

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CAROLINA GAMA NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS EQUILIBRADOS E REARRANJOS CROMOSSÔMICOS COMPLEXOS EM INDIVÍDUOS COM ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS

CAMPINAS

2023

CAROLINA GAMA NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO DE REARRANJOS CROMOSSÔMICOS EQUILIBRADOS E REARRANJOS CROMOSSÔMICOS COMPLEXOS EM INDIVÍDUOS COM ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, área de concentração Genética Médica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Társis Antônio Paiva Vieira

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CAROLINA GAMA NASCIMENTO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. TÁRSIS ANTÔNIO PAIVA VIEIRA.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

N17c	Nascimento, Carolina Gama, 1999- Caracterização de rearranjos cromossômicos equilibrados e rearranjos cromossômicos complexos em indivíduos com alterações fenotípicas / Carolina Gama Nascimento. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.
	Orientador: Társis Antônio Paiva Vieira. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
	 Aberrações cromossômicas. Fenótipo. Anormalidades congênitas. Deficiência intelectual. Hibridização genômica comparativa. Vieira, Társis Antônio Paiva, II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Characterization of balanced chromosomal rearrangements and complex chromosomal rearrangements in individuals with phenotypic alterations Palavras-chave em inglês: Chromosome aberrations Phenotype Congenital abnormalities Intellectual disability Comparative genomic hybridization Área de concentração: Genética Médica Titulação: Mestra em Ciências Banca examinadora: Társis Antônio Paiva Vieira [Orientador] Carlos Eduardo Steiner Débora Gusmão Melo Data de defesa: 30-06-2023 Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-8342-5498

⁻ Currículo Lattes do autor: https://lattes.cnpq.br/1185063468972439

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

CAROLINA GAMA NASCIMENTO

ORIENTADOR: PROF. DR. TÁRSIS ANTÔNIO PAIVA VIEIRA

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. TÁRSIS ANTÔNIO PAIVA VIEIRA

2. PROF. DR. CARLOS EDUARDO STEINER

3. PROFA. DRA. DÉBORA GUSMÃO MELO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 30/06/2023

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que é tudo em minha vida e guiou meus passos até aqui. A minha família e meu noivo, por todo amor, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Nº do processo: 131248/2021-9) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Társis Paiva Vieira, pela oportunidade em realizar a pesquisa no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM/Unicamp. Agradeço também pela confiança em mim ao decorrer do desenvolvimento deste trabalho e a generosidade em passar seus ensinamentos.

Agradeço a todas as funcionárias do laboratório pela receptividade, paciência, auxílio na realização de todas as técnicas e pela transmissão de conhecimento, que foram de extrema importância para meu desenvolvimento profissional.

Agradeço aos meus colegas da Unicamp pela troca de experiências durante esse período e por todo incentivo e apoio.

E por fim, agradeço a todos os participantes e seus familiares, que aceitaram participar e colaboraram com todos os dados necessários e amostras, para a realização desta pesquisa.

"É com o coração que se vê corretamente; o essencial é invisível aos olhos." (Antoine de Saint-Exupéry – O pequeno príncipe)

RESUMO

Os rearranjos cromossômicos equilibrados (RCEs) são responsáveis pela mudança na posição e/ou na orientação do segmento cromossômico em um ou mais cromossomos, podendo ser translocações, inversões e inserções. Os rearranjos cromossômicos complexos (RCCs) envolvem mais de dois cromossomos e mais de dois pontos de quebra, com trocas de segmentos cromossômicos entre si. Esses rearranjos podem ser herdados ou de novo. Alterações fenotípicas podem ser encontradas em 5 a 10% dos indivíduos com RCEs e em 30% daqueles com RCCs. os indivíduos podem apresentar desequilíbrios genômicos Nesses casos submicroscópicos associados aos pontos de quebra, em outras regiões do genoma ou em ambas as regiões. O objetivo principal deste trabalho foi investigar desequilíbrios genômicos em indivíduos portadores de RCEs ou RCCs com alterações fenotípicas. Foi realizada a revisão dos resultados de cariótipo do Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp em um período de 30 anos. Foram identificados 151 indivíduos com RCEs ou RCCs, sendo 147 com RCEs: 109 translocações, 27 inversões e 11 inserções; e quatro RCCs. Desses indivíduos, 109/151 (72%) apresentaram fenótipo normal e 42/151 (28%) fenótipo anormal. Em relação à origem parental, em 62/151 (41%) indivíduos o rearranjo era herdado, em 16/151 (11%) de novo, e em 73/151 (48%) a investigação parental não foi completada. A análise cromossômica por microarray (CMA – Chromosomal Microarray Analysis) foi realizada para 14 indivíduos, utilizando o chip CytoScan 750K (Affymetrix®). A análise dos resultados foi realizada por meio do programa Chromosome Analysis Suite (Affymetrix®) e a classificação das variantes foi realizada de acordo com as recomendações do Colégio Americano de Genética Médica (ACMG - American College of Medical Genetics). A CMA revelou que 7/14 (50%) dos casos eram realmente equilibrados e os outros 7/14 (50%) apresentaram deseguilíbrios genômicos, sendo 5/14 (36%) classificados como patogênicos ou provavelmente patogênicos e 2/14 (14%) classificados como variantes de significado incerto. A conclusão diagnóstica foi obtida para 4/14 (29%) indivíduos. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que aponta que cerca de 30 a 50% dos RCEs em indivíduos com alterações fenotípicas são de fato desequilibrados. Além disso, a revisão da literatura, comparando os casos herdados e de novo, mostrou que a maioria dos

desequilíbrios presentes nos casos herdados são encontrados em outras regiões genômicas, não associadas aos pontos de quebra do RCE. Esses resultados sugerem que desequilíbrios associados aos pontos de quebra entre os casos herdados não são uma causa comum do fenótipo nesses indivíduos.

Palavras-chave: aberrações cromossômicas; fenótipo; anormalidades congênitas; deficiência intelectual; hibridização genômica comparativa.

ABSTRACT

Balanced chromosomal rearrangements (BCRs) are changes in the position and/or orientation of chromosomal segments on one or more chromosomes, including translocations, inversions, and insertions. Complex chromosomal rearrangements (CCRs) involve more than two chromosomes and more than two breakpoints, with exchanges of chromosomal segments between them. These rearrangements can be inherited or de novo. Phenotypic alterations can be found in 5 to 10% of the individuals with RCEs and in 30% of those with RCCs. In these cases, individuals may have submicroscopic genomic imbalances associated to the breakpoints, on other genomic regions, or on both regions. The main objective of this study was to investigate genomic imbalances in individuals with BCRs or CCRs with phenotypic alterations. We reviewed the karyotype results from the Laboratory of Human Cytogenetics and Cytogenomics of the School of Medicine of the Unicamp, over a 30-year period. We identified 151 individuals with BCRs or CCRs, including 147 BRCs: 109 translocations, 27 inversions, 11 insertions; and four CCRs. Among these individuals, 109/151 (72%) had a normal phenotype, while 42/151 (28%) had an abnormal phenotype. Regarding parental origin, the rearrangement was inherited in 62/151 (41%) individuals, de novo in 16/151 (11%), and the parental investigation was not completed in 73/151 (48%) cases. Chromosomal Microarray Analysis (CMA) was performed on 14 individuals using the CytoScan 750K Array (Affymetrix®). The analysis was conducted using the Chromosome Analysis Suite (Affymetrix®), and variant classification was performed according to the recommendations of the American College of Medical Genetics (ACMG). CMA revealed that 7/14 (50%) cases were indeed balanced, while the other 7/14 (50%) had genomic imbalances, with 5/14 (36%) classified as pathogenic or probably pathogenic and 2/14 (14%) classified as variants of uncertain significance. A diagnostic conclusion was obtained for 4/14 (29%) individuals. Our results are consistent with the literature, which points that approximately 30 to 50% of patients with BCRs and phenotypic alterations are indeed imbalanced. Furthermore, the literature review comparing inherited and de novo cases revealed that most imbalances found in inherited cases are located on other genomic regions, not associated with the BCR breakpoints. These results suggest that imbalances associated with the breakpoint regions in inherited cases are not a common cause of the phenotype in these individuals.

Keywords: chromosome aberrations; phenotype; congenital abnormalities; intellectual disability; comparative genomic hybridization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2. Classificação de rearranjos cromossômicos complexos (RCCs)......22 Figura 3. Rearranjos cromossômicos originados a partir do mecanismo de junção das extremidades não homólogas (Non-Homologous End Joining – NHEJ)24 Figura 4. Mecanismos de formação dos RCCs: Chromothripsis, chromoanasynthesis Figura 5. Imagem demonstrativa da etapa de diluição e transferência de alíguotas Figura 6. Categorias de classificação de variantes de acordo com o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG)41 Figura 7. Representação gráfica dos tipos de rearranjos cromossômicos estruturais equilibrados observados em 151 indivíduos durante a análise retrospectiva de 30 anos, realizada no Laboratório de Citogenética e Citogenômica da Unicamp/FCM..43 Figura 8. Representação gráfica dos diferentes fenótipos observados na amostra de indivíduos da análise retrospectiva, de acordo com os tipos de rearranjos cromossômicos estruturais (RCEs)44 Figura 9. Representações gráficas da diferença entre o número de indivíduos com desequilíbrios genômicos......51

Figura 10. Cariótipo parcial do indivíduo 1 mostrando inversão paracêntrica do cromossomo 11 [46,XY,inv(11)(q21q23)]......51

Figura 14. Cariótipo parcial do indivíduo 3 com RCC entre os cromossomos 1, 2, 3 e20 $[46,XX,der(1)(?::1p22\rightarrow 1qter),der(2)(2pter\rightarrow 2q35)]$

Figura 15. Gráficos de Log2Ratio obtidos por CMA, dos cromossomos 1, 2, 3 e 2056

Figura 16. Cariótipo parcial do indivíduo 4 com RCC envolvendo os cromossomos 1, 8, 13, 18 e 21 [46,XX,t(1;8;13)(p31;p21;q32),t(13;18;21) (q14;q21.3;q22)]......57

Figura 18. Cariótipos parciais do indivíduo 5 e do pai do indivíduo 5 mostrando uma translocação entre os cromossomos 3 e 16 [46,XX,t(3;16)(q23;p12)]......59

Figura 19. Gráficos de Log2Ratio obtidos por CMA, dos cromossomos 3, 16 e 22.60

Figura 20. Cariótipos parciais do indivíduo 14 e da mãe do indivíduo 14, demonstrando a inserção equilibrada entre os cromossomos 9 e 15 [ins(9;15)(q33;q21.1q22.31)].....61

Figura 21. Imagem retirada do Integrative Genome Viewer (IGV) mostrando uma deleção de 88 pb no exon 3 do gene *MECP2* [chrX(153296091_153296179)—GRCh37)......61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de estudos que realizaram CMA em pacientes com RCEs e alterações fenotípicas.
 28

Tabela 3. Características fenotípicas, resultados de cariótipos, origem parental eresultados da CMA dos sete indivíduos sem desequilíbrios genômicos.49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMG: do inglês, American College of Medical Genetics and Genomics ADARB1: do inglês, Adenosine deaminase RNA specific B1 Add: Adição **BE:** do inglês, *Buffer Elution* CMA: do inglês, Chromosomal Microarray Analysis CNV: do inglês, Copy Number Variation DCUN1D5: do inglês, Defective in cullin neddylation 1 domain containing 5 Del: Delecão Der: Derivado DGs: Desequilíbrios genômicos DGV: do inglês, Database of Genomic Variants DIAPH3: do inglês, Diaphanous related formin 3 DLG1: do inglês, Discs large MAGUK scaffold protein 1 DNA: do inglês, Deoxyribonucleic acid DSB: do inglês, Double-Strand Breaks **DUP:** Duplicação EDTA: Etilenediaminotetracetato dissódico 2H2O ETV6: do inglês, ETS variant transcription factor 6 FCM: Faculdade de Ciências Médicas FoSTeS: do inglês, Fork Stalling and Template Switching GNAS: do inglês, GNAS complex locus GRIA4: do inglês, Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4 Ins: Inserção Inv: Inversão Kb: Kilobase KCI: Cloreto de potássio LCRs: do inglês, Low Copy Repeats LOH: do inglês, Loss of Heterozygosity MAPD: do inglês, Median Absolute Pairwise Difference Mat: Materno Mb: Megabase

MECP2: do inglês, Methyl-CpG binding protein 2 **MMBIR:** do inglês, *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication* **MMEJ:** do inglês, Microhomology-Mediated End-Joining **NAHR:** do inglês, Non-Allelic Homologous Recombination **NBEA:** do inglês, *Neurobeachin* NC: Não concluída NCBI: do inglês, National Center for Biotechnology Information NHEJ: do inglês, Non-Homologous End Joining NI: Não investigada OMIM: do inglês, Online Mendelian Inheritance in Man **ORG:** Outras regiões genômicas PAK2: do inglês, P21 (RAC1) activated kinase 2 Pat: Paterno PCR: Reação em cadeia da polimerase **PQ:** Pontos de quebra PUDP: do inglês, Pseudouridine 5'-phosphatase RCAE: Rearranjo Cromossômico Aparentemente Equilibrado RCC: Rearranjo Cromossômico Complexo RCE: Rearranjo Cromossômico Equilibrado **ROBO2:** do inglês, Roundabout guidance receptor 2 **SNP:** do inglês, *Single Nucleotide Polimorphism* **SNPQC:** Single Nucleotide Polymorphism Quality Control STS: do inglês, Steroid sulfatase SUMO1: do inglês, Small ubiquitin like modifier 1 T: Translocação **TADs:** do inglês, *Topologically Associated Domains* TBX1: do inglês, T-box transcription factor 1 TE: Tris-EDTA TRPC6: do inglês, Transient receptor potential cation channel subfamily C member 6 TRAPPC10: do inglês, Trafficking protein particle complex subunit 10 **UCSC:** do inglês, University of California Santa Cruz **UNICAMP:** Universidade Estadual de Campinas VCX: do inglês, Variable charge X-linked VUS: do inglês, Variant of Uncertain Significance

WavinessSD: do inglês, Waviness Standard DeviationYAP1: do inglês, Yes1-associated transcriptional regulator

SUMÁRIO

1.	Introdução	.19						
1.1.	Rearranjos cromossômicos estruturais19							
1.2.	Rearranjos cromossômicos desequilibrados19							
1.3.	Rearranjos cromossômicos equilibrados19							
1.4.	Rearranjos cromossômicos complexos21							
1.4.	Mecanismos de formação dos rearranjos cromossômicos estruturais	.22						
1.5. com	Rearranjos cromossômicos equilibrados e rearranjos cromossômi plexos em indivíduos com alterações fenotípicas	cos 26						
2.	Objetivos	.31						
2.1.	Objetivo geral	.31						
2.2.	Objetivos específicos	.31						
3.	Casuística e métodos	.32						
3.1.	Casuística	.32						
3.1.1	. Critérios de inclusão e exclusão	.32						
3.2.	Métodos	.32						
3.2.1	. Estudo retrospectivo	.32						
3.2.2	2. Coleta das amostras	.33						
3.2.3	B. Extração de DNA genômico	.33						
3.2.4	Análise cromossômica por <i>microarray</i> (CMA)	.35						
3.2.5	5. Análise dos resultados da CMA	.39						
3.2.6	6. Revisão da Literatura	.42						
4.	Resultados e discussão	.42						
4.1.	Análise retrospectiva de resultados de cariótipo	.42						
4.2.	Resultados da CMA em indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas	.44						
4.3.	Revisão da literatura	.63						
5.	Conclusões	.70						
6.	Referências	.71						
7.	Anexos	.84						
7.1.	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP	.84						
7.2.	Termo de Consentimento Livre Esclarecido	.95						

1. Introdução

1.1. Rearranjos cromossômicos estruturais

Os rearranjos cromossômicos estruturais são grandes alterações no genoma que podem envolver milhões de pares de bases. Eles ocorrem como resultado de uma reconstituição anormal de cromossomos que sofreram quebras no DNA. Essas quebras são frequentemente causadas pelas características estruturais do genoma, que possuem uma suscetibilidade específica para gerar rearranjos (1). Cerca de 1 em cada 375 neonatos apresenta rearranjos cromossômicos estruturais. Esses rearranjos são classificados como equilibrados, quando a quantidade de material cromossômico permanece inalterada, mas rearranjada, e como desequilibrados quando há alteração na quantidade de material genético (2).

1.2. Rearranjos cromossômicos desequilibrados

Os rearranjos cromossômicos desequilibrados se dividem em deleções, duplicações, isocromossomos e cromossomos em anel. Esses rearranjos resultam na perda ou ganho de material genético, levando a monossomias ou trissomias parciais. Portadores de rearranjos desequilibrados, independentemente se apresentam uma alteração *de novo* ou herdada, quase sempre apresentam alterações fenotípicas (3). No entanto, as características fenotípicas associadas às duplicações são geralmente menos graves do que aquelas associadas às deleções. Isso ocorre porque a perda de material genético, em geral, tem maiores consequências do que o ganho, e as características clínicas variam dependendo do tamanho e conteúdo genético afetado (4).

1.3. Rearranjos cromossômicos equilibrados

Os rearranjos cromossômicos equilibrados (RCEs) são identificados principalmente pela análise do cariótipo com bandamento G. Eles configuram a mudança na posição e (ou) na orientação do segmento cromossômico (Figura 1) (5). Os RCEs podem envolver um ou mais cromossomos e podem ser transmitidos entre as gerações de uma família, onde dificilmente são detectados. Entretanto, possuem maiores riscos de prole com rearranjos cromossômicos desequilibrados e abortos espontâneos. Em alguns casos, também podem ser *de novo,* representando um caso esporádico na família (4).

Os RCEs podem ser dos seguintes tipos: translocações recíprocas (Figura 1A), sendo o tipo de rearranjo equilibrado mais encontrado, com uma frequência de 1/560 nascidos vivos (6). Sua formação ocorre quando dois cromossomos não homólogos sofrem quebras, gerando segmentos que são translocados entre si. As inversões (Figura 1B) apresentam uma incidência de 1/1.000 nascidos vivos (6) e sua formação ocorre a partir de duas quebras cromossômicas em um cromossomo, gerando um segmento que é inserido em posição invertida no mesmo cromossomo. Elas podem ser paracêntricas, quando não incluem o centrômero, com duas quebras em um mesmo braço cromossômico, ou pericêntricas, quando incluem o centrômero, com uma quebra em cada braço cromossômico. Estudos revelaram que as inversões são encontradas em pais de portadores com uma frequência de 85 a 90% dos casos, mostrando que a grande maioria dos casos de inversões é herdada (7). Por fim, as inserções (Figura 1C) possuem uma incidência de 1:3.380 a 1:5.200 nascidos vivos (8) e são formadas quando um cromossomo sofre duas quebras cromossômicas, gerando um segmento que é inserido em outro cromossomo não homólogo.



