

Eunice Maria Ruas de Campos Matoso

DESEQUILÍBRIOS GENÓMICOS NAS PATOLOGIAS DO DESENVOLVIMENTO E DO COMPORTAMENTO

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada pela Senhora Professora Doutora Isabel Marques Carreira e pela Senhora Professora Doutora Maria Joana Barbosa de Melo e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eunice Maria Ruas de Campos Matoso

**DESEQUILÍBRIOS GENÓMICOS NAS PATOLOGIAS DO
DESENVOLVIMENTO E DO COMPORTAMENