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>h</sup> Department of Chemistry, Forensic and Genomics Research Laboratory, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>i</sup> National Laboratory for Scientific Computation (LNCC), Petropolis, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>j</sup> Cytogenomics Laboratory, Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo (FMUSP), São Paulo, Brazil

<sup>k</sup> Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>l</sup> General Hospital of Goiânia, Goiânia, Brazil

<sup>m</sup> Osakidetza Basque Health Service, Cruces University Hospital, Department of Genetics, Bizkaia, Spain

<sup>n</sup> Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Bizkaia, Spain

<sup>o</sup> Laboratory of Medical Genetics, Institute of Medical Genetics of Alsace (IGMA), Strasbourg, France

<sup>1</sup> UMR8200 CNRS, Gustave Roussy Institute, University Paris-Saclay, Villejuif, France

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Xeroderma pigmentosum  
Genetic cluster  
Founder mutations  
*POLH*(XPV)  
DNA repair  
Ancestry

### ABSTRACT

In central Brazil, in the municipality of Faina (state of Goiás), the small and isolated village of Araras comprises a genetic cluster of xeroderma pigmentosum (XP) patients. The high level of consanguinity and the geographical isolation gave rise to a high frequency of XP patients. Recently, two founder events were identified affecting that community, with two independent mutations at the *POLH* gene, c.764 + 1 G > A (intron 6) and c.907 C > T; p.Arg303\* (exon 8). These deleterious mutations lead to the xeroderma pigmentosum variant syndrome (XP-V). Previous reports identified both mutations in other countries: the intron 6 mutation in six patients (four families) from Northern Spain (Basque Country and Cantabria) and the exon 8 mutation in two patients from different families in Europe, one of them from Kosovo. In order to investigate the ancestry of the XP patients and the age for these mutations at Araras, we generated genotyping information for 22 XP-V patients from Brazil (16), Spain (6) and Kosovo (1). The local genomic ancestry and the shared haplotype segments among the patients showed that the intron 6 mutation at Araras is associated with an Iberian genetic legacy. All patients from Goiás, homozygotes for intron 6 mutation, share with the Spanish patients identical-by-descent (IBD) genomic segments comprising the mutation. The entrance date for the Iberian haplotype at the village was calculated to be approximately 200 years old. This result is in agreement with the historical arrival of Iberian individuals at the Goiás state (BR). Patients from Goiás and the three families from Spain share 1.8 cM (family 14), 1.7 cM (family 15), and a more significant segment of 4.7 cM within family 13. On the other hand, the patients carrying the exon 8 mutation do not share any specific genetic segment, indicating an old genetic distance between them or even no common ancestry.

\* Corresponding author at: Department of Microbiology, ICB, USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Ed. Biomédicas 2, São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

E-mail address: [cfmmenck@usp.br](mailto:cfmmenck@usp.br) (C.F.M. Menck).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503164>

Received 28 December 2019; Received in revised form 22 February 2020; Accepted 25 February 2020

Available online 29 February 2020

1383-5718/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



## Fetal gastroschisis: Maternal and fetal methylation profile

Amanda Brasil de Freitas<sup>1,2</sup> | Rossana Pulcineli Vieira Francisco<sup>1</sup> |  
Sandra Frankfurt Centofanti<sup>1</sup> | Jullian Gabriel Damasceno<sup>2</sup> |  
Samar Nasser Chehimi<sup>2</sup> | Gilmar de Souza Osmundo Junior<sup>1</sup> |  
Leslie Domenici Kulikowski<sup>2</sup> | Maria de Lourdes Brizot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Cytogenomic Laboratory, Department of Pathology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

### Correspondence

Maria de Lourdes Brizot, Departamento de Obstetria e Ginecologia, Hospital das Clinicas Instituto Central, 10<sup>o</sup> andar, Conjunto 10037 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255 Sao Paulo, SP CEP 05403 000, Brazil.  
Email: mlbrizot@uol.com.br

### Abstract

**Objective:** The purpose of this study was to describe the genomic deoxyribonucleic acid (DNA) methylation profile in fetuses with gastroschisis, determine whether the profile was inherited, and investigate any possible correlations with maternal risk factors.

**Method:** Genome-wide DNA methylation analysis of 96 blood samples was performed using the Illumina Human Methylation 850K BeadChip. The blood samples were collected as follows: 32 from the umbilical cord of fetuses with gastroschisis, 32 from their respective mothers, 16 from the umbilical cord of fetuses without malformation, and 16 from their respective mothers.

**Results:** The differential DNA methylation analysis showed a significant difference between the groups. The enrichment analysis resulted in 12 sites related to T-cell activation ( $p = 0.0128$ ). The sites with different methylation status contained 10 genes, three of which were related to the beta-2-microglobulin gene. The methylation profile observed in the fetuses with gastroschisis was not inherited from the mothers. In addition, there was no association between maternal urinary tract infection, smoking, and alcohol use and different methylated sites.

**Conclusion:** We established the methylation profile of gastroschisis fetuses, which differs from that of normal fetuses. The profile was not inherited and did not correlate with maternal risk factors.

### Key Points

#### What is known about this topic?

- The etiology and pathogenesis of fetal gastroschisis and its association with environmental factors are not clearly understood, and attempts to identify a biological marker have not been successful. No previous investigation into the methylation patterns in pregnant women carrying fetuses with gastroschisis has been published

#### What does this study add?

- This study provides the methylation pattern of fetuses with gastroschisis



## Application of Whole-Exome Sequencing in Detecting Copy Number Variants in Patients with Developmental Delay and/or Multiple Congenital Malformations



Évelin A. Zanardo,\* Fabíola P. Monteiro,<sup>†</sup> Samar N. Chehimi,\* Yanca G. Oliveira,\* Alexandre T. Dias,\* Larissa A. Costa,<sup>†</sup> Luiza L. Ramos,<sup>†</sup> Gil M. Novo-Filho,\* Marília M. Montenegro,\* Amom M. Nascimento,\* João P. Kitajima,<sup>†</sup> Fernando Kok,<sup>†‡</sup> and Leslie D. Kulikowski\*

From the Laboratório de Citogenômica,\* Departamento de Patologia, and the Departamento de Neurologia,<sup>†</sup> Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; and the Mendelics Análise Genômica,<sup>‡</sup> São Paulo, Brazil

Accepted for publication  
May 7, 2020.

Address correspondence to  
Évelin Aline Zanardo, Ph.D., or  
Leslie Domenici Kulikowski,  
Ph.D., Department of Pathol-  
ogy, Laboratório de Citogenô-  
mica, LIM 03, Faculdade de  
Medicina, Universidade de São  
Paulo, Av Dr Enéas de Car-  
valho Aguiar, 155, 2nd Floor,  
Block 12, São Paulo, SP 05403-  
000, Brazil. E-mail:  
evelinzanardo@usp.br or  
lesliekulik@usp.br.

Overcoming challenges for the unambiguous detection of copy number variations is essential to broaden our understanding of the role of genomic variants in the clinical phenotype. With the improvement of software and databases, whole-exome sequencing quickly can become an excellent strategy in the routine diagnosis of patients with a developmental delay and/or multiple congenital malformations. However, even after a detailed analysis of pathogenic single-nucleotide variants and indels in known disease genes, using whole-exome sequencing, some patients with suspected syndromic conditions are left without a conclusive diagnosis. These negative results could be the result of different factors including nongenetic etiologies, lack of knowledge about the genes that cause different disease phenotypes, or, in some cases, a deletion or duplication of genomic information not routinely detectable by whole-exome sequencing variant calling. Although copy number variant detection is possible using whole-exome sequencing data, such analysis presents significant challenges and cannot yet be used to replace chromosomal arrays for identification of deletions or duplications. (*J Mol Diagn* 2020, 22: 1041–1049; <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.05.007>)

Supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
Nível Superior—Brasil (finance code 001).  
Disclosure: None declared.



Contents lists available at ScienceDirect

Meta Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mgene](http://www.elsevier.com/locate/mgene)



## Identifying NAHR mechanism between two distinct *Alu* elements through breakpoint junction mapping by NGS



Gil M. Novo-Filho<sup>a</sup>, Gleyson F.S. Carvalho<sup>a</sup>, Amom M. Nascimento<sup>a</sup>, Marilia M. Montenegro<sup>a</sup>, Jullian G. Damasceno<sup>a</sup>, Évelin A. Zanardo<sup>a</sup>, Samar N. Chehimi<sup>a</sup>, Yanca G. Oliveira<sup>a</sup>, Alexandre T. Dias<sup>a</sup>, Chong A. Kim<sup>b</sup>, Leslie D. Kulikowski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Citogenômica, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 - 2<sup>o</sup> andar - Bloco 12, Cerqueira César, São Paulo, SP 01246-100, Brazil

<sup>b</sup> Unidade de Genética, Departamento de Pediatria, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647 - 7<sup>o</sup> andar, Cerqueira César, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
NAHR  
Alu elements  
NGS

### ABSTRACT

Genomic rearrangements encompass deletions, duplications, inversions, insertions and translocations and may be the cause of several genetic diseases. One of the most frequent mechanisms that generate these rearrangements is the Non-Allelic Homologous Recombination (NAHR). They are caused by a misalignment between regions of high level of similarity, like Low Copy Repeats (LCRs) and *Alu* sequences. We aimed to sequence the breakpoint of a patient with a single deletion on chromosome 22q13.2 in order to understand the genomic structure of the region involved as well as elucidate the mechanism behind this rearrangement. Investigating breakpoints are of the utmost importance in the understanding the influence of the genomic architecture in clinical assays. We flanked the breakpoint detected by array and then we captured the regions using Illumina Nextera Rapid Capture Custom to sequence with Illumina MiSeq. We found a chimeric read on Chr22:41,026,090, setting a 624,688 bp deletion on Chr22:41,026,112-41,650,780 (hg19). This deletion merges the intronic region of *MKLI* and *RANGAP1* genes, on two different *Alu* sequences (*AluX* and *AluY*, respectively). The sequence of the breakpoint reveals that *Alu* elements are an important characteristic of the human genome on generating rearrangements.

\* Corresponding author at: Laboratory of Cytogenomics and Molecular Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine of the University of São Paulo, Brazil.

E-mail address: [lesliekulik@usp.br](mailto:lesliekulik@usp.br) (L.D. Kulikowski).

<https://doi.org/10.1016/j.mgene.2020.100702>

Received 14 January 2020; Received in revised form 24 March 2020; Accepted 26 March 2020  
Available online 27 March 2020

2214-5400/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.