Figura 1. Representação de rearranjos cromossômicos equilibrados. **A**: Uma translocação recíproca equilibrada envolvendo os braços curtos dos cromossomos 1 e 9 [t(1;9)(p32.3;p21)]. **B**: Uma inversão pericêntrica do cromossomo 9 [inv(9)(p11q13)] considerada como benigna, com pontos de quebra em ambos os braços cromossômicos assimétricos em relação ao centrômero, alterando a razão entre os braços curto e longo do cromossomo invertido. **C**: Uma inserção, onde um segmento do braço curto do cromossomo 11 foi inserido na região proximal do braço longo do cromossomo 5, formando uma inserção intercromossômica [ins(5;11)(q13.1;p15.3p13)]. **Adaptado de**: Os princípios da citogenética clínica, 4^a edição, Kaiser-Rogers e Rao, 2013. (151,160 e 165) (4)

1.4. Rearranjos cromossômicos complexos

Alguns rearranjos cromossômicos estruturais podem envolver mais de dois cromossomos e mais de dois pontos de quebra, com trocas de segmentos cromossômicos entre si, e são chamados de rearranjos cromossômicos complexos (RCCs) (9). A grande maioria dos RCCs são a combinação entre translocações e são considerados extremamente raros (10). No entanto, com o uso de novas tecnologias, tornou-se evidente que esses rearranjos são mais comuns do que se pensava e têm sido associados a distúrbios do desenvolvimento e anomalias congênitas múltiplas (11). Eles podem ser *de novo*, em 70 a 75% dos casos, ou herdados (9). Entretanto, os portadores de RCCs apresentam um maior risco de gerar prole com rearranjos cromossômicos desequilibrados e têm um alto risco de abortos espontâneos devido à segregação dos cromossomos durante a meiose, o que dificilmente gera gametas viáveis (10).

Existem três principais tipos de RCCs: o *three-way* (Figura 2A), que envolve a quebra de três cromossomos e a formação de três cromossomos derivados a partir da translocação de seus segmentos; *double two-way* (Figura 2B) em que ocorrem duas translocações recíprocas simples, independentes e simultâneas; e os RCCs excepcionais (Figura 2C) que envolvem mais de seis pontos de quebra e podem envolver quatro ou cinco cromossomos, geralmente incluindo rearranjos estruturais equilibrados (translocação, inversão, inserção) e desequilibrados (duplicação e deleção), onde um cromossomo derivado pode conter segmentos cromossômicos de mais de um cromossomo não homólogo (9).



Figura 2. Classificação de rearranjos cromossômicos complexos (RCCs). **A:** RCC *three-way*, em que ocorrem quebras em três cromossomos e seus segmentos são translocados, formando três cromossomos derivados [der(A), der(B) e der(C)]; **B:** RCC *double two-way*, em que ocorrem duas translocações simples independentes e simultâneas; **C:** RCC excepcional, em que há mais de seis pontos de quebra, onde um cromossomo derivado pode conter segmentos cromossômicos de mais de um cromossomo não homólogo . **Adaptado de:** Pellestor (2019), (12).

1.4. Mecanismos de formação dos rearranjos cromossômicos estruturais

Os rearranjos cromossômicos possuem diferentes mecanismos de formação: a recombinação homóloga não alélica (*Non-Allelic Homologous Recombination* – NAHR) que gera rearranjos cromossômicos recorrentes quanto aos pontos de quebra. Assim, o conteúdo genômico e tamanhos são semelhantes mesmo entre indivíduos não aparentados (13,14). Esse

mecanismo é mediado por repetições com baixo número de cópias (*Low Copy Repeats* – LCRs), que possuem entre 95% e 97% de similaridade entre si (15). Devido a essa similaridade, cópias não alélicas de LCRs podem ser alinhadas de forma desigual durante a divisão celular e, assim, resultar em duplicação e (ou) deleção, quando as LCRs estão localizadas no mesmo cromossomo e na mesma orientação; em inversões, quando em orientações opostas; e em translocações, quando as LCRs estão em cromossomos não homólogos (16).

Além do NAHR, que gera rearranjos cromossômicos recorrentes, há outros mecanismos responsáveis por rearranjos não recorrentes, que apresentam diferentes pontos de quebra, conteúdos genômicos e tamanhos em indivíduos não aparentados. Entretanto, alguns deles podem compartilhar regiões cromossômicas de sobreposição, onde abrigam loci associados a distúrbios genômicos específicos (13,14). Entre esses mecanismos, se inclui a junção das extremidades não homólogas (Non-Homologous End Joining -NHEJ), responsável principalmente por gerar rearranjos cromossômicos equilibrados, como as translocações recíprocas (Figura 3). Esse mecanismo repara as quebras de fita dupla do DNA (Double-Strand Breaks – DSB) através da baixa similaridade. Essas quebras podem ser ocasionadas por motivos fisiológicos e (ou) patológicos (17). O processo de reparo ocorre em quatro etapas: detecção da DSB, ponte entre as extremidades quebradas de DNA, adição ou remoção de nucleotídeos para aumentar a homologia entre as regiões e a ligação (18). Outro mecanismo é o de junção das extremidades mediada por microhomologia (*Microhomology-Mediated End-Joining* – MMEJ) também baseado em DSBs, mas que conta com microhomologia entre as extremidades para a realização do reparo (19).



Figura 3. Rearranjos cromossômicos originados a partir do mecanismo de junção das extremidades não homólogas (*Non-Homologous End Joining – NHEJ*). **A:** A mutação espontânea ocorre aleatoriamente em uma posição genômica e resulta em quebras de fita dupla (DSBs). **B:** Os DSBs quando não são reparados, resultam em cromossomos mais curtos e segmentos acêntricos que podem se perder. **C:** Se dois DSBs ocorrem simultaneamente em dois cromossomos não homólogos, o mecanismo NHEJ pode gerar translocações recíprocas. **Adaptado de:** Mehrabi e colaboradores (2017), (20).

Outros mecanismos incluem aqueles originados por estresse de replicação do DNA. O mecanismo de bloqueio da forquilha de replicação com mudança de fita molde de DNA (*Fork Stalling and Template Switching* – FoSTeS) ocorre durante a replicação do DNA, onde a forquilha de replicação é interrompida, a fita atrasada se separa do molde original e invade outras forquilhas de replicação ou retorna à original, reiniciando a síntese de DNA. Se ocorrer em outro cromossomo não homólogo, resulta em translocação, enquanto se a fita atrasada invadir outra forquilha de replicação no mesmo cromossomo, avançando *downstream* ou *upstream*, pode causar deleção, duplicação ou inversão (13,21). Além deste, há o mecanismo de replicação induzida por quebra mediada por microhomologia (*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication* – MMBIR), no qual a forquilha de replicação é rompida e uma DSB de extremidade única é formada. A remoção da

extremidade 5' produz uma saliência de fita simples 3', que pode invadir outras regiões genômicas com microhomologia. Uma nova forquilha de replicação é estabelecida nesta nova região e a síntese de DNA é reiniciada, podendo ser repetida em outras regiões do genoma (22).

Alguns desses mecanismos podem ocorrer mais de uma vez em um mesmo *locus* em um cromossomo, ou em mais de um cromossomo, e esse processo é chamado de *chromoanagenesis*, um termo utilizado para representar os mecanismos de formação dos RCCs. Esses mecanismos podem ser *chromothripsis*, *chromoanasynthesis* e *chromoplexy* (23). A *chromothripsis* envolve a quebra de um único cromossomo, total ou parcialmente (Figura 4A). Essas quebras ocorrem por múltiplos DSBs agrupados que dividem o cromossomo em fragmentos menores, que são então organizados em orientações e posições diferentes, utilizando os mecanismos NHEJ e MMEJ (12,24-28).

A chromoanasynthesis se caracteriza por reconstituição cromossômica, que envolve apenas um cromossomo ou *locus* específico. Durante esse processo, o cromossomo envolvido passa pelos mecanismos de FosTeS e MMBIR, resultando na replicação do segmento cromossômico envolvido e na formação de um novo cromossomo rearranjado. Esse mecanismo é o principal responsável pela formação de múltiplas duplicações e (ou) triplicações em um mesmo *locus*. Já a *chromoplexy* ocorre a partir de DSBs em mais de dois cromossomos não homólogos, reconstituindo os segmentos gerados em diferentes orientações e posições, resultando em menos pontos de quebra em um mesmo cromossomo. Os mecanismos de NHEJ e MMEJ são responsáveis por essas reconstituições (12,28).



Figura 4. A: *Chromothripsis*: um cromossomo passa por múltiplas DSBs e os segmentos cromossômicos são reconstituídos através dos mecanismos de NHEJ e MMEJ de maneira aleatória e desorganizada, podendo ocasionar deleção de segmentos cromossômicos. **B:** *Chromoanasynthesis*: apenas um braço ou um *locus* específico de um cromossomo sofre ressíntese de segmentos de DNA em um processo envolvendo os mecanismos FoSTeS ou MMBIR, formando um cromossomo derivado, que pode apresentar inversões, deleções e principalmente duplicações e triplicações. **C:** *Chromoplexy*: os cromossomos que são envolvidos passam por DSBs que são reconstituídos através dos mecanismos de NHEJ e MMEJ, gerando translocações e RCCs. **Adaptado de:** Burssed e colaboradores (2022), (22).

1.5. Rearranjos cromossômicos equilibrados e rearranjos cromossômicos complexos em indivíduos com alterações fenotípicas

Os RCEs ocorrem com uma frequência de 0,52 a 1,54% na população geral (29,30), sendo que na maioria dos casos eles não estão associados a alterações fenotípicas. Entretanto, esses rearranjos podem ocasionar redução da fertilidade, onde cerca de 3 a 6% de um dos membros de casais com histórico de abortos espontâneos de repetição, é portador de um rearranjo equilibrado (31). Além disso, os portadores possuem uma maior probabilidade de gerar prole com alterações fenotípicas devido a um rearranjo cromossômico desequilibrado. Estima-se que 90 a 95% dos portadores de RCEs apresentam fenótipo normal (32). Já os RCCs são extremamente raros e cerca de 70% de seus portadores apresentam fenótipo normal (33).

Entre os indivíduos com alterações fenotípicas, as principais características encontradas são anomalias congênitas e (ou) deficiência

intelectual (34,35). Sabe-se também que a deficiência intelectual é mais frequente em indivíduos com translocações recíprocas equilibradas do que em indivíduos da população geral (36). Os RCEs também podem estar presentes em indivíduos com transtorno do espectro autista, em 1,3% dos casos (32).

As alterações fenotípicas observadas em indivíduos com RCEs podem ser devido a três principais mecanismos patogênicos: desequilíbrios genômicos associados aos pontos de quebra, não detectados previamente devido à baixa resolução da técnica de cariótipo com bandas G; interrupção de genes sensíveis à dosagem (37); efeito posicional, devido à interrupção de elementos reguladores ou de domínios topologicamente associados (*Topologically Associated Domains –* TADs); mecanismos de formação de genes quiméricos; e distúrbios do *imprinting* genômico (38).

Estudos que utilizaram a Análise Cromossômica por *Microarray* (CMA) a fim de investigar a presença de desequilíbrios genômicos (DGs) em indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas demonstraram que tais desequilíbrios estão presentes em cerca de 30% a 50% dos casos (29,30,33,38-42).

Recentemente Satkin e colaboradores (2021) realizaram uma revisão de dados publicados por 12 estudos que realizaram a investigação de DGs em indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas (Tabela 1) (43). Os resultados demonstraram que a CMA identificou DGs em 96/219 (43,8%) de todos os pacientes com RCEs, 55/153 (35,9%) nos pacientes com translocações, 10/27 (37%) nos pacientes com inversões e em 29/39 (74,4%) nos casos de RCCs. Em apenas um estudo os desequilíbrios estavam presentes em 100% dos casos investigados (42). Também foi realizada a comparação entre desequilíbrios associados a um dos pontos de quebra ou em outras regiões do genoma, sendo que 24,6% estavam associados aos pontos de quebra e 19,2% em outras regiões genômicas. Todos os resultados encontrados estão demonstrados na Tabela 1.

Estudos	Translocações	Inversões	RCCs	Total	DGs associados aos pontos de quebra	DGs em outras regiões genômicas		
Gribble e colaboradores (2005) (39)	5/8 (62,5%)	_	0/2 (0%)	5/10 (50%)	2/10 (20%)	3/10 (30%)		
De Gregori e colaboradores (2007) (33)	11/27 (40%)	_	12/13 (92%)	23/40 (57,5%)	16/40 (40%)	7/40 (17,5%)		
Higgins e colaboradores (2008) (41)	4/9 (44,4%)	-	_	4/9 (44,4%)	1/9 (11,1%)	3/9 (33,3%)		
Baptista e colaboradores (2008) (40)	4/11 (36,3%)	_	1/2 (50%)	5/13 (38,4%)	4/13 (30,7%)	1/13 (7,7%)		
Sismani e colaboradores (2008) (38)	2/6 (33,2%)	_	-	2/6 (33,2%)	1/6 (16,6%)	1/6 (16,6%)		
Schluth- Bolard e colaboradores (2009) (29)	8/21 (38,1%)	4/7 (57,1%)	4/5 (80%)	16/33 (48,5%)	9/33 (27,3%)	7/33 (21,2%)		
Gijsbers e colaboradores (2010) (42)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	-	5/5 (100%)	2/5 (40%)	3/5 (60%)		
Feenstra e colaboradores (2011) (30)	11/40 (27,5%)	0/6 (0%)	7/8 (87,5%)	18/54 (33,3%)	11/54 (20,3%)	7/54 (13%)		
Tabet e colaboradores (2015) (44)	2/5 (40%)	2/4 (50%)	-	4/9 (44,4%)	2/9 (22,2%)	2/9 (22,2%)		
Yakut e colaboradores (2017) (45)	3/7 (43%)	1/4 (25%)	-	4/11 (36,4%)	3/11 (27,3%)	1/11 (9,1%)		
Simioni e colaboradores (2017) (46)	1/11 (9%)	0/3 (0%)	1/1 (100%)	3/15 (20%)	1/15 (6,7%)	2/15 (13,3%)		
Satkin e colaboradores (2021) (43)	1/5 (20%)	1/1 (100%)	5/8 (62,5%)	7/14 (50%)	2/14 (14,3%)	5/14 (35,7%)		
Total	55/153 (35,9%)	10/27 (37%)	29/39 (74,4%)	96/219 (43,8%)	54/219 (24,6%)	42/219 (19,2%)		
Adaptado de: Satkin e colaboradores (2021) (43).								

Tabela 1. Comparação de estudos que realizaram CMA em pacientes com RCEs e alterações fenotípicas.

Além da identificação de DGs, Gribble e colaboradores (2005) verificaram que em 3/10 (30%) dos indivíduos estudados, havia

complexibilidade adicional dos rearranjos, do que identificado anteriormente por bandas G, incluindo deleções, inversões e inserções associadas ou próximas de um ou mais pontos de quebra (39).

Poucos estudos realizaram a investigação de desequilíbrios genômicos em indivíduos com RCEs herdados. Aqueles que fizeram, identificaram a presença de DGs nos casos herdados em menor quantidade do que nos casos de novo. Sismani e colaboradores (2008) identificaram desequilíbrios em um de seis casos herdados, duas deleções de ~4,3 Mb e ~2,3 Mb em um caso de translocação entre os cromossomos 4 e 7 [t(4;7)(q13.3;p15.3)], representando 16,6% dos casos (38). Schluth-Bolard e colaboradores (2009) identificaram a presença de desequilíbrios em quatro indivíduos com RCEs herdados, representando 28,6% dos casos (29). Além disso, Satkin e colaboradores (2021) também demonstraram que apenas 14 a 25% dos RCEs herdados possuem algum tipo de DG, o que sugere que outros eventos genéticos são responsáveis pelas alterações fenotípicas na maioria desses casos (43). Após a identificação desses deseguilíbrios, os rearranjos passam a ser chamados de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados (RCAEs), onde aparentam ser equilibrados, porém possuem deseguilíbrios genômicos que não foram identificados previamente por cariótipo com bandas G, devido à sua baixa resolução (5 a 10Mb).

Estudos que realizaram a caracterização molecular dos RCEs mostraram que a quebra intragênica em um dos pontos de quebra está presente em 21,3% a 33,9% dos pacientes com RCEs e alterações fenotípicas (47,48). O rearranjo pode causar a interrupção de genes sensíveis à dosagem, incluindo genes conhecidamente causadores de doenças com herança autossômica dominante, e na grande maioria dos casos são genes implicados diretamente em processos biológicos do sistema nervoso central (40).

Outro mecanismo é o efeito posicional, que é responsável por causar alterações fenotípicas quando o rearranjo gera a separação de um gene da sua região acentuadora ou promotora, justaposição com um elemento acentuador de outro gene, ou gera uma competição com o acentuador de outro gene (47). Em casos sem genes nos pontos de quebra, a interrupção de TADs foi encontrada em 7,3% a 7,4% dos casos (47,48). Os TADs apresentam alta

interação no genoma e sua interrupção pode causar uma interação acentuadorpromotor ectópica, gerando alteração na expressão gênica (49).

Até o momento, os desequilíbrios genômicos representam o mecanismo mais frequente associado a alterações fenotípicas em pacientes com RCEs, onde a investigação por CMA permite detectar alterações de até 1 kb dependendo da plataforma utilizada, e assim identificar variantes no número de cópias (*Copy Number Variation* – CNVs) associadas aos pontos de quebras ou presentes em outras regiões do genoma, que podem apresentar genes associados aos quadros clínicos, resultando em conclusões diagnósticas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar desequilíbrios genômicos em indivíduos que apresentam rearranjos cromossômicos equilibrados ou rearranjos cromossômicos complexos com alterações fenotípicas.

2.2. Objetivos específicos

I. Realizar estudo retrospectivo de casos com rearranjos cromossômicos equilibrados ou rearranjos cromossômicos complexos identificados no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, e nesta amostra:

- Identificar a frequência de indivíduos com fenótipo normal ou alterado;
- Identificar a frequência de casos herdados ou de novo;
- Identificar a frequência dos rearranjos cromossômicos complexos.

II. Investigar desequilíbrios genômicos, associados ou não aos pontos de quebra, em indivíduos com rearranjos cromossômicos equilibrados ou rearranjos cromossômicos complexos, com alterações fenotípicas.

3. Casuística e métodos

3.1. Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp (CAAE: 47887221.5.0000.5404; Parecer: 5.042.235).

Para a identificação dos indivíduos que apresentam RCEs ou RCCs, foram revisados os resultados de cariótipo realizados no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM - Unicamp entre 1990 e 2020.

Para a investigação de desequilíbrios genômicos em indivíduos com RCEs ou RCCs com alterações fenotípicas, foram selecionados 14 indivíduos, sendo nove deles acompanhados no Serviço de Genética Clínica do Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp, e cinco encaminhados de outros serviços de genética: dois do Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Alagoas; dois do Instituto Fernandes Figueira – Fiocruz, Rio de Janeiro; e um da Universidade Federal do Maranhão.

3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Para a análise retrospectiva de dados foram incluídos todos os indivíduos que apresentaram RCEs ou RCCs com fenótipo normal ou alterações fenotípicas, e foram excluídos indivíduos que apresentaram rearranjos cromossômicos desequilibrados, translocações Robertsonianas e inversões do cromossomo 9.

Para a realização da CMA foram incluídos indivíduos que apresentaram RCEs ou RCCs com alterações fenotípicas, e que estavam em atendimento nos serviços de Genética, durante a realização deste estudo, ou com dados obtidos previamente, disponíveis para análise. Foram excluídos indivíduos com fenótipo normal.

3.2. Métodos

3.2.1. Estudo retrospectivo

Para a coleta de dados dos resultados de cariótipo do Laboratório de Citogenética Humana da Unicamp foram utilizados registros de resultados presentes em planilhas do programa Excel (Microsoft®), arquivados neste laboratório. A classificação do fenótipo, se normal ou alterado, foi realizada primariamente a partir do motivo do encaminhamento, e quando necessário foram consultados os prontuários do Serviço de Genética Clínica do HC da Unicamp.

3.2.2. Coleta das amostras

Amostras de sangue periférico foram coletadas para os indivíduos selecionados para a realização da CMA. Após a realização da assepsia do local com álcool 70%, foram coletados em torno de 4-5 ml de sangue periférico em tubos de coleta com anticoagulante EDTA. Os tubos foram encaminhados para o Laboratório de Citogenética e Citogenômica da FCM/Unicamp para a extração de DNA.

3.2.3. Extração de DNA genômico

A técnica de extração de DNA genômico foi realizada através do método fenol-clorofórmio.

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos. Quando houve excesso de plasma em uma amostra, o plasma foi cuidadosamente removido com uma pipeta Pasteur, tomando o cuidado de não remover a camada leucocitária. Quando o volume da amostra era pequeno, o sangue total foi utilizado. Para cada amostra, um a dois ml de amostra e oito ml de solução de lise foram transferidos para um tubo cônico de 15 ml e, em seguida, o tubo foi delicadamente invertido 50 vezes. O tubo contendo a amostra foi centrifugado a 3.000 rpm por 35 minutos para permitir a precipitação dos núcleos. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado.

Utilizando uma micropipeta, o precipitado foi cuidadosamente ressuspendido em 950 µl da solução 2 e o tubo foi homogeneizado. Essa solução é composta por 2,19 gramas de NaCl 0,075 M, 20 ml de EDTA 0,02 M

pH 8,0 e completada até 500 ml com água destilada estéril. Em seguida, foram adicionados 140 µl de SDS 10% e 80 µl de Proteinase K (com uma concentração de 10 mg/ml) ao tubo. O tubo foi então colocado em uma estufa a 37°C durante a noite.

Após esse período, 1 ml de fenol ultrapuro com tampão foi cuidadosamente adicionado ao tubo, utilizando uma pipeta graduada. O tubo foi homogeneizado por 10 minutos e, em seguida, centrifugado a 3.000 rpm durante 20 minutos. Após, a fase superior foi removida, utilizando uma pipeta Pasteur e evitando tocar na interface onde se encontram as proteínas coaguladas, e transferida cuidadosamente para um novo tubo cônico de 15 ml. No novo tubo, foi adicionado 1 ml de solução de clorofórmio: álcool isoamílico 24:1, utilizando uma pipeta graduada. Em seguida, o tubo foi delicadamente invertido, para homogeneizar a solução, e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Novamente, a fase superior foi cuidadosamente removida com o uso de uma pipeta Pasteur e transferida para outro tubo cônico de 15 ml. O processo anterior foi repetido, entretanto, nessa etapa a fase superior foi transferida para um tubo cônico de 15 ml contendo 100 µl de KCl 2M, e foram adicionados 3 ml de álcool etílico 100% gelado. O tubo foi homogeneizado invertendo cuidadosamente até a visualização da precipitação do DNA em formato de fios brancos.

Foram adicionados 200 µl de álcool etílico 70% gelado em um microtubo cônico de 1,5 ml. O precipitado de DNA foi transferido para o microtubo usando uma micropipeta, e o microtubo foi centrifugado em uma microcentrífuga refrigerada (4°C) a 1.500 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o microtubo foi invertido para desprezar o sobrenadante, e foi colocado em temperatura ambiente para evaporar todo o álcool.

Depois de ter sido completamente seco, 100 µl de BE (tampão de eluição 5mM Tris/HCl, pH 8,5 Macherey-Nagel) foram adicionados ao microtubo usando uma micropipeta. O microtubo foi então colocado em banhomaria por 30 minutos a 65°C para destruir as nucleases. Após essa etapa, o microtubo foi mantido em temperatura ambiente, o DNA foi quantificado e armazenado no biorrepositório do Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM - Unicamp.

3.2.4. Análise cromossômica por microarray (CMA)

A CMA foi realizada utilizando o chip *CytoScan 750K da Affymetrix*® (Thermo Fisher Scientific, Inc. - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o kit de reagentes compatíveis - *Reagent Kit Bundle - Affymetrix*® (Thermo Fisher Scientific, Inc. - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

O chip *CytoScan 750K (Affymetrix®)* possui uma cobertura abrangente de todo o genoma com aproximadamente 750.000 marcadores de oligonucleotídeos para análise de CNVs, sendo eles 550.000 marcadores não polimórficos e 200.436 marcadores de SNPs (*Single nucleotide polimorphisms*) com um espaçamento médio de 4 kb entre os marcadores, na extensão total do genoma, que asseguram também a detecção de perda de heterozigose (*Loss of heterozygosity – LOH*).

Para a realização da técnica seguiu-se as recomendações do fabricante com pequenas modificações. Antes de iniciar a técnica de CMA, realizou-se a verificação da integridade das amostras de DNA por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, as amostras foram quantificadas usando um espectrofotômetro e foram verificados os seguintes parâmetros e razões de absorbância: A260/A280, que deveria estar entre 1,7 - 2,0; A260/A230, maior que 1,1; e A320, entre 0,01-0,1. As amostras de DNA foram diluídas em BE para atingir uma concentração de 50 ng/µl, e a concentração foi novamente confirmada por meio de quantificação.

Para realizar a digestão do DNA, adicionou-se 5 µl de cada amostra de DNA, bem como dos controles positivo e negativo, em seus respectivos poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, preparou-se uma solução de digestão em um tubo de 1,5 ml, composta por 110,9 µl de água livre de nuclease, 19,2 µl de Nspl Buffer, 1,9 µl de BSA 100X e 9,6 µl da enzima Nspl, totalizando 141,6 µl de solução. A mistura foi agitada em alta velocidade no vórtex por um segundo, três vezes, e em seguida, foram distribuídos 14,75 µl da solução em cada poço da placa, utilizando uma micropipeta P20. A placa foi selada, agitada no vórtex por um segundo, três vezes, e centrifugada a 2.000 rpm por um minuto. Em seguida, a placa foi incubada em um termociclador nas seguintes condições: 37°C por 2 horas, seguido de 65°C por 20 minutos, e

finalmente mantida a 4ºC. Após essa etapa, a placa foi centrifugada novamente antes de remover o selo.

Após a digestão do DNA foi realizada a etapa de ligação, a placa foi colocada no gelo, foi preparada uma solução de ligação em um tubo de 1,5 ml contendo os seguintes reagentes: 25 µl de DNA *Ligase Buffer,* 7,5 µl de adaptador *Nspl* e 20 µl de DNA *Ligase*, totalizando 52,5 µl. A solução preparada foi agitada no vórtex durante um segundo, três vezes. Com uma micropipeta (P10), distribuiu-se 5,25 µl da solução para cada poço da placa. A placa foi selada, agitada no vórtex por um segundo, três vezes, e centrifugada a 2.000 rpm por um minuto. Em seguida, a placa foi incubada em um termociclador a 16°C por 3 horas, seguido de uma etapa a 70°C por 20 minutos, e finalmente mantida a 4°C. Após essa etapa, a placa foi centrifugada novamente antes de remover o selo.

As amostras foram diluídas em 75 μ l de água livre de nuclease, totalizando 100 μ l em cada poço da placa. A placa foi selada, agitada no vórtex e centrifugada para homogeneizar as amostras. Utilizando uma micropipeta P10, foram transferidos 40 μ l de cada amostra para uma nova placa de PCR, adicionando apenas 10 μ l de cada amostra em um poço diferente, totalizando em quatro poços com 10 μ l de cada amostra (Figura 5).



Figura 5. Imagem demonstrativa da etapa de diluição e transferência de alíquotas de 10 µl de cada amostra diluída para a placa de PCR, Resultando em quatro poços de cada amostra, cada um contendo 10 µl. **Adaptado de:** Fisher Scientific (50).

Então foi realizada a etapa de ampliação através de PCR, onde foi preparada a solução de PCR em um tubo de 50 ml contendo os seguintes reagente: 1.453,6 µl de água livre de nucleasse, 368 µl de 10X TITANIUM *Taq*
PCR Buffer, 736 µl de reagente GC-Melt, 515,2 µl de dNTP, 165,6 µl de *primer* de PCR e 73,6 µl de 50X TITANIUM *Taq DNA Polymerase,* totalizando 3.312 µl. A solução preparada foi agitada no vórtex durante um segundo, três vezes. Com uma micropipeta P100 transferiu-se 90 µl da solução para cada um dos quatro poços de cada amostra. Então, a placa foi selada, agitada no vórtex e centrifugada conforme as etapas anteriores. A placa foi incubada em um termociclador seguindo as seguintes etapas: 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 68°C por 15 segundos e, por fim, 68°C por 7 minutos, e finalmente mantida a 4°C. Após essa etapa foi realizada a verificação do produto da PCR, onde foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2%. Os fragmentos amplificados pela PCR deveriam estar entre 150 e 2000 pb.

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos, seguiu-se para a purificação do produto da PCR. Nesta etapa o controle negativo foi descartado, assim, os poços contendo as amostras dos produtos da PCR foram colocados em um microtubo cônico graduado de 1,5 ml, totalizando em 397 µl de cada amostra. Com uma micropipeta P1000 foram adicionados 720 µl de Purification beads em cada microtubo, sendo invertidos durante dez vezes, até a homogeneização completa, e deixados em temperatura ambiente por dez minutos. Os tubos foram centrifugados a 16.100 rcf por três minutos e em seguida colocados em uma rack magnética. O sobrenadante foi removido com uma micropipeta P1000, preservando o precipitado. Então, adicionou-se 1 ml de tampão de lavagem em cada amostra. Os tubos foram agitados no vórtex na velocidade máxima por dois minutos, centrifugados a 16.100 rcf durante três minutos, colocados novamente na rack magnética e removeu-se o sobrenadante com uma micropipeta P1000. Os tubos foram centrifugados a 16.100 rcf por 30 segundos, e por fim todo o resíduo de tampão foi removido. Os tubos foram deixados abertos até que todo o resíduo tivesse evaporado. Foram adicionados 52 microlitros do tampão de eluição em cada amostra. Os tubos foram agitados no vórtex por dez minutos para ressuspender o material aderido às beads magnéticas e foram centrifugados a 16.100 rcf durante três minutos. Os tubos passaram para a estante magnética e ficaram durante dez minutos. Assim, as amostras eluídas foram transferidas para uma nova placa, em cada poço correspondente. A placa foi selada, agitada no vórtex por um

segundo, três vezes e centrifugada a 2.000 rpm durante um minuto. Após essa etapa as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro e os seguintes padrões foram observados: concentração, maior ou igual a 300 ng/µl; razão A260/A280 entre 1,8 – 2,0 e razão A320 menor que 0,1.

Fragmentação: foi preparada a solução da fragmentação utilizando os seguintes reagentes: 271,2 μl de água livre de nuclease, 343,8 μl de *Fragmentation Buffer* e 10 μl de *Fragmentation Reagent*. A solução foi agitada no vórtex por um segundo, três vezes e com o auxílio de uma micropipeta P10, 10 μl da solução da fragmentação foram adicionados aos poços contendo o produto da PCR purificado, totalizando 55 μl. A placa foi selada, agitada no vórtex e centrifugada a 4°C por um minuto a 2.000 rpm. Em seguida, a reação foi incubada em um termociclador com as seguintes disposições: 37°C por 35 minutos, 95°C por 15 minutos e finalmente mantido a 4°C. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 4% e os fragmentos observados deveriam estar entre 25 a 125 pb.

Assim que a fragmentação foi confirmada seguiu-se para a etapa de marcação, onde a solução de marcação foi preparada em um tubo de 1,5 ml contendo os seguintes reagentes: 134,4 µl de *TdT Buffer*, 19,2 µl de DNA *Labeling Reagent* e 33,6 µl de *TdT Enzyme*. Em seguida a solução foi agitada no vórtex por um segundo, três vezes e com uma micropipeta P20 19,5 µl da solução foram adicionados em cada amostra na placa, totalizando 70,5 µl. A placa foi selada, agitada no vórtex e centrifugada por um minuto a 2.000 rpm. Em seguida, a reação foi incubada em um termociclador a 37°C por 4 horas, 95°C por 15 minutos e 4°C ao final.

Após a marcação, antes de começar a etapa de hibridação, os chips utilizados (CytoScan 750K[™]) foram retirados da geladeira e colocados em temperatura ambiente. A solução da hibridação foi preparada em um tubo de 1,5 ml, utilizando os seguintes reagentes: 1.584 µl de *Hybridization Buffer Part* 1, 144 µl de *Hybridization Buffer Part* 2, 67,2 µl de *Hybridization Buffer Part* 3, 9,6 µl de *Hybridization Buffer Part* 4 e 19,2 µl de *Oligo Control Reagent*. A solução foi agitada no vórtex por um segundo, três vezes e centrifugada a 2.000 rpm por um minuto. Em seguida, com uma micropipeta P200 190 µl da solução de hibridação foram adicionados em cada poço contendo as amostras pré-marcadas na placa. Assim, a placa foi selada, agitada no vórtex e centrifugada por um minuto a 2.000 rpm. Em seguida, a reação foi incubada em um termociclador a 95°C por 10 minutos e mantida a 49°C. Com as amostras a 49°C no termociclador, foram adicionados 200 µl de cada amostra em seu respectivo chip. Os septos dos chips foram vedados com adesivo e, imediatamente, os chips foram levados ao forno de hibridação por um período de 16 horas a 50°C e a 60 rpm.

Após a etapa de marcação, antes de iniciar a lavagem, foram feitas alíquotas dos reagentes *Stain buffer 1, Stain buffer 2* e *Array Holding Buffer* em microtubos cônicos de 1,5 ml. Cada conjunto de três tubos contendo os reagentes citados correspondia a um chip, sendo posicionados na parte frontal da estação de lavagem. Após as 16 horas de hibridação no forno, o conteúdo do chip foi transferido novamente para o poço correspondente de cada amostra na placa, e foram adicionados no chip 200 µl de *Array Holding Buffer*. Em seguida, quatro chips por vez foram inseridos na estação de lavagem e foi iniciada a execução automática das etapas de lavagem e coloração dos chips *CytoScan* que tem a duração de duas horas para cada conjunto de quatro chips.

Ao final da lavagem, os chips foram colocados no equipamento *GeneChip® Scanner 3.000 7G* para o escaneamento dos mesmos. Foram utilizados programas específicos para a captação de imagem gerada por cada chip analisado.

3.2.5. Análise dos resultados da CMA

Os dados foram processados pelo software desenvolvido pela *Affymetrix* chamado de *Chromosome Analysis Suite* (*ChAS*) (Thermo Fisher Scientific, Inc. - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para a interpretação dos desequilíbrios genômicos identificados foi utilizado o guia de interpretação do Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM/Unicamp, que apresenta quatro etapas principais. Na primeira etapa, verificou-se os parâmetros recomendados pelo fabricante, que indicam se os dados obtidos podem ser analisados: *SNPQC* (*Single Nucleotide Polymorphism Quality Control*) que deve ser maior ou igual a 12; *MAPD* (*Median Absolute Pairwise*) *Difference*) que deve ser menor ou igual a 0,25; e *WavinessSD* (*Waviness Standard Deviation*) que deve ser menor ou igual a 0,12.

Na segunda etapa, foram adicionados filtros, seguindo as recomendações da *Affymetrix*, que exigiam a presença mínima de 25 marcadores para a chamada de deleções genômicas e 50 marcadores para as duplicações genômicas.

Na terceira etapa, foram procuradas alterações grandes (≥500 kb) em regiões de desequilíbrios genômicos recorrentes. As alterações fenotípicas presentes no paciente foram comparadas com informações descritas na literatura. Quando não foram encontrados esses desequilíbrios, prosseguiu-se para as próximas etapas.

Para cada desequilíbrio genômico listado, analisou-se o número de marcadores dentro da região do desequilíbrio, se eles apresentavam uma boa cobertura e distribuição, a partir dos gráficos de *Log2 Ratio* e de oligonucleotídeos de *SNPs*.

O genoma de referência utilizado para análise e interpretação foi o *hg19*. Após a identificação e verificação dos desequilíbrios genômicos, utilizouse as recomendações do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (*American College of Medical Genetics and Genomics* – ACMG) para a interpretação e classificação dos desequilíbrios encontrados (51).

De acordo com as recomendações da ACMG, as CNVs com valor ≥0,99 são consideradas patogênicas, enquanto valores entre 0,90 e 0,98 são considerados provavelmente patogênicas, aquelas com valores entre -0,89 e 0,89 são consideradas variantes de significado incerto (*Variant of Uncertain Significance* – VUS), e os valores entre -0,90 e -0,98 ou ≤-0,99 são consideradas provavelmente benignas e benignas, respectivamente (Figura 6).



Figura 6. Categorias de classificação de variantes de acordo com o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica (*American College of Medical Genetics and Genomics* – ACMG). **Adaptado de:** Marconi (2023) (52), disponível em: (https://blog.mendelics.com.br/glossario-de-genetica-parte-3/).

Para a classificação das CNVs utilizou-se a calculadora de interpretação de CNV do *ClinGen* (<u>https://cnvcalc.clinicalgenome.org/cnvcalc/</u>), onde foi possível obter a pontuação correspondente de cada variante, a partir do preenchimento das cinco sessões apresentadas.

Para a busca de informações para o preenchimento das sessões, utilizou-se o genome browser da UCSC (University of California Santa Cruz), com as seguintes configurações: base position – full, chromossome band – full, USCS genes – pack, DECIPHER CNVs – pack, ClinGen – pack, Clingen CNVs – pack, Clinvar Variants – pack, haploinsufficiency – pack, OMIM genes – pack, DGV Strutural Variants – pack e Segmental Dups – dense. Assim, os achados dos desequilíbrios genômico foram comparados com os bancos de dados disponíveis, DGV (*Database of Genomic Variants*), ClinVar, DECIPHER e ClinGen, além dos artigos publicados na literatura, a partir de buscas no PubMed.

3.2.6. Revisão da Literatura

Foi realizada a revisão da literatura, incluindo trabalhos que utilizaram a CMA para identificar desequilíbrios genômicos em indivíduos portadores de RCEs ou RCCs com alterações fenotípicas. O site de busca utilizado foi o PubMed, através dos seguintes descritores em inglês:

- Chromosome aberrations;
- Apparently balanced chromosomal rearrangements;
- De novo chromosomal rearrangements;
- Chromosomal rearrangements of familial origin;
- Familial reciprocal translocation;
- Microarray chromosome analysis;
- Genomic imbalances.

Nessa revisão classificamos como RCCs apenas aqueles que envolviam mais de três pontos de quebra e mais de dois cromossomos, diferente da classificação de alguns trabalhos que incluíram as inserções neste grupo.

4. Resultados e discussão

4.1. Análise retrospectiva de resultados de cariótipo

Na análise retrospectiva de 30 anos, de resultados de cariótipo do Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da FCM/Unicamp, foram identificados 174 indivíduos com RCEs e quatro indivíduos com RCCs. Desses, os dados complementares, para verificar a presença de alterações fenotípicas, estavam disponíveis para 151.

Dos 151 indivíduos, para os quais os dados foram avaliados retrospectivamente, foram identificados 109 indivíduos com translocações, 27 com inversões, 11 com inserções e quatro com rearranjos cromossômicos complexos (Figura 7). De acordo com Forabosco e colaboradores (2009), as alterações mais frequentes entre os RCEs são as translocações, com 1:520 nascidos vivos, seguida de inversões com uma frequência de 1:1.000 (6). Já

para as inserções, a frequência varia entre 1:3.380 e 1:5.200 nascidos vivos (8). Os RCCs, por sua vez, são extremamente raros.



Figura 7. Representação gráfica dos tipos de rearranjos cromossômicos estruturais equilibrados observados em 151 indivíduos durante a análise retrospectiva de 30 anos, realizada no Laboratório de Citogenética e Citogenômica da Unicamp/FCM.

Entre os 151 indivíduos, 72,2% (109/151) apresentaram fenótipo normal e 27,8% (42/151) fenótipo anormal (Figura 8). Embora a presença de alterações fenotípicas seja descrita em cerca de 7% dos indivíduos com RCEs (35), a amostra deste estudo foi composta por indivíduos atendidos no Serviço de Genética Clínica e, portanto, é esperado que a porcentagem de indivíduos com alterações fenotípicas seja maior do que a relatada na literatura, em estudos populacionais. Além disso, no caso das inversões, as alterações fenotípicas estavam presentes em 33,3% (9/27) dos casos, pois foram excluídos aqueles com inversão do cromossomo 9, visto que é considerada uma variação normal na população geral. Entre os portadores de RCCs, observou-se que 75% (3/4) apresentavam alterações fenotípicas, as quais podem estar relacionadas à complexidade do cariótipo. De acordo com Madan e colaboradores (1997) é provável que quanto maior o número de pontos de quebra dos RCCs, maior seja a probabilidade da presença de alterações fenotípicas

(10).



Figura 8. Representação gráfica dos diferentes fenótipos observados na amostra de indivíduos da análise retrospectiva, de acordo com os tipos de rearranjos cromossômicos estruturais (RCEs).

Em relação à origem parental dos rearranjos, 41% (62/151) deles eram herdados, 10,6% (16/151) *de novo* e 48,3% (73/151) não completaram a investigação parental, supostamente devido a descontinuidade do seguimento no Serviço de Genética Clínica ou por falta de comparecimento dos pais e familiares. A maioria dos RCEs é herdada de um dos genitores, sendo transmitidos de forma equilibrada para os descendentes. Entretanto, cerca de 20% dos casos são *de novo* e apresentam um risco de cerca de 6,1% de gerar um fenótipo anormal nos portadores (40).

4.2. Resultados da CMA em indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas

Foram analisados os dados da CMA obtidos previamente de sete indivíduos e a CMA foi realizada em outros sete, resultando em uma amostra total de 14 indivíduos. Desses indivíduos, sete apresentaram translocações (três *de novo*, três herdadas e um com investigação de origem não concluída); quatro inversões (duas *de novo*, uma herdada e uma em que a investigação da origem não foi concluída); uma inserção (herdada); e dois rearranjos cromossômicos complexos (um *de novo* e outro em que a investigação não foi concluída). Foram identificados desequilíbrios genômicos associados aos pontos de quebra em dois indivíduos (01 e 02), associados aos pontos de quebra e em outras regiões genômicas em dois indivíduos (03 e 04), apenas em outras regiões do genoma em três indivíduos (05, 06 e 07). Em sete indivíduos não foram encontrados desequilíbrios genômicos relevantes (08 -14). Os cariótipos, resumos das alterações fenotípicas, assim como os desequilíbrios genômicos e suas respectivas classificações estão descritos nas Tabelas 2 e 3. Tabela 2. Características fenotípicas, resultados de cariótipos, origem parental e resultados da CMA dos sete indivíduos com desequilíbrios genômicos..

Desequilíbrios genômicos associados aos pontos de quebra							
Indivíduo	Fenótipo	Cariótipo	СМА	Classificação (ACMG)	Genes codificadores de proteínas		
01	Atraso global do neurodesenvolvim ento, deficiência intelectual (DI), baixa estatura, dismorfis mos faciais e defeito cardíaco congênito.	46,XY,inv(11)(q21q23)	del(11)(q22.1q22.3)(101511391_105743 998) 4,2 Mb	Provavelmente patogênica	ANGPTL5, BIRC2, BIRC3, CARD16, CARD18, CASP1, CASP12, CASP4, CASP5, CEP126, CFAP300, DCUN1D5, DDI1, DYNC2H1, GRIA4, MMP1, MMP10, MMP12, MMP13, MMP20, MMP27, MMP3, MMP7, MMP8, PDGFD, TMEM123, TRPC6 e YAP1 (28 genes).		
02	Distúrbio da Diferenciação do Sexo Ovário- Testicular (DDS – OT).	46,X,inv(X)(p22.1q26) dn	del(X)(p22.31) (6538033_7848224) 1,3 Mb	Patogênica	PUDP, STS e VCX (Três genes).		
	Desequilí	brios genômicos associ	iados aos pontos de q	quebra e em outr	as regiões do genoma		
Indivíduo	Fenótipo	Cariótipo	СМА	Classificação (ACMG)	Genes codificadores de proteínas		
03	Escafocefalia, dismorfismos faciais e atraso no desenvolvimento	46,XX,der(1)(?::1p22 →1qter),der(2)(2pter →2q35::20q11.2→20q ter),	del(3)(q29)(1963584 65_196897652) 539 kb	Provavelmente patogênica	CEP19, DLG1, MELTF, NCBP2, NCBP2AS2, NRROS, PAK2, PIGX, PIGZ e SENP5 (10 genes).		

	neuropiscomotor (ADNPM).	der(3)(?::3p12→3qter) ,der(20)(20pter→20q1 1.2::?1p31::3p12→3pt er)dn	del(20)(q13.31q13.3 2)(56333749_58285 282) 1,9 Mb	Patogênica	ANKRD60, APCDD1L, ATP5F1E, C20orf85, CTSZ, EDN3, GNAS, NELFCD, NPEPL1, PHACTR3, PRELID3B, RAB22A, STX16, STX16-NPEPL1, TUBB1, VAPB e ZNF831 (17 genes).
04	Dismorfismos faciais, sindactilia cutânea em dedos dos pés, clinodactilia em dedos das mãos; DI leve e lúpus eritematoso sistêmico juvenil.	46,XX,t(1;8;13)(p31;p 21;q32),t(13;18;21)(q1 4;q21.3;q22)	31;p del(12)(p13.31p13.2 Pat l)(q1)(8680343_1230288 4) 3,6 Mb	Patogênica	A2M, A2ML1, AICDA, BCL2L14, CD69, CLEC12A, CLEC12B, CLEC1A, CLEC1B, CLEC2A, CLEC2B, CLEC2D, CLEC4E, CLEC7A, CLEC9A, EIF2S3B, ETV6, GABARAPL1, KLRB1, KLRC1, KLRC2, KLRC3, KLRC4, KLRC4-KLRK1, KLRD1, KLRF1, KLRF2, KLRG1, KLRK1, LRP6, M6PR, MAGOHB, MFAP5, OLR1, PHC1, PRB1, PRB2, PRB3, PRB4, PRH1, PRH2, PRH4, PZP, RIMKLB, SMIM10L1, STYK1, TAS2R10, TAS2R13, TAS2R14, TAS2R19, TAS2R20, TAS2R30, TAS2R31, TAS2R42, TAS2R43, TAS2R46, TAS2R50, TAS2R7, TAS2R8, TAS2R9, TMEM52B e YBX3 (62 genes).
			del(13)(q14.3q21.1)(54515440_5791361 4) 3,3 Mb	VUS	PRR20A, PRR20B, PRR20C, PRR20D e PRR20E (Cinco genes).
			del(13)(q21.1q21.2)(59338843_5992316 1) 584 kb	VUS	-
			del(13)(q21.2)(6014 9238_60290663) 141 kb	VUS	DIAPH3 (Um gene).
			del(13)(q21.2q21.33)(60546373_697324 93) 9,1 Mb	VUS	DIAPH3, PCDH20, PCDH9 e TDRD3 (Quatro genes).
			del(13)(q34)(112806 374_114580074) 1,7 Mb	VUS	ADPRHL1, ATP11A, ATP4B, CUL4A, DCUN1D2, F10, F7, GAS6, GRK1, GRTP1, LAMP1, MCF2L, PCID2, PROZ, SPACA7,

			del(21)(q22.3)(4510 7096_47067181) 1,9 Mb	Provavelmente patogênica	<i>TFDP1, TMCO3, TMEM255B e TUBGCP3</i> (19 genes). <i>ADARB1, AGPAT3, AIRE, CFAP410,</i> <i>COL18A1, CSTB, DNMT3L, GATD3,</i> <i>ICOSLG, ITGB2, KRTAP10-1, KRTAP10-10,</i> <i>KRTAP10-11, KRTAP10-12, KRTAP10-2,</i> <i>KRTAP10-3, KRTAP10-4, KRTAP10-5,</i> <i>KRTAP10-6, KRTAP10-7, KRTAP10-8,</i> <i>KRTAP10-9, KRTAP12-1, KRTAP12-2,</i> <i>KRTAP10-9, KRTAP12-4, LRRC3, PCBP3,</i> <i>PDXK, PFKL, POFUT2, PTTG1IP, PWP2,</i> <i>RRP1, RRP1B, SLC19A1, SLX9, SUMO3,</i> <i>TRAPPC10, TRPM2, TSPEAR e UBE2G2</i> (42 genes).
		Desequilíbrios	genômicos em outras	s regiões do gene	oma
Indivíduo	Fenótipo	Cariótipo	СМА	Classificação (ACMG)	Genes codificadores de proteínas
05	ADNPM, dismorfismos faciais, deficiência imunológica e hipótese diagnóstica de Síndrome de Deleção 22q11.2 (SD22q11.2).	46,XX,t(3;16)(q23;p12)pat	del(22)(q11.21)(189 16842_21798907) 2,9 Mb	Patogênica	AIFM3, ARVCF, C22orf39, CCDC188, CDC45, CLDN5, CLTCL1, COMT, CRKL, DGCR2, DGCR6L, DGCR8, ESS2, FAM246A, FAM246C, GNB1L, GP1BB, GSC2, HIC2, HIRA, KLHL22, LRRC74B, LZTR1, MED15, MRPL40, P2RX6, PI4KA, PRODH, RANBP1, RIMBP3B, RTL10, RTN4R, SCARF2, SEPTIN5, SERPIND1, SLC25A1, SLC7A4, SNAP29, TANGO2, TBX1, THAP7, TRMT2A, TSSK2, TUBA3FP, TXNRD2, UFD1, ZDHHC8 e ZNF74 (48 genes).
06	Espectro óculo- aurículo-vertebral.	46,XX,t(7;8)(q34;q21) mat	dup(12)(q24.32)(12, 061431_127329266) 267 kb	VUS	-
07	ADNPM.	46,XX,inv(2)(q24q33)d	del(7)(q21.1)(83690	VUS	SEMA3A (Um gene).

n	700_83783267) 92 kb	
	dup(8)(p.21.3)(2221 VUS 2779_22381979) 169 kb	PIWIL2, PPP3CC e SLC39A14 (Três genes).

Tabela 3. Características fenotípicas, resultados de cariótipos, origem parental e resultados da CMA dos sete indivíduos sem desequilíbrios genômicos.

Indivíduo	Fenótipo	Cariótipo	СМА
08	Genitália ambígua.	46,XY,t(3;5)(q27;q31)	Normal
09	Fenda lábio palatina, dismorfismos faciais e prega palmar transversa em mão direita.	46,XY,t(5;15)(q33;q26.2)dn	Normal
10	Fenda orofacial.	46,XY,t(7;17)(p14;p12)dn	Normal
11	Atraso global do desenvolvimento, dismorfismos faciais e frouxidão ligamentar.	46,XY,t(8;10)(q13;q26)dn	Normal
12	Deficiência intelectual leve.	46,XX,t(10;13)(p13;q14)mat	Normal
13	Epispádia.	46,XY,inv(10)(p12q21)mat	Normal
14	Deficiência intelectual, microcefalia, estereotipia motora e marcha atáxica.	46,XX,ins(9;15)(q33;q21.1q22.31)mat	Normal

Ausência de desequilíbrios genômicos relevantes

A frequência esperada para desequilíbrios genômicos em indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas, a partir da CMA, é de 30 a 50% dos casos. (39,30,37-42). A CMA neste estudo detectou desequilíbrios genômicos em sete indivíduos, o que corresponde a 50% (7/14) dos casos analisados (Figura 9A). Entre os sete indivíduos com desequilíbrios genômicos, os rearranjos foram duas translocações herdadas (indivíduos 05 e 06); três inversões, sendo duas *de novo* (indivíduos 02 e 07) e uma não investigada (indivíduo 01); e dois RCCs, um *de novo* (indivíduo 03) e um onde a investigação não foi concluída (indivíduo 04).

No entanto, em dois desses indivíduos, foram encontrados apenas desequilíbrios classificados como VUS. Um deles apresentou uma translocação entre os cromossomos 7 e 8 (Indivíduo 06) - t(7;8)(q34;q21) – de origem materna, com uma duplicação de 267 kb em 12q24.32, que não apresentava nenhum gene codificante, classificada como VUS. Em outro indivíduo, com uma inversão *de novo* no cromossomo 2 (indivíduo 07) - 46,XX,inv(2)(q24q33) - , foram encontrados dois desequilíbrios genômicos, uma deleção de 92 kb no cromossomo 7, que incluía apenas um gene, e uma duplicação de 169 kb no cromossomo 8, que incluía três genes, ambas classificadas como VUS.

Assim, foram encontrados desequilíbrios genômicos patogênicos ou provavelmente patogênicos em cinco indivíduos, correspondendo a 35,7% (5/14) dos casos (Figura 9B). Em sete indivíduos não foram encontrados desequilíbrios genômicos relevantes.



Figura 9. Representações gráficas da diferença entre o número de indivíduos com desequilíbrios genômicos. **A:** Sete indivíduos sem desequilíbrios genômicos e outros sete com desequilíbrios classificados como patogênicos, provavelmente patogênicos e VUS. **B:** Nove indivíduos sem desequilíbrios clinicamente relevantes e cinco com desequilíbrios classificados como patogênicos ou provavelmente patogênicos.

Entre os cinco indivíduos com desequilíbrios patogênicos ou provavelmente patogênicos, dois apresentaram desequilíbrios associados aos pontos de quebra. O indivíduo 1 apresentou como característica fenotípica principal o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e, a partir do cariótipo, foi identificada uma inversão paracêntrica no cromossomo 11 [46,XY,inv(11)(q21q23)] (Figura 10), de origem não investigada.



Figura 10. Cariótipo parcial do indivíduo 1 mostrando inversão paracêntrica do cromossomo 11 [46,XY,inv(11)(q21q23)].

A CMA foi realizada em laboratório externo e foi observada uma deleção de 4,2 Mb em 11q22.1q22.3, região associada ao ponto de quebra do [11q22.1q22.3(101511391 105743998 rearranjo _ GRCh37)] que foi classificada como provavelmente patogênica. Essa região contém 28 genes, incluindo o YAP1, TRPC6, DCUN1D5 e o GRIA4, os quais apresentam alguns preditores de haploinsuficiência. Variantes no gene YAP1 podem estar relacionadas ao atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, como descrito por Williamson e colaboradores (2014) que relataram uma família onde 13 membros apresentaram um quadro sindrômico, incluindo alterações oftalmológicas a déficit intelectual (53). Variantes no gene GRIA4 também podem estar associadas a transtornos do neurodesenvolvimento e outras características clínicas (54).

Na base de dados do DECIPHER foram identificados 10 indivíduos (481116, 285692, 389000, 413717, 284777, 353744, 286996, 355425, 369831 e 286222) com deleções que apresentaram sobreposição com a deleção do presente indivíduo, com tamanhos variados entre 619,37 kb a 134,18 Mb (Figura 11). Desses indivíduos, 60% (6/10) apresentaram deficiência intelectual que variavam de leve a grave. Krgovic e colaboradores (2011) identificaram um indivíduo com uma deleção de 743 kb, *de novo*, na região 11q22.3, com dismorfismos faciais, atraso no desenvolvimento da fala e da linguagem, deficiência intelectual leve e outras características (55). A maioria dos pacientes com uma deleção sobreposta dessa região apresentava deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento de leve a grave, geralmente dependendo do tamanho e da posição da deleção (56-62).



Figura 11. Região 11q22.1q22.3 que inclui deleções representadas por barras vermelhas, do indivíduo 1 e dos casos do DECIPHER. Imagem elaborada utilizando o UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19).

O indivíduo 2 apresentava como principal característica fenotípica ambiguidade genital, e a análise do cariótipo revelou uma inversão pericêntrica no cromossomo X [46,X,inv(X)(p22.1q26)] (Figura 12) de origem *de novo*.



Figura 12. Cariótipo parcial do indivíduo 2 com inversão pericêntrica no cromossomo X [46,X,inv(X)(p22.1q26)].

A CMA revelou uma deleção de 1,3 Mb em Xp22.31, associada ao ponto de quebra do rearranjo [Xp22.31(6538033_7848224 – GRCh37)] (Figura 13) que foi classificada como patogênica e inclui apenas três genes: *PUDP*, *STS* e *VCX*. O gene *STS* apresenta um score 3 de haploinsuficiência e está relacionado à Ictiose ligada ao X, que é mais frequentemente observada em homens (63-65). Essa deleção também tem sido associada a distúrbios comportamentais e psiquiátricos em mulheres portadoras (66). Até o momento, a paciente não foi submetida a avaliação psiquiátrica. No entanto, a ambiguidade genital apresentada pela paciente não é compatível com o

fenótipo associado à deleção em Xp22.31. De acordo com as recomendações do ACMG, a classificação do desequilíbrio se mantém como patogênica, independente da correlação ou não com o fenótipo apresentado pelo paciente.



Figura 13. Gráfico de *Log2Ratio*, obtido por CMA, do cromossomo X, onde uma deleção de 1,3 Mb em Xp22.31(6538033_7848224 – GRCh37) está indicada dentro do quadro vermelho.

Dos indivíduos com desequilíbrios patogênicos ou provavelmente patogênicos, dois deles apresentaram desequilíbrios associados aos pontos de quebra e em outras regiões genômicas, ambos apresentando RCC. O indivíduo 3, com atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, apresentou um RCC *de novo*, envolvendo os cromossomos 1, 2, 3 e 20 [46,XX,der(1)(?::1p22 \rightarrow 1qter),der(2)(2pter \rightarrow 2q35::20q11.2 \rightarrow 20qter),der(3)(?::3 p12 \rightarrow 3qter),der(20)(20pter \rightarrow 20q11.2::?1p31::3p12 \rightarrow 3pter)] (Figura 14).



Figura 14. Cariótipo parcial do indivíduo 3 com RCC entre os cromossomos 1, 2, 3 e 20 [46,XX,der(1)(?::1p22 \rightarrow 1qter),der(2)(2pter \rightarrow 2q35: :20q11.2 \rightarrow 20qter),der(3)(?::3p12 \rightarrow 3qter),der(20)(20pter \rightarrow 20q11.2::?1p31::3p1 2 \rightarrow 3pter)].

O resultado da CMA não mostrou nenhum desequilíbrio nos cromossomos 1 e 2 (Figuras 15A e 15B). No entanto, foram encontradas duas deleções, de 539 kb q29 do uma na região cromossomo 3 [3q29(196358465_196897652 - GRCh37)] (Figura 15C), não associada ao ponto de quebra identificado no bandamento G, que foi classificada como provavelmente patogênica e inclui 10 genes. Entre eles, os genes PAK2 e DLG1, contidos em uma região estabelecida de haploinsuficiência score 3. Willatt e colaboradores (2005) sugerem que o PAK2 e o DLG1 podem estar relacionados a deficiência intelectual nos pacientes portadores da síndrome de microdeleção 3q29 (67).

A outra deleção, de 1,9 Mb em 20q13, associada a um dos pontos de quebra do rearranjo [20q13.31q13.32(56333749_58285282 – GRCh37)] (Figura 15D) foi classificada como patogênica e inclui 17 genes. Entre esses, o gene *GNAS* apresenta score 3 de haploinsuficiência, e está associado a diferentes fenótipos, dependendo da origem parental da deleção (68).



Figura 15. A: Gráfico de Log2Ratio, obtido por CMA, do cromossomo 1, mostrando ausência de desequilíbrios genômicos. B: Gráfico de Log2Ratio, obtido por CMA, do cromossomo 2, também mostrando ausência de desequilíbrios genômicos. C: Gráfico de Log2Ratio, obtido por CMA, do 3, mostrando uma delecão de 539 kb cromossomo em 3q29 (196358465_196897652 - GRCh37). D: Gráfico de Log2Ratio, obtido por CMA, do cromossomo 20, mostrando uma deleção de 1,9 Mb em 20q13.31q13.32 (56333749_58285282 - GRCh37).

O indivíduo 4 apresentou um RCC envolvendo os cromossomos 1, 8, 13, 18 e 21 [46,XX,t(1;8;13)(p31;p21;q32),t(13;18;21) (q14;q21.3;q22)] (Figura 16), em que a origem não foi confirmada devido ao não comparecimento do pai. As características fenotípicas apresentadas foram deficiência intelectual leve, dismorfismos faciais e em mãos e pés, e lúpus eritematoso sistêmico juvenil.



#1 der(1) #8 der(8) #13 der(13) #18 der(18) #21 der(21)

Figura 16. Cariótipo parcial do indivíduo 4 com RCC envolvendo os cromossomos 1, 8, 13, 18 e 21 [46,XX,t(1;8;13)(p31;p21;q32),t(13;18;21) (q14;q21.3;q22)].

A CMA não mostrou desequilíbrios genômicos nos cromossomos 1, 8 e 18 (Figuras 17A – 17C), no entanto revelou seis deleções relevantes: uma deleção de 3,6 Mb em p13.31 a p13.2 no cromossomo 12, não envolvido no rearranjo (Figura 17D); quatro deleções intersticiais no cromossomo 13, três na região proximal entre q14.3 e q21.33 com tamanhos de 584 kb a 9,2 Mb, e uma na região terminal, em q34, de 1,8 Mb; e uma deleção de 2 Mb em 21q22.3 (Figuras 17E e 17F).

A deleção de 3,6 Mb no cromossomo 12 [12p13.31p13.2(8680343_12302884 – GRCh37)] (Figura 17D), foi classificada como patogênica e inclui 62 genes, entre eles o gene *ETV6* que possui score 3 de haploinsuficiência e está associado a leucemia mieloide aguda e trombocitopenia (69), que não possui relação com o fenótipo apresentado.

Uma deleção no cromossomo 13, classificadas como VUS [13q21.2q21.33(605 46373_69732493-GRCh37)] (Figura 17E), inclui a deleção parcial do gene DIAPH3, que apresenta alguns preditores de haploinsuficiência e está associado a neuropatia auditiva autossômica dominante (70). Recentemente um estudo realizado por Labat-de-Hoz e Alonso (2021) relatou que mutações no gene DIAPH3 podem estar relacionadas a vários distúrbios, incluindo deficiência intelectual, doença renal, neuropatia periférica, trombocitopenia, insuficiência primária, auditiva ovariana perda е cardiomiopatia (71).

A deleção de 1,9 Mb no cromossomo 21 [21q22.3(45107096_47067181 – GRCh37)] (Figura 17F) classificada como provavelmente patogênica inclui 42 genes, incluindo os genes *ADARB1* e

TRAPPC10, que estão associados a distúrbios do neurodesenvolvimento (72,73). Entretanto, ambos possuem herança autossômica recessiva.



Figura 17. A, B e C: Gráfico de *Log2Ratio* obtido por CMA, demonstrando a ausência de desequilíbrios genômicos nos cromossomos 1, 8 e 18. **D:** Gráfico de *Log2Ratio* obtido por CMA, do cromossomo 12, mostrando uma deleção de 3,6 Mb em 12p13.31p13.2(8680343_12302884 – GRCh37). **E:** Gráfico de *Log2Ratio* obtido por CMA, do cromossomo 13, mostrando quatro deleções: 3,3 Mb, 584 kb, 9,1 Mb e 1,7 Mb nas seguintes regiões:

13q14.3q21.1(54515440_5791361-GRCh37); 13q21.1q21.2(59338843_599231 61-GRCh37); 13q21.2q21.33(6054 6373_69732493-GRCh37); 13q34(112806374_114580074-GRCh37). **F:** Gráfico de *Log2 Ratio* obtido por CMA, do cromossomo 21, mostrando uma deleção de 1,9 Mb em 21q22.3(45107096_47067181–GRCh37).

Entre os indivíduos com desequilíbrios apenas em outras regiões do genoma, o indivíduo 5, que tinha hipótese diagnóstica de Síndrome de Deleção 22q11.2 (SD22q11.2), apresentou uma translocação recíproca entre os cromossomos 3 e 16 [46,XX,t(3;16)(q23;p12)] (Figura 18) de origem paterna.



Figura 18. A: Cariótipo parcial do indivíduo 5 mostrando uma translocação entre os cromossomos 3 e 16 [46,XX,t(3;16)(q23;p12)]. **B:** Cariótipo do pai do indivíduo 5, mostrando a mesma translocação entre os cromossomos 3 e 16 [46,XX,t(3;16)(q23;p12)].

A CMA mostrou ausência de deseguilíbrios genômicos nos cromossomos envolvidos na translocação (Figuras 19A e 19B). Porém, a CMA deleção de Mb mostrou uma 2.9 no cromossomo 22 [22q11.21(18916842_21798907-GRCh37)] (Figura 19C) classificada como patogênica e compatível com o fenótipo da paciente (74), confirmando a suspeita diagnóstica. Na região deletada em 22g11.2 há 48 genes, incluindo o gene TBX1, principal gene apontado como responsável pela maioria das características clínicas da SD22q11.2. Além disso, essa deleção se sobrepõe a duas regiões estabelecidas de haploinsuficiência score 3.

Esta é a síndrome de deleção cromossômica mais comum em humanos e ocorre em aproximadamente 1:4.000 nascidos vivos (75-78). Entre as principais manifestações clínicas estão alterações cardíacas, renais e oculares, hipoparatireoidismo, defeitos esqueléticos e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (79,80).



Figura 19. A e B: Gráfico de *Log2Ratio* obtido por CMA, demonstrando ausência de desequilíbrios genômicos nos cromossomos 3 e 16. **C:** Gráfico de *Log2Ratio* obtido por CMA, do cromossomo 22, mostrando uma deleção de 1,9 Mb em [22q11.21(18916842_21798907-GRCh37)].

Entre os sete indivíduos para os quais não foram encontrados desequilíbrios genômicos, destacamos o indivíduo 14. Uma paciente do sexo feminino que apresenta deficiência intelectual, microcefalia, estereotipias motoras e marcha atáxica, e apresentou uma inserção entre os cromossomos 9 e 15 de origem materna [46,XX,ins(9;15)(q33;q21.1q22.31)] (Figura 20). A CMA não identificou nenhum desequilíbrio genômico relevante.

A investigação da família identificou outros cinco indivíduos com o mesmo rearranjo. No entanto, eles não apresentavam alterações fenotípicas. Além disso, foram identificados outros três indivíduos com rearranjo cromossômico desequilibrado, derivado da inserção. Esses apresentaram características fenotípicas semelhantes entre si, devido a uma duplicação de um segmento do cromossomo 15, decorrente do rearranjo desequilibrado.



Figura 20. A: Cariótipo parcial do indivíduo 14, demonstrando a inserção equilibrada entre os cromossomos 9 e 15 [ins(9;15)(q33;q21.1q22.31)]. **B:** Cariótipo da mãe do indivíduo 14, demonstrando a mesma inserção entre os cromossomos 9 e 15 [ins(9;15)(q33;q21.1q22.31)].

Utilizando o sequenciamento do exoma foi identificada uma deleção de 88 pb do gene *MECP2* (Figura 21), que foi classificada como patogênica, associada à Síndrome de Rett, e compatível com o fenótipo apresentado pela paciente. Sendo assim, é sugerido que outros eventos genéticos são responsáveis por alterações fenotípicas em indivíduos com RCEs herdados, onde o rearranjo não possui nenhuma relação com o fenótipo. Este relato de caso foi publicado recentemente (81).



Figura 21. Imagem retirada do Integrative Genome Viewer (IGV), mostrando uma deleção de 88 pb no éxon 3 do gene *MECP2* [chrX(153296091_153296179)—GRCh37)].

Em resumo, quanto ao tipo de rearranjo foram encontrados desequilíbrios genômicos patogênicos ou provavelmente patogênicos em uma

translocação (1/5), duas inversões (2/5) e dois RCCs (2/5). Quanto à origem parental, entre os seis indivíduos com rearranjo *de novo*, foram encontrados desequilíbrios genômicos em três. Porém, no indivíduo 07 foram encontradas apenas VUS, não relacionadas aos pontos de quebra, sendo que o rearranjo foi considerado realmente equilibrado.

Nos indivíduos com RCEs de novo, em que a CMA não foi conclusiva, é necessário a utilização de novas tecnologias, como o sequenciamento completo do genoma, para mapear os pontos de quebra do rearranjo, ou também sequenciamento de RNA e Hi-C, para identificar genes diferencialmente expressos, por um efeito posicional. Essas ferramentas podem ajudar na identificação de outros mecanismos relacionados ao fenótipo do paciente. Por exemplo, as interrupções de genes localizados nos pontos de quebra levaram à descoberta dos genes SUMO1 e ROBO2 como causadores de doença, por Alkuraya e colaboradores (2006) e Lu e colaboradores (2007), Eles estudaram pacientes respectivamente (82,83). com rearranjos cromossômicos equilibrados que interrompiam a sequência codificante desses genes, o que permitiu descobrir a relação dos mesmos com o desenvolvimento do palato e do trato urinário. Da mesma forma, o gene NBEA foi associado ao autismo após a descrição de um paciente com translocação equilibrada, onde um dos pontos de quebra interrompia a sequência do gene (84). Estudos recentes identificaram interrupções de genes em pacientes com RCEs e alterações fenotípicas em 21,3% a 33,9% dos casos (47,48).

Além da interrupção de genes, a interrupção de domínios topologicamente associados também já foi demonstrada, utilizando o método de Hi-C. Esses estudos mostraram que RCEs podem interromper TADs, provocando alterações na expressão gênica e consequências clínicas semelhantes aos casos em que esses genes apresentam deleções ou variantes de sequência (85,86). Redin e colaboradores (2017) e Lowther e colaboradores (2022) identificaram esse mecanismo como sendo responsável pela presença de alterações fenotípicas em cerca de 7,35% dos casos de indivíduos com RCEs (47,48).

Além desses, outros mecanismos também podem estar envolvidos nas manifestações fenotípicas, entre eles, a formação de genes quiméricos e distúrbios do *imprinting* genômico (38). Sendo assim, o uso de técnicas com resolução em nível de pb pode melhorar significativamente a investigação e conclusão diagnóstica para indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas, bem como gerar novas descobertas sobre os mecanismos patogênicos (47).

Entre os cinco indivíduos com RCE herdado, foram encontrados desequilíbrios genômicos em dois. Entretanto, ambos os desequilíbrios não estavam associados aos pontos de quebra, sendo um classificado como patogênico (indivíduo 05) e outro como VUS (indivíduo 06). Nos demais casos em que os RCEs herdados são de fato equilibrados, é recomendado que a investigação diagnóstica não seja dirigida para o mapeamento dos pontos de quebra, mas sim busque primariamente por outras causas genéticas, utilizando por exemplo sequenciamento do exoma.

Um estudo conduzido por Aristidou e colaboradores (2018) realizou o mapeamento dos pontos de quebra em portadores de RCEs herdados com fenótipos discordantes (87). Verificou-se que em ambos, paciente e genitor, com e sem alterações fenotípicas, respectivamente, os pontos de quebra dos rearranjos eram idênticos. Portanto, nestes casos outros eventos genéticos podem ser responsáveis pelas alterações fenotípicas e não o rearranjo cromossômico em si. Isso foi evidenciado para o indivíduo 14 deste estudo, no qual uma variante patogênica no gene *MECP2* foi identificada por sequenciamento completo do exoma, compatível com o fenótipo apresentado. Este gene está localizado no cromossomo X, que não está envolvido no rearranjo.

Entretanto, algumas situações excepcionais poderiam explicar fenótipos discordantes em casos herdados de RCEs. Uma delas poderia ser um rearranjo familiar interrompendo um gene com herança autossômica recessiva, sendo que a presença de fenótipos discrepantes pode ser explicada se o paciente com alterações fenotípicas for heterozigoto composto, com uma variante de sequência no outro alelo. Outros exemplos seriam a interrupção de um gene, em um dos pontos de quebra, com herança dominante e expressividade variável ou penetrância incompleta.

4.3. Revisão da literatura

Na revisão da literatura foram encontrados poucos estudos que investigaram desequilíbrios genômicos tanto em casos herdados como em casos *de novo* (Tabela 4).

Tabela 4. Lista de estudos que realizaram a investigação de desequilíbrios genômicos em indivíduos com rearranjos cromossômicos equilibrados herdados, com a presença de alterações fenotípicas.

Estudo	Plataforma de CMA	Nº de indivíduos	№ de indivíduos com rearranjos herdados
Satkin e colaboradores (2021) (43)	1.4M NimbleGen CGX-3/ 180k Agilent	21	7
Yakut e colaboradores (2017) (45)	135k NimbleGen CGX-3	15	4
Simioni e colaboradores (2017) (46)	SNP 6.0/750k Affymetrix	15	7
Tabet e colaboradores (2015) (44)	370k, 370-Duo Illumina	18	7
Lindstrand e colaboradores (2010) (88)	38k BAC, 244K or 180k oligo Agilent	9	2
Gijsbers e colaboradores (2010) (42)	262k Nspl, 238k Styl arrays Affymetrix and Illumina HumanHap300	13	4
Schluth-Bolard e colaboradores (2009) (29)	Agilent Human Genome CGH Microarray kit 244A® and 44K®	47	14
Sismani e colaboradores (2008) (38)	Cytochip Bluegnome 1 Mb	12	6
Higgins e colaboradores (2008) (41)	Agilent 244k/2600, BAC, Spectral Genomics	40	1
Total		190	52

Foram encontrados 13 trabalhos que realizaram CMA em indivíduos com RCEs (29,30,33,38-46,88). No total foram identificados 297 indivíduos com

RCEs e alterações fenotípicas e os resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Observou-se que os RCEs eram aparentemente equilibrados em cerca de 37% (110/297) dos casos, compatível com o que foi descrito em trabalhos anteriores e com o resultado obtido no presente estudo. Em relação aos tipos de rearranjos, eles estavam presentes em 31,5% (63/203) das translocações, 34,7% (17/49) das inversões, 40% (2/5) das inserções e em 67,5% (27/40) dos RCCs. De Gregori e colaboradores (2007) identificaram que os desequilíbrios genômicos são encontrados em cerca de 40% das translocações e na grande maioria dos RCCs (33).

 Tabela 5.
 Comparação de resultados de desequilíbrios genômicos através de estudos que realizaram a CMA por diferentes plataformas em indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas.

Estudo	Plataforma de CMA	IA Casos com desequilíbrios genômicos relevantes			vantes	Desequilíbrios em casos <i>de novo</i>	Desequilíbrios em casos herdados	
		Translocações	Inversões	Inserções	RCCs	Total		
Satkin e colaboradore s (2021) (43)	1.4M NimbleGen CGX-3/ 180k Agilent	1/9	1/4	-	5/8	7/21	7/14 (2 PQ+ORG; 2 PQ; 3 ORG)	0/7
Yakut e colaboradore s (2017) (45)	135k NimbleGen CGX-3	3/9	1/6	-	-	4/15	4/11 (1 PQ+ORG; 2 PQ; 1 ORG)	0/4
Simioni e colaboradore s (2017) (46)	SNP 6.0/750k Affymetrix	2/7	0/3	0/1	1/1	3/12	3/5 (1 PQ+ORG; 2 ORG)	0/7
Tabet e colaboradore s (2015) (44)	370k, 370-Duo Illumina	1/8	2/7	-	-	3/15	2/8 (1 PQ; 1 ORG)	1/7 (1 PQ+ORG)
Feenstra e colaboradore s (2011) (30)	32k BAC, 105k or 244k oligo Agilent or 250k SNP Affymetrix	11/40	0/6	1/1	1/3	13/50	13/50 (7 PQ; 6 ORG)	0/0
Lindstrand e colaboradore s (2010) (88)	38k BAC, 244K or 180k oligo Agilent	2/6	-	-	2/3	4/9	4/7 (3 PQ; 1 ORG)	0/2
Gijsbers e colaboradore	262k Nspl, 238k Styl arrays Affymetrix and	4/7	2/2	-	-	6/9	5/5 (1 PQ+ORG; 4	1/4

s (2010) (42)	Illumina HumanHap300						ORG)	(1 ORG)
Schluth- Bolard e colaboradore s (2009) (29)	Agilent Human Genome CGH Microarray kit 244A® and 44K®	9/28	6/12	-	5/7	20/47	16/33 (1 PQ+ORG; 7 PQ; 8 ORG)	4/14 (2 PQ; 2 ORG)
Sismani e colaboradore s (2008) (38)	Cytochip Bluegnome 1 Mb	3/12	-	-	-	3/12	2/6 (2 ORG)	1/6 (1 PQ)
Higgins e colaboradore s (2008) (41)	Agilent 244k/2600, BAC, Spectral Genomics	8/26	2/5	0/1	1/3	11/35	11/34 (2 PQ+ORG; 7 PQ; 2 ORG)	0/1
Baptista e colaboradore s (2008) (40)	Whole Genome Tilepath 30k	2/10	1/1	-	1/1	4/12	4/12 (2 PQ+ORG; 1 PQ; 1 ORG;)	0/0
de Gregori e colaboradore s (2007) (33)	44k or 244k oligo Agilent	11/27	-	1/1	10/11	22/39	22/39 (2 PQ+ORG; 12 PQ; 8 ORG)	0/0
Gribble e colaboradore s (2005) (39)	1 Mb BAC	5/8	-	-	0/2	5/10	5/10 (2 PQ; 3 ORG)	0/0
Esse estudo	750k Affymetrix	2/6	2/3	0/1	1/1	5/11	3/6 (1 PQ; 1PQ+ORG; 1 ORG)	2/5 (2 ORG)
Total		64/203	17/49	2/5	27/40	110/297	101/240	9/57

Dos 297 indivíduos analisados, 42% (101/240) dos casos com desequilíbrios genômicos apresentaram RCE *de novo*, enquanto em apenas 15,8% (9/57) dos casos com desequilíbrio o RCE era herdado. Esses resultados estão em conformidade com estudos anteriores, que indicam que os desequilíbrios genômicos são encontrados principalmente em casos *de novo*, e não em casos herdados. Por exemplo, Schluth-Bolard e colaboradores (2009) identificaram desequilíbrios em 48,5% (16/33) dos casos *de novo* e 28,6% (4/14) em casos herdados (29).

Quanto às regiões em que os desequilíbrios genômicos foram encontrados, nos casos *de novo*, em 44,5% (45/101) foram encontrados em regiões associadas aos pontos de quebra, 41,6% (42/101) apenas em outras regiões do genoma e 12,9% (13/101) em ambas as regiões (Figura 22). Nos casos herdados, em apenas 2/9, os desequilíbrios estavam associados aos pontos de quebra. Em um desses casos, o rearranjo cromossômico e o desequilíbrio genômico eram herdados, e o fenótipo também segregou na família. Assim, neste caso o desequilíbrio estava associado ao rearranjo e explicava o fenótipo dos portadores (38). No outro caso, o RCE e o desequilíbrio genômico também foram herdados, entretanto, de um pai fenotipicamente normal, sugerindo que o desequilíbrio no ponto de quebra não foi unicamente responsável pelas alterações fenotípicas nesse indivíduo (29).

Em 6/9 dos casos herdados os pontos de quebra estavam em outras regiões do genoma. E em apenas 1/9 os desequilíbrios foram encontrados em ambas as regiões, associado aos pontos de quebra e em outras regiões do genoma.



Figura 22. Representação gráfica das regiões genômicas em que foram encontrados os desequilíbrios genômicos em indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos equilibrados de origem *de novo* ou herdada.

Em termos de número de indivíduos investigados, os casos herdados representaram apenas 27,4% (52/190), o que se deve à baixa taxa de detecção de desequilíbrios genômicos nesses casos. Schluth-Bolard e colaboradores (2009) demonstraram que tanto para casos de RCEs herdados quanto para casos *de novo*, foram identificados desequilíbrios genômicos por meio de CMA (29). No entanto, para a grande maioria dos casos herdados, não se chegou a uma conclusão diagnóstica e, portanto, essa abordagem não parece ser custo-efetiva, devido à baixa taxa de diagnósticos.

5. Conclusões

A análise retrospectiva de todos os exames de cariótipo, realizados no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, revelou 151 indivíduos com rearranjos cromossômicos equilibrados:

- 42/151 (27,8%) apresentaram alterações fenotípicas.
- Em 16 casos a alteração era *de novo*, em 62 herdada, e em 73 a investigação parental não foi concluída.
- Foram encontrados apenas 4/151 (2,6%) rearranjos cromossômicos complexos.

Entre 14 indivíduos com RCEs e alterações fenotípicas, para os quais foi realizada a CMA, foram encontrados desequilíbrios genômicos patogênicos ou provavelmente patogênicos em cinco (35,7%):

- Entre os casos com RCE *de novo,* foram encontrados desequilíbrios associados aos pontos de quebra em um caso, em outras regiões genômicas em um caso, e em ambas as regiões em um caso.
- Entre os casos com RCE herdado, foram encontrados desequilíbrios apenas em outras regiões genômicas em dois casos.

Os resultados obtidos nesse estudo e os resultados encontrados na revisão da literatura mostraram que a grande maioria dos desequilíbrios são encontrados em casos com RCEs *de novo* e nos RCCs. Já nos casos herdados a grande maioria dos desequilíbrios estão presentes em outras regiões do genoma, sugerindo que desequilíbrios associados aos pontos de quebra nesses casos não são uma causa comum do fenótipo.

6. Referências

1. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. PLoS Genet [Internet]. 30 de dezembro de 2005 [citado 12 de fevereiro de 2023];1(6):e49. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16444292/

2. Nussbaum R, McInnes R, Willard H. Thom & Thom Genetics in medicine. Journal of Kathmandu Medical College. 2016;512.

3. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat Rev Genet [Internet]. abril de 2001 [citado 5 de abril de 2023];2(4):280–91. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283700/

4. Kaiser-Rogers K, Rao KW. Structural chromosome rearrangements. The Principles of Clinical Cytogenetics, Third Edition [Internet]. 10 de janeiro de 2013 [citado 4 de abril de 2023];139–74. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-1688-4_9

5. Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG. Gametogenesis and Conception, Pregnancy Loss and Infertility. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling [Internet]. 10 de novembro de 2011 [citado 5 de março de 2023];377–400. Disponível em: https://academic.oup.com/book/25214/chapter/189686813

 Forabosco A, Percesepe A, Santucci S. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses. Eur J Hum Genet [Internet]. 2009 [citado 15 de março de 2023];17(7):897–903. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19156167/

7. Pettenati MJ, Rao PN, Phelan MC, Grass F, Rao KW, Cosper P, et al. Paracentric inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. Am J Med Genet [Internet]. 1995 [citado 7 de abril de 2023];55(2):171–87. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7717416/

8. Neill NJ, Ballif BC, Lamb AN, Parikh S, Ravnan JB, Schultz RA, et al. Recurrence, submicroscopic complexity, and potential clinical relevance of copy

gains detected by array CGH that are shown to be unbalanced insertions by FISH. Genome Res [Internet]. abril de 2011 [citado 22 de maio de 2022];21(4):535–44. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21383316/

9. Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hédon B, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. Hum Reprod Update [Internet]. 1o de julho de 2011 [citado 5 de abril de 2023];17(4):476–94. Disponível em: https://academic.oup.com/humupd/article/17/4/476/831801

10. Madan K, Nieuwint AWM, Van Bever Y. Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. Hum Genet [Internet]. junho de 1997 [citado 5 de abril de 2023];99(6):806–15. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9187678/

11. Michaelson-Cohen R, Murik O, Zeligson S, Lobel O, Weiss O, Picard E, et al. Combining cytogenetic and genomic technologies for deciphering challenging complex chromosomal rearrangements. Molecular Genetics and Genomics [Internet]. 10 de julho de 2022 [citado 21 de abril de 2023];297(4):925–33. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00438-022-01898-y

12. F. Pellestor Chromoanagenesis: cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. Mol Cytogenet [Internet]. 11 de fevereiro de 2019 **[citado** 7 de abril de 2023];12(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30805029/

13. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics [Internet]. dezembro de 2008 [citado 12 de fevereiro de 2023];1(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19014668/

14. Carvalho CMB, Lupski JR. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. Nat Rev Genet [Internet]. 1o de abril de 2016 [citado 19 de março de 2023];17(4):224. Disponível em: /pmc/articles/PMC4827625/
15. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. Trends in Genetics. 10 de fevereiro de 2002;18(2):74–82.

16. Lupski JR, Stankiewicz P. GENOMIC DISORDERS The Genomic Basis of Disease. 2006 [citado 1o de março de 2023]; Disponível em: www.humanapress.com

17. Schwarz K, Ma Y, Pannicke U, Lieber MR. Human severe combined immune deficiency and DNA repair. Bioessays [Internet]. novembro de 2003 [citado 10 de março de 2023];25(11):1061–70. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14579247/

18. Weterings E, Van Gent DC. The mechanism of non-homologous endjoining: A synopsis of synapsis. DNA Repair (Amst) [Internet]. 2 de novembro de 2004 [citado 1o de março de 2023];3(11):1425–35. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15380098/

19. Ottaviani D, LeCain M, Sheer D. The role of microhomology in genomic structural variation. Trends Genet [Internet]. março de 2014 [citado 7 de abril de 2023];30(3):85–94. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24503142/

20. Mehrabi R, Mirzadi Gohari A, Kema GHJ. Karyotype Variability in Plant-Pathogenic Fungi. Annu Rev Phytopathol [Internet]. 4 de agosto de 2017 [citado 18 de abril de 2023];55:483–503. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28777924/

21. Lee JA, Carvalho CMB, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders.
Cell [Internet]. 28 de dezembro de 2007 [citado 10 de março de 2023];131(7):1235–47. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18160035/

22. Burssed B, Zamariolli M, Bellucco FT, Melaragno MI. Mechanisms of structural chromosomal rearrangement formation. Mol Cytogenet [Internet]. 10 de dezembro de 2022 [citado 19 de março de 2023];15(1). Disponível em: /pmc/articles/PMC9199198/

23. Holland AJ, Cleveland DW. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. Nat

Med [Internet]. novembro de 2012 [citado 7 de abril de 2023];18(11):1630–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23135524/

24. Brás A, Rodrigues AS, Rueff J. Copy number variations and constitutional chromothripsis (Review). Biomed Rep [Internet]. 2020 [citado 7 de abril de 2023];13(3):1–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32765850/

25. Hattori A, Fukami M. Established and Novel Mechanisms Leading to de novo Genomic Rearrangements in the Human Germline. Cytogenet Genome Res [Internet]. 10 de julho de 2020 [citado 7 de abril de 2023];160(4):167–76. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32396893/

26. Ly P, Cleveland DW. Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. Trends Cell Biol [Internet]. 10 de dezembro de 2017 [citado 7 de abril de 2023];27(12):917–30. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28899600/

27. Nazaryan-Petersen L, Bjerregaard VA, Nielsen FC, Tommerup N, Tümer Z. Chromothripsis and DNA Repair Disorders. J Clin Med [Internet]. 10 de março de 2020 [citado 7 de abril de 2023];9(3). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32106411/

28. Zepeda-Mendoza CJ, Morton CC. The Iceberg under Water: Unexplored Complexity of Chromoanagenesis in Congenital Disorders. Am J Hum Genet [Internet]. 4 de abril de 2019 [citado 7 de abril de 2023];104(4):565. Disponível em: /pmc/articles/PMC6451730/

29. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. Eur J Med Genet [Internet]. 2009 [citado 23 de maio de 2022];52(5):291–6. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19505601/

30. Feenstra I, Hanemaaijer N, Sikkema-Raddatz B, Yntema H, Dijkhuizen T, Lugtenberg D, et al. Balanced into array: genome-wide array analysis in 54 patients with an apparently balanced de novo chromosome rearrangement and a meta-analysis. Eur J Hum Genet [Internet]. novembro de 2011 [citado 23 de

maio de 2022];19(11):1152–60. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21712853/

31. Franssen MTM, Korevaar JC, Van Der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PMM, Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. BMJ [Internet]. 10 de abril de 2006 [citado 3 de maio de 2023];332(7544):759–62. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16495333/

32. Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. J Med Genet [Internet]. 1992 [citado 15 de março de 2023];29(2):103–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1613759/

33. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, et al. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. J Med Genet [Internet]. dezembro de 2007 [citado 23 de maio de 2022];44(12):750. Disponível em: /pmc/articles/PMC2652810/

34. Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. Am J Hum Genet [Internet]. 1991 [citado 1o de fevereiro de 2023];49(5):995. Disponível em: /pmc/articles/PMC1683246/?report=abstract

35. Schluth-Bolard C, Labalme A, Cordier MP, Till M, Nadeau G, Tevissen H, et al. Breakpoint mapping by next generation sequencing reveals causative gene disruption in patients carrying apparently balanced chromosome rearrangements with intellectual deficiency and/or congenital malformations. J Med Genet [Internet]. 2013 [citado 23 de maio de 2022];50(3):144–50. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23315544/

36. Tharapel AT, Summitt RL, Wkroy RS, Martens P. Apparently balanced de novo translocations in patients with abnormal phenotypes: report of 6 cases.

Clin Genet [Internet]. 1977 [citado 3 de maio de 2023];11(4):255–69. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/856508/

37. Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, et al. Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. Am J Hum Genet [Internet]. 2001 [citado 5 de abril de 2023];69(2):261–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11431708/

38. Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, et al. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. 2008; Disponível em: http://www.molecularcytogenetics.org/content/1/1/15

39. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. J Med Genet [Internet]. janeiro de 2005 [citado 23 de maio de 2022];42(1):8. Disponível em: /pmc/articles/PMC1735914/?report=abstract

40. Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, et al. Breakpoint Mapping and Array CGH in Translocations: Comparison of a Phenotypically Normal and an Abnormal Cohort. Am J Hum Genet [Internet]. 4 de abril de 2008 [citado 23 de maio de 2022];82(4):927. Disponível em: /pmc/articles/PMC2427237/

41. Higgins AW, Alkuraya FS, Bosco AF, Brown KK, Bruns GAP, Donovan DJ, et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. Am J Hum Genet [Internet]. 3 de março de 2008 [citado 11 de janeiro de 2023];82(3):712–22. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18319076/

42. Gijsbers ACJ, Bosch CAJ, Dauwerse JG, Giromus O, Hansson K, Hilhorst-Hofstee Y, et al. Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. Eur J Med Genet [Internet]. setembro de 2010 [citado 23 de maio de 2022];53(5):227–33. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20542150/ 43. Satkin PB, Karaman B, Ergin S, Kayserili H, Kalelioglu IH, Has R, et al. Array-comparative genomic hybridization results in clinically affected cases with apparently balanced chromosomal rearrangements. Balkan Journal of Medical Genetics. 23 de março de 2021;23(2):25–34.

44. Tabet AC, Verloes A, Pilorge M, Delaby E, Delorme R, Nygren G, et al. Complex nature of apparently balanced chromosomal rearrangements in patients with autism spectrum disorder. Mol Autism [Internet]. 25 de março de 2015 [citado 3 de maio de 2023];6(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25844147/

45. Yakut S, Cetin Z, Altiok Clark O, Guzel Nur B, Mihci E, Berker Karauzum S. Associations between the clinical findings of cases having submicroscopic chromosomal imbalances at chromosomal breakpoints of apparently balanced structural rearrangements. Gene Rep. 10 de junho de 2017;7:50–8.

46. Simioni M, Artiguenave F, Meyer V, Sgardioli IC, Viguetti-Campos NL, Lopes Monlleó I, et al. Genomic Investigation of Balanced Chromosomal Rearrangements in Patients with Abnormal Phenotypes. Mol Syndromol [Internet]. 10 de junho de 2017 [citado 23 de maio de 2022];8(4):187–94. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28690484/

47. Redin C, Brand H, Collins RL, Kammin T, Mitchell E, Hodge JC, et al. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. Nat Genet. 2017;49(1).

Lowther C, Mehrjouy MM, Collins RL, Bak MC, Dudchenko O, Brand H, 48. et al. Balanced chromosomal rearrangements offer insights into coding and noncoding genomic features associated with developmental disorders. medRxiv [Internet]. 16 de fevereiro de 2022 [citado 17 de abril de 2023];2022.02.15.22270795. Disponível em: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.02.15.22270795v1

49. Chatterjee S, Ahituv N. Gene Regulatory Elements, Major Drivers of Human Disease. Annu Rev Genomics Hum Genet [Internet]. 31 de agosto de 2017 [citado 21 de abril de 2023];18:45–63. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28399667/ 50. Fisher Scientific T. CytoScan Assay Manual Workflow (8 Samples) Quick reference (Pub. No. 703039 Rev. 6).

51. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. 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 [Internet]. 10 de fevereiro de 2020 [citado 18 de abril de 2023];22(2):245–57. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31690835/

52. Alterações genéticas: Glossário de genética III - Blog Mendelics [Internet]. [citado 7 de maio de 2023]. Disponível em: https://blog.mendelics.com.br/glossario-de-genetica-parte-3/

53. Williamson KA, Rainger J, Floyd JAB, Ansari M, Meynert A, Aldridge K V., et al. Heterozygous Loss-of-Function Mutations in YAP1 Cause Both Isolated and Syndromic Optic Fissure Closure Defects. Am J Hum Genet [Internet]. 6 de fevereiro de 2014 [citado 11 de junho de 2023];94(2):295–302. Disponível em: https://www.research.ed.ac.uk/en/publications/heterozygous-loss-of-function-mutations-in-yap1-cause-both-isolat

54. Martin S, Chamberlin A, Shinde DN, Hempel M, Strom TM, Schreiber A, et al. De Novo Variants in GRIA4 Lead to Intellectual Disability with or without Seizures and Gait Abnormalities. Am J Hum Genet [Internet]. 7 de dezembro de 2017 [citado 4 de maio de 2023];101(6):1013–20. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29220673/

55. Krgovic D, Marcun Varda N, Zagorac A, Kokalj-Vokac N. Submicroscopic interstitial deletion of chromosome 11q22.3 in a girl with mild mental retardation and facial dysmorphism: Case report. Mol Cytogenet [Internet]. 2011 [citado 4 de maio de 2023];4(1):17. Disponível em: /pmc/articles/PMC3170628/

56. Hertz JM, Tommerup N, Sørensen FB, Henriques U V., Nielsen A, Therkelsen AJ. Partial deletion 11q: report of a case with a large terminal deletion 11q21-qter without loss of telomeric sequences, and review of the literature. Clin Genet [Internet]. 1995 [citado 4 de maio de 2023];47(5):231–5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7554347/

57. Hori T aki, Masuno M, Wakazono A, Takahashi E ichi, Katakura R, Orii T. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 11 determined by fluorescence in situ hybridization. Jpn J Hum Genet [Internet]. junho de 1993 [citado 4 de maio de 2023];38(2):219–24. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8358045/

58. Klep-de Pater JM, De France HF, Bijlsma JB. Interstitial deletion of the long arm of chromosome 11. J Med Genet [Internet]. 1985 [citado 4 de maio de 2023];22(3):224–6. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4009645/

59. McPherson E, Meissner L. 11q-syndrome: review and report of two cases. Birth Defects Orig Artic Ser [Internet]. 1o de janeiro de 1982 [citado 4 de maio de 2023];18(3B):295–300. Disponível em: https://europepmc.org/article/med/7139112

60. Ono J, Hasegawa T, Sugama S, Sagehashi N, Hase Y, Oku K, et al. Partial deletion of the long arm of chromosome 11: ten Japanese children. Clin Genet [Internet]. 1996 [citado 4 de maio de 2023];50(6):474–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9147876/

61. Sachdeva R, Sears JE, Rychwalski PJ. A novel case of bilateral high myopia, cataract, and total retinal detachment associated with interstitial 11q deletion. Ophthalmic Genet [Internet]. junho de 2010 [citado 4 de maio de 2023];31(2):84–8. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20450311/

62. Syrrou M, Fryns JP. Interstitial deletion of chromosome 11 (q22.3-q23.2) in a boy with mild developmental delay. J Med Genet [Internet]. 2001 [citado 4 de maio de 2023];38(9):621–4. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11565549/

63. Alperin ES, Shapiro LJ. Characterization of point mutations in patients with X-linked ichthyosis. Effects on the structure and function of the steroid sulfatase protein. J Biol Chem [Internet]. 15 de agosto de 1997 [citado 4 de maio de 2023];272(33):20756–63. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9252398/

64. Shapiro LJ, Yen P, Pomerantz D, Martin E, Rolewic L, Mohandas T. Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1989 [citado 4 de maio de 2023];86(21):8477–81. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2813406/

65. Valdes-Flores M, Kofman-Alfaro SH, Jimenez Vaca AL, Cuevas-Covarrubias SA. Mutation report: a novel partial deletion of exons 2-10 of the STS gene in recessive X-linked ichthyosis. J Invest Dermatol [Internet]. 2000 [citado 4 de maio de 2023];114(3):591–3. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692123/

66. Cavenagh A, Chatterjee S, Davies W. Behavioural and psychiatric phenotypes in female carriers of genetic mutations associated with X-linked ichthyosis. PLoS One [Internet]. 10 de fevereiro de 2019 [citado 4 de maio de 2023];14(2). Disponível em: /pmc/articles/PMC6377116/

67. Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, Donnai D, et al. 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. Am J Hum Genet [Internet]. 2005 [citado 4 de maio de 2023];77(1):154–60. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15918153/

68. Linglart A, Maupetit-Méhouas S, Silve C. GNAS -Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. Horm Res Paediatr [Internet]. 2013 [citado 4 de maio de 2023];79(3):119–29. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23548772/

69. Stegmaier K, Pendse S, Barker GF, Bray-Ward P, Ward DC, Montgomery KT, et al. Frequent Loss of Heterozygosity at the TEL Gene Locus in Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood. Blood. 10 de julho de 1995;86(1):38–44.

70. Sánchez-Martínez A, Benito-Orejas JI, Tellería-Orriols JJ, Alonso-Ramos MJ. Autosomal dominant auditory neuropathy and variant DIAPH3 (c.-173C>T). Acta Otorrinolaringol Esp [Internet]. 10 de maio de 2017 [citado 5 de maio de 2023];68(3):183–5. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27658576/

71. Labat-de-hoz L, Alonso MA. Formins in Human Disease. Cells [Internet].
10 de outubro de 2021 [citado 7 de maio de 2023];10(10). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34685534/

72. Santos-Cortez RLP, Khan V, Khan FS, Mughal Z un N, Chakchouk I, Lee K, et al. Novel candidate genes and variants underlying autosomal recessive neurodevelopmental disorders with intellectual disability. Hum Genet [Internet]. 10 de setembro de 2018 [citado 5 de maio de 2023];137(9):735–52. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30167849/

73. Tan TY, Sedmík J, Fitzgerald MP, Halevy RS, Keegan LP, Helbig I, et al. Bi-allelic ADARB1 Variants Associated with Microcephaly, Intellectual Disability, and Seizures. Am J Hum Genet [Internet]. 2020 Apr 2 [cited 2023 May 5];106(4):467–83. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32220291/

74. Sgardioli IC, De Mello Copelli M, Monteiro FP, Dos Santos AP, Lustosa Mendes E, Paiva Vieira T, et al. Diagnostic Approach to Microdeletion Syndromes Based on 22q11.2 Investigation: Challenges in Four Cases. Mol Syndromol [Internet]. 10 de agosto de 2017 [citado 7 de maio de 2023];8(5):244–52. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28878608/

75. Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, Van Thienen MN, Keymolen K. The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. J Med Genet [Internet]. 10 de setembro de 1998 [citado 5 de maio de 2023];35(9):789–90. Disponível em: https://jmg.bmj.com/content/35/9/789.2

76. Du Montcel ST, Mendizabal H, Ayme S, Levy A, Philip N. Prevalence of
22q11 microdeletion. J Med Genet [Internet]. 1o de agosto de 1996 [citado 5 de
maio de 2023];33(8):719–719. Disponível em:
https://jmg.bmj.com/content/33/8/719.1

77. Goodship J, Cross I, Liling J, Wren C. A population study of chromosome 22q11 deletions in infancy. Arch Dis Child [Internet]. 10 de outubro de 1998 [citado 5 de maio de 2023];79(4):348–51. Disponível em: https://adc.bmj.com/content/79/4/348

78. Óskarsdóttir S, Vujic M, Fasth A. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. Arch Dis

Child [Internet]. 10 de fevereiro de 2004 [citado 5 de maio de 2023];89(2):148– 51. Disponível em: https://adc.bmj.com/content/89/2/148

79. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. The Lancet. 20 de outubro de 2007;370(9596):1443–52.

80. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JAS, et al. 22q11.2 deletion syndrome. Nature Reviews Disease Primers 2015 1:1 [Internet]. 19 de novembro de 2015 [citado 5 de maio de 2023];1(1):1–19. Disponível em: https://www.nature.com/articles/nrdp201571

81. Nascimento CG, Prota JRM, Sgardioli IC, Spineli-Silva S, Campos NLV, Gil-da-Silva-Lopes VL, et al. Rare 15q21.1q22.31 Duplication Due to a Familial Chromosomal Insertion and Diagnostic Investigation in a Carrier of Balanced Chromosomal Rearrangement and Intellectual Disability. Genes 2023, Vol 14, Page 885 [Internet]. 9 de abril de 2023 [citado 18 de abril de 2023];14(4):885. Disponível em: https://www.mdpi.com/2073-4425/14/4/885/htm

82. Alkuraya FS, Saadi I, Lund JJ, Turbe-Doan A, Morton CC, Maas RL. SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. Science [Internet]. 22 de setembro de 2006 [citado 5 de maio de 2023];313(5794):1751. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16990542/

83. Lu W, Van Eerde AM, Fan X, Quintero-Rivera F, Kulkarni S, Ferguson H, et al. Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. Am J Hum Genet [Internet]. 2007 [citado 5 de maio de 2023];80(4):616–32. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17357069/

84. Castermans D, Wilquet V, Parthoens E, Huysmans C, Steyaert J, Swinnen L, et al. The neurobeachin gene is disrupted by a translocation in a patient with idiopathic autism. J Med Genet [Internet]. 10 de maio de 2003 [citado 5 de maio de 2023];40(5):352–6. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12746398/

85. Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of

gene-enhancer interactions. Cell [Internet]. 30 de maio de 2015 [citado 5 de maio de 2023];161(5):1012–25. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25959774/

86. Franke M, Ibrahim DM, Andrey G, Schwarzer W, Heinrich V, Schöpflin R, et al. Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. Nature [Internet]. 2016 [citado 5 de maio de 2023];538(7624):265–9. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27706140/

87. Aristidou C, Theodosiou A, Ketoni A, Bak M, Mehrjouy MM, Tommerup N, et al. Cryptic breakpoint identified by whole-genome mate-pair sequencing in a rare paternally inherited complex chromosomal rearrangement. Mol Cytogenet [Internet]. 7 de junho de 2018 [citado 17 de janeiro de 2023];11(1). Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29930709/

88. Lindstrand A, Schoumans J, Gustavsson P, Hanemaaijer N, Malmgren H, Blennow E. Improved structural characterization of chromosomal breakpoints using high resolution custom array-CGH. Clin Genet [Internet]. junho de 2010 [citado 12 de janeiro de 2023];77(6):552–62. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20236111/

7.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de rearranjos cromossômicos equilibrados e rearranjos cromossômicos complexos em indivíduos com alterações fenotípicas

Pesquisador: Társis Antonio Paiva Vieira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 47887221.5.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Medicas - UNICAMP Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.042.235

Apresentação do Projeto:

RESUMO

As anomalias cromossômicas estruturais equilibradas envolvem o rearranjo da estrutura cromossômica que altera a orientação ou a localização de um segmento genômico. Esses rearranjos equilibrados podem ser inversões, translocações ou inserções. Eles podem envolver um ou mais cromossômicos equilibrdos também podem ser encontrados em indivíduos com fenótipo anormal. Em uma parte desses casos (cerca de 30%) podem ocorrer perdas e ganhos de segmentos genômicos associados aos pontos de quebra. Mesmo que os rearranjos sejam realmente equilibrados o fenótipo ainda pode estar associado ao rearranjo, quando este ocasiona a interrupção de genes ou de seus elementos reguladores, decorrente aos pontos de quebra gerados pelo rearranjo, ou também devido ao efeito de posição. Sendo assim, o objetivo principal deste projeto é investigar desequilíbrios genômicos em indivíduos que apresentam rearranjos cromossômicos equilibrados com a presença de fenótipo alterado. Para isso, será realizada a revisão dos casos de indivíduos que apresentam rearranjos estruturais equilibrados no Laboratório de Citogenética Humana da Unicamp nos últimos 30 anos. Destes, serão selecionados cerca de 10 indivíduos com fenótipo alterado e rearranjo cromossômico aparentemente equilibrado para a

Endereço:	Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1º andar	r do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: B	arão Geraldo	CEP:	13.083-887
UF: SP	Município:	CAMPINAS	
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br

Página 01 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

realização de análise cromossômica por microarray (CMA). A aplicação da técnica de CMA nestes casos permitirá a identificação de microdeleções ou microduplicações que estejam associadas às alterações fenotípicas observadas e permitirá a conclusão diagnóstica e o aconselhamento genético em parte dos indivíduos portadores destes rearranjos.

INTRODUÇÃO

As anomalias cromossômicas são responsáveis por variadas disfunções do indivíduo portador, decorrentes das alterações na molécula de DNA, afetando cromossomos autossomos, sexuais ou ambos. Podem se apresentar de duas maneiras, as anomalias numéricas, podendo ser uma alteração em um único par cromossômico, denominada de aneuploidia, tendo como exemplo a monossomia (45, X), a triploidia (47, XY +21), dentre outras, e as alterações no número total de cromossomos, como exemplo a triploidia (3n) e a tetraploidia (4n). Também podem estar presentes no material genético as anomalias estruturais, onde a quantidade do material genético se mantém, porém, ocorre o rearranjo dos segmentos cromossômicos (1-2). As anomalias estruturais são consequências da reconstituição anormal de cromossomos, que sofreram quebras no DNA. O reparo dessas quebras ocorre por diferentes mecanismos de reparo para as quebras, que ocorrem durante a formação dos rearranjos cromossômicos, sendo eles, os principais, a recombinação homóloga não alélica (Non Alleic Homologous Recombination - NAHR), que é responsável pela formação dos rearranjos cromossômicos desequilibrados, onde dois fragmentos de DNA, que não são alelos, se unem por apresentar similaridade entre si, podendo resultar em deleções, duplicações e inversões (3-4-5). A junção de extremidades não homólogas (Non-Homologous End Joining - NHEJ) é a via que possui a função de reconhecer e conectar as extremidades onde ocorreu a quebra de DNA, fazendo com que as extremidades se unam através da adição ou perda de alguns pares de bases (6-7). E o bloqueio da forquilha de replicação e mudança de fita molde de DNA (Fork Stalling and Template Switcching - FoSTeS), guando a mudança da fita molde não está presente em apenas uma forquilha de replicação, mas em outras diferentes forquilhas que possuem microhomologia, podendo resultar em deleções, inversões ou translocações, sendo um 7 dos principais mecanismos de duplicação de DNA incorreta (8-9). Sendo assim, as anomalias cromossômicas estruturais são divididas em rearranjos equilibrados quando não ocorre perda nem ganho do material genético e rearranjos deseguilibrados, guando ocorre perda ou ganho de material genético, tendo como consequência, trissomias ou monossomias parciais (10). Dentre os rearranjos desequilibrados existem as deleções, que envolvem a perda de um segmento cromossômico, podendo ser terminal ou intersticial, e as duplicações, uma vez que o mesmo segmento cromossômico se encontra duas vezes no mesmo

Endereç	o: Rua Tessália Vieira o	le Camargo, 126, 1° andar d	do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas	
Bairro:	Barão Geraldo	CEP:	13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPINAS		
Telefone	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br	

Página 02 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

cromossomo e no mesmo locus. Também são rearranjos desequilibrados os cromossomos em anel, que se formam quando o cromossomo sofre duas quebras perdendo suas regiões teloméricas, sendo assim as duas extremidades quebradas se unem em estrutura de anel; os isocromossomos, onde um dos braços está ausente e o outro duplicado. Os isocromossomos também podem ser isodicêntricos, que apresentam dois centrômeros em um único cromossomo (11). Sendo assim, devido ao desequilíbrio genômico causado por rearranjos deseguilibrados, seus portadores apresentam anomalias fenotípicas na grande maioria das vezes (10). Já as anomalias cromossômicas estruturais equilibradas envolvem o rearranjo da estrutura cromossômica que altera a orientação ou a localização de um segmento genômico. Elas podem envolver um ou mais cromossomos e seus portadores apresentam fenótipo normal em 90 a 95% dos casos (12-13-14). Desse modo, os rearranjos equilibrados podem ser dos seguintes tipos: inversões, onde o segmento sofre uma inversão de posição, podendo ser paracêntricas, aquelas que não incluem o centrômero tendo duas quebras em um mesmo braço cromossômico, e pericêntricas, que incluem o centrômero, tendo uma quebra em cada braço cromossômico. Translocações, que envolvem trocas de segmentos entre cromossomos não homólogos, apresentando 8 duas principais formas, as recíprocas, onde ambos os cromossomos não homólogos realizam trocas entre eles, porém o conteúdo genômico permanece inalterado; e a translocação Robertsoniana, que envolve cromossomos acrocêntricos, de modo que realizam a fusão de seus centrômeros devido à perda dos braços curtos. As inserções, que não são recíprocas, onde um cromossomo apresenta a perda de um segmento, que é inserido em outro cromossomo, podendo ser de forma direta ou indireta (15). Além desses principais tipos de rearranjos equilibrados, alguns rearranjos podem apresentar mais de três pontos de quebra presentes e são chamados de rearranjos cromossômicos complexos (CCRs) (16). Os rearranjos equilibrados na maioria dos casos, podem não estar associados a alterações fenotípicas, entretanto podem acarretar redução de fertilidade, e também aumentam a probabilidade de gerar uma prole fenotipicamente afetada devido a um rearranjo deseguilibrado (24). Por outro lado, os rearranjos equilibrados podem estar associados a fenótipos anormais em cerca de 7% dos casos. Esses podem manifestar malformações congênitas múltiplas ou deficiência intelectual (17). Também pode estar presente em indivíduos com transtorno do espectro autista, em 1,3% dos casos (18). Grande parte dos rearranjos estruturais equilibrados são herdados de um dos genitores, onde ocorre a transmissão na forma equilibrada para os descendentes (19). Porém, aproximadamente um em cada cinco indivíduos apresenta o rearranjo de novo, ou seja, os pais possuem cariótipo normal. Esse rearranjo de novo possui um risco de 6,1% em gerar um fenótipo anormal nos portadores (20). Estudos por análise cromossômica por microarray (CMA) mostraram

Endereç	o: Rua Tessália Vieira d	de Camargo, 126, 1° anda	r do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas	
Bairro:	Barão Geraldo	CEP	13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPINAS		
Telefone	: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br	

Página 03 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

que uma proporção destes casos não é realmente equilibrada, mas possui uma microdeleção ou microduplicação associada a um dos pontos de quebra. Nos últimos anos, essa técnica tem sido utilizada para a investigação de rearranjos aparentemente equilibrados em indivíduos com fenótipo anormal, e diferentes trabalhos encontraram desequilíbrios genômicos em 30 a 50% dos indivíduos estudados (17,20). Além de perdas e ganhos de segmentos genômicos associados aos pontos de quebra; o fenótipo também pode estar associado ao rearranjo, quando este ocasiona a interrupção de genes ou de seus elementos reguladores, decorrente aos pontos de quebras gerados pelo rearranjo, ou também devido ao efeito de posição(21), onde o rearranjo pode separar o gene de seu elemento regulador ou aproximá-lo de uma região reguladora de outro gene (10). Há uma maior proporção de interrupção de genes nos rearranjos que acometem indivíduos com rearranjos associados a quadros clínicos do que indivíduos clinicamente normais (20). Além disso, pode ocorrer a interrupção de domínios topológicos associados (Topologically Associating Domain - TADs), esses domínios apresentam alta interação no genoma, sendo assim o rearranjo estrutural resulta em impactos na expressão gênica (22). A identificação dos pontos de quebra desses rearranjos aparentemente equilibrados permite caracterizar os genes associados aos guadros clínicos. Para a caracterização desses rearranjos são utilizadas técnicas avançadas, onde é possível identificar todos os tipos de anomalias cromossômicas, até mesmo aquelas submicroscópicas. Dentre algumas técnicas temos a hibridação in situ fluorescente (FISH), que utiliza sondas de DNA específicas, com tamanhos de 40 kb a 250 kb, que são marcadas com um fluorocromo e hibridadas em sequencias complementares de DNA, para identificar regiões cromossômicas, a presença, ausência ou a localização de genes, sendo extremamente importante na caracterização de rearranjos cromossômicos (25, 26). Além desta a técnica de CMA utiliza milhares de sondas espalhadas por todo o genoma, permitindo a detecção de perdas e ganhos de segmentos submicroscópico de até 1 kb (27). Sendo assim, é possível investigar todo o genoma em um único experimento, detectando perdas e ganhos de segmentos cromossômicos com alta resolução (28). HIPÓTESES I. A maioria dos indivíduos com rearranjos cromossômicos balanceados apresenta fenótipo normal, porém uma minoria deles apresenta fenótipo anormal. II. Indivíduos com rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados ou complexos e fenótipo anormal apresentam desequilíbrios genômicos relacionados ao quadro clínico.

GARANTIAS ÉTICAS AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Em consulta agendada com um médico geneticista será apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos responsáveis pelo participante. O TCLE poderá ser levado para casa para que o seu responsável legal possa ler com tempo e decidir em participar ou não da pesquisa.

Endereço:	Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1° andar do Prédio I da Faculdade de Ciências	Médicas
Bairro: Ba	arão Geraldo	CEP: 13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPINAS	
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@unicamp.br	

Página 04 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

Para as famílias que decidirem participar da pesquisa, será realizada a coleta do sangue periférico do participante, com material adequado (estéril e descartável) por profissional treinado. Caso necessário, também serão coletadas amostras se sangue periférico dos pais. Durante o tempo que a investigação diagnóstica durar, todas as amostras de sangue coletadas serão processadas e armazenadas nos Laboratórios de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Os resultados dos exames serão transmitidos à família por um médico geneticista. Também poderá ser realizado o aconselhamento genético se esse for o desejo da família. Os participantes terão a garantia de que suas identidades serão mantidas em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, nenhuma identificação dos participantes será citada.

ESPERADOS Os resultados deste trabalho poderão gerar novas informações e conhecimentos sobre as consequências das anomalias cromossômicas aparentemente equilibradas, porém que apresentam ganhos ou perdas submicroscópicas do material genético, no fenótipo do indivíduo afetado.

DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS Os resultados deste trabalho serão divulgados em congressos nacionais com temas relacionados à genética e citogenética humana. Também há a possibilidade de divulgação dos resultados em congressos internacionais. Além disso, é possível que alterações encontradas em casos individuais ou familiais que possuírem informações relevantes para a comunidade científica sejam divulgados no formato de artigo científico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Investigar desequilíbrios genômicos em indivíduos que apresentam rearranjos cromossômicos balanceados com a presença de fenótipo alterado.

Objetivos específicos

I Realizar estudo retrospectivo de todos os casos com rearranjos cromossômicos balanceados identificados no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, e nesta amostra: Caracterizar a amostra, quanto à frequência de indivíduos com fenótipo normal ou alterado e frequência de casos herdados ou de novo;

Identificar a frequência dos rearranjos cromossômicos complexos nessa amostra;

Il Investigar anomalias cromossômicas, relacionadas ou não aos pontos de quebra, em indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados e rearranjos cromossômicos

Endereço:	Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1° andar	do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: B	arão Geraldo	CEP:	13.083-887
UF: SP	Município:	CAMPINAS	
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br

Página 05 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

complexos, com fenótipo anormal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: o único risco previsível até o momento é aquele relacionado à coleta de sangue periférico. A coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com material adequado (estéril e descartável). O risco será apenas de dor leve durante o procedimento e possibilidade de formação de manchas rochas na região da coleta.

Benefícios: o único benefício para o participante e sua família é a realização de testes genéticos (com a finalidade de diagnóstico) que ainda não estão disponíveis na rede pública de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de Mestrado

Aluna: Carolina Gama Nascimento Mestranda em Ciências Médicas, área de concentração Genética Médica Orientador: Prof. Dr. Társis Antônio Paiva Vieira Professor do Departamento de Medicina Translacional – FCM/UNICAMP.

Desenho:

Este estudo realizará a revisão dos casos de indivíduos que apresentam rearranjos estruturais equilibrados no Laboratório de Citogenética Humana

da Unicamp nos últimos 30 anos. Destes, serão selecionados cerca de 10 indivíduos com fenótipo alterado e rearranjo cromossômico

aparentemente equilibrado para a realização de análise cromossômica por microarray (CMA). A aplicação da técnica de CMA nestes casos permitirá a identificação de microdeleções ou microduplicações que estejam associadas às alterações fenotípicas

observadas e permitirá a conclusão diagnóstica e o aconselhamento genético em parte dos indivíduos portadores destes rearranjos.

Tamanho da Amostra no Brasil: 200

LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Este estudo será realizado no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

POPULAÇÃO A SER ESTUDADA

Poderão fazer parte da casuística deste estudo, participantes de ambos os sexos e de qualquer

Endereço:	Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1° andar	do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas	
Bairro: B	arão Geraldo	CEP:	13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPINAS		
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br	

Página 06 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

faixa etária que apresentem rearranjos cromossômicos estruturais equilibrados e (ou) rearranjos cromossômicos complexos, com fenótipo alterado. Todos serão recrutados nos ambulatórios do Serviço de Genética Clínica do Departamento de Medicina Translacional da FCM – UNICAMP. Os dados clínicos dos indivíduos serão coletados de seus respectivos prontuários e serão codificados de acordo com o HPO (Human Phenotype Ontology).

Participantes:

Esse estudo irá realizar a revisão dos casos de indivíduos que apresentam rearranjos cromossômicos estruturais balanceados do Laboratório de Citogenética Humana da Unicamp entre 1990 e 2020. Além disso, serão selecionados cerca de 10 indivíduos com fenótipo alterado e rearranjo cromossômico aparentemente equilibrado para realização de CMA.

COLETA DE DADOS: agt e set 2021.

Término do estudo: 30/06/2022.

- Orçamento: Total em R\$ R\$ 20.000,00.

Serão incluídos indivíduos que apresentarem rearranjos cromossômicos estruturais equilibrados e (ou) rearranjos cromossômicos complexos, com fenótipo alterado.

Serão excluídos os indivíduos que apresentarem fenótipo normal e os indivíduos com anomalias cromossômicas estruturais desequilibradas.

Serão incluídas no estudo pessoas de faixas etárias variadas, sendo que a maioria serão crianças. Porém, como essas apresentam deficiência intelectual, solicitamos a dispensa de aplicação do TALE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- folhaDeRosto_assinada.pdf 10/06/2021 : 200 participantes. Assinado pelo diretor da FCM.

- identidade_funcional.pdf 09/06/2021 : Prof Dr I FCM.

- Projeto_Mestrado_Carolina_CEP.pdf 09/06/2021 : projeto completo.

- Justificativa_dispensa_TALE.pdf 09/06/2021: Serão incluídas no estudo pessoas de faixas etárias variadas, sendo que a maioria serão crianças. Porém, como essas apresentam deficiência intelectual, solicitamos a dispensa de aplicação do TALE.

- Justificativa_dispensa_TCLE_levantamento_de_dados.pdf 09/06/2021:Essa solicitação de dispensa se justifica por ser um estudo retrospectivo, que incluirá dados específicos de participantes atendidos no Serviço de Genética Clínica do Departamento de Medicina Translacional/ FCM – UNICAMP nos últimos 30 anos, sendo que a grande maioria dos participantes não está mais em atendimento neste serviço. Este estudo utilizará apenas informações de resultados de exames de cariótipo realizados no Laboratório de Citogenética Humana da FCM/

Endereço	: Rua Tessália Vieira (de Camargo, 126, 1° and	ar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: E	arão Geraldo	CE	P: 13.083-887
UF: SP	Município:	CAMPINAS	
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br

Página 07 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

UNICAMP já entregues aos pacientes. Todos os dados serão apresentados de forma anônima, sem qualquer identificação nominal ou com número de registros das amostras dos participantes da pesquisa. Nos casos em que for identificada a necessidade de realização de Análise Cromossômica por microarray, os responsáveis pelos pacientes serão contatados por telefone e convidados a participar da pesquisa.

Para a presente versão:

- CARTA_RESPOSTA_CEP.pdf 08/10/2021: esclarece as pendências.

- Autorizacao_coleta_de_dados.pdf 08/10/2021: anuência do responsável pelo serviço de genética clínica do HC para coleta de dados.

- Justificativa_dispensa_TCLE_levantamento_de_dados.pdfi08/10/2021 : justificando a

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração ao parecer anterior de 26 de Julho de 2021; Número do Parecer: 4.865.406, pesquisador esclarece:

- Quanto a "Apresentar anuência do superintendente do HC onde os participantes serão abordados para realização do estudo." declara: "Anexamos o documento com a autorização de coleta de dados assinada pelo chefe do Serviço de Genética Clínica do HC/Unicamp. Essa autorização foi solicitada ao chefe deste serviço, pois após mais de um mês em que os documentos foram entregues na Superintendência do HC, para assinatura do superintendente, os mesmos foram perdidos. Inicialmente informaram que estava em análise, mas nunca devolveram os documentos, que não foram assinados. Alegam que os documentos não estão lá."

- Inclui previsão de ressarcimento de gastos para convocação a participar do estudo (coleta de material biológico) "declaração de que haverá ressarcimento aos participantes foi incluída no TCLE "

- O TCLE será aplicado apenas aos 10 participantes para os quais será realizada a CMA. Haverá tomada de fotografias, consulta de dados clínicos, coleta de sangue, e armazenamento de DNA. Todos esses procedimentos foram incluídos no projeto e no TCLE e estão destacados em azul.

Endereço:	Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1º anda	r do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas	
Bairro: Ba	arão Geraldo	CEP:	: 13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPINAS		
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br	

Página 08 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

- Foi esclarecido no TCLE as condições da fotografia.

Conclusão: projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais semestrais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Endereço	: Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1° andar do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas	
Bairro:	Barão Geraldo	CEP: 13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPINAS	
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@unicamp.br	

Página 09 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1770597.pdf	08/10/2021 17:17:23		Aceito
Outros	Autorizacao_coleta_de_dados.pdf	08/10/2021 17:17:02	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_CEP.pdf	08/10/2021 17:16:39	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_dispensa_TCLE_levantame nto_de_dados.pdf	08/10/2021 17:16:17	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_Carolina.pdf	08/10/2021 17:16:04	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_Carolina_CEP.pdf	08/10/2021 17:15:49	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinada.pdf	10/06/2021 09:57:30	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
Outros	identidade_funcional.pdf	09/06/2021 18:20:56	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio_Projeto_C arolina.pdf	09/06/2021 18:19:34	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_dispensa_TALE.pdf	09/06/2021 18:19:20	Társis Antonio Paiva Vieira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Endereço	Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1° anda	r do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas
Bairro: B	arão Geraldo	CEP	13.083-887
UF: SP	Município:	CAMPINAS	
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br

Página 10 de 11





Continuação do Parecer: 5.042.235

CAMPINAS, 17 de Outubro de 2021

Assinado por: Maria Fernanda Ribeiro Bittar (Coordenador(a))

Endereço:	Rua Tessália Vieira	de Camargo, 126, 1° andar	do Prédio I da Faculdade de Ciências Médicas	
Bairro: Ba	arão Geraldo	CEP:	13.083-887	
UF: SP	Município:	CAMPINAS		
Telefone:	(19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@unicamp.br	

Página 11 de 11

7.2. Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Projeto: "Caracterização de rearranjos cromossômicos equilibrados e rearranjos cromossômicos complexos em indivíduos com alterações fenotípicas"

Nome do responsável: Társis Antonio Paiva Vieira

Número do CAAE: 47887221.5.0000.5404

A pessoa pela qual é responsável está sendo convidada a participar como voluntária de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

As alterações cromossômicas estruturais (alteração na estrutura do cromossomo, onde o DNA é armazenado) podem ser aparentemente equilibradas (quando tem perdas e ganhos de DNA muito pequenos não vistos através de um microscópio). Em outros casos as alterações cromossômicas estruturais podem se apresentar múltiplas vezes em uma mesma pessoa, chamadas, alterações cromossômicas complexas (muitas quebras cromossômicas). Sendo assim, pessoas que possuem ambas as alterações, apresentam indicação para a investigação de perdas ou ganhos de pequenos pedaços do DNA, para chegar a uma conclusão do diagnóstico e realizar a orientação da família, com relação aos riscos do mesmo problema se repetir em outras pessoas da família. Portanto, o objetivo deste estudo é investigar a relação de alterações cromossômicas estruturais equilibradas e alterações complexas, com o fenótipo apresentado, através de exames que permitem a identificação de alterações no DNA.

Procedimentos:

Participando do estudo, a pessoa pela qual é responsável está sendo convidada a: permitir a consulta das informações que estão no prontuário do Serviço de Genética Clínica do Departamento de Medicina Translacional da FCM - UNICAMP e os resultados dos exames que estão neste prontuário. Além disso também será realizada a coleta de sangue periférico (da veia do braço) para a extração do DNA, para a realização do seguinte exame genético: Análise Cromossômica por microarray, que tem a finalidade de encontrar alterações nas estruturas cromossômicas (descobrir a causa do problema). Neste exame os cromossomos (estrutura formadas por DNA) serão analisados. Caso necessário, a amostra dos pais também será coletada. Também serão consultadas

as informações clínicas (anamnese e exame físico) que estão no prontuário do serviço de genética clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP e os resultados dos exames que estão neste prontuário.

Desconfortos e riscos:

O único risco previsível até o momento é aquele relacionado à coleta de sangue periférico. A coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com material adequado (estéril edescartável). O risco será apenas de dor leve durante o procedimento e possibilidade de formação de manchas rochas na região da coleta.

Benefícios:

O único benefício para o participante e sua família é a realização de testes genéticos (com a finalidade de diagnóstico) que ainda não estão disponíveis na rede pública de saúde.

Acompanhamento e assistência:

O acompanhamento do participante será realizado pelo geneticista clínico, em consultas regulares junto ao serviço de genética. Os resultados dos exames serão informados por este mesmo profissional.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que a identidade da pessoa pela qual é responsável será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome e o da pessoa pela qual é responsável não serão citados.

Ressarcimento e Indenização:

Esta pesquisa prevê ressarcimento de despesas, caso haja necessidade de comparecimento exclusivamente para participação na pesquisa, todas as despesas com transporte e alimentação serão ressarcidas. O participante terá direito à indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

Aconselhamento genético:

Os resultados serão transmitidos à família por um médico geneticista clínico experiente em consulta agendada no serviço de genética clínica do HC, onde a família é acompanhada.

O aconselhamento genético poderá ser realizado, se for o desejo da família, por esse mesmo profissional.

Os dados genéticos são confidenciais e não serão repassados a terceiros (como, por exemplo: seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos, entre outros).

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:

Todas as amostras de sangue coletadas serão processadas e armazenadas no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP durante o tempo que a investigação diagnóstica durar. Você poderá, também, autorizar a armazenagem do DNA (no Laboratório de Citogenética Humana e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP) para pesquisas futuras. No entanto, antes de se realizar qualquer estudo futuro, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para tal.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do material biológico, sendo necessário o meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado. O descarte do material armazenado será autorizado quando solicitado pelo participante ou responsável legal, assim que terminar a pesquisa.

Fotografias:

() Autorizo a tomada de fotografias da pessoa sob minha guarda, para publicação em revista científica, se houver contribuição relevante após a conclusão da investigação. As fotografias serão tiradas da pessoa vestida (com roupas). A face também será fotografada, pois a avaliação desta é importante em estudos genéticos.

Disponibilização de informações em bases de dados científicas nacionais e (ou) mundiais:

Como a maioria das causas de deficiência intelectual e defeitos congênitos são raras, é importante comparar as características clínicas e genéticas de pessoas no Brasil e em outros países. Para isso, é necessário inserir informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas nacionais e (ou) mundiais. No compartilhamento dos dados é sempre assegurado que NÃO haverá qualquer identificação dos participantes, ou seja, não aparecerão informações como nome, sobrenome, filiação, endereço, número de registro hospitalar, cartão nacional de saúde ou qualquer outra que permita reconhecer o participante. Em relação a este item, eu:

() Autorizo a disponibilização das informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas.

() Não autorizo a disponibilização das informações médicas e resultados de testes genéticos em bases de dados públicas.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Carolina Gama Nascimento ou Prof. Társis Antonio Paiva Vieira. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, andar térreo FCM 01, no Departamento de Genética Médica, CEP 13083-887 Campinas – SP. Telefones: (19) 3521-8906 ou (19) 3521-8909. E-mail: <u>cargama0902@gmail.com</u>

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da

UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do(a) participante:	Contato telefônico:			
e-mail (opcional):				
	Da	ata:	/	/

(Nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo pelo participante.

_Data: / /

(Nome e assinatura do pesquisador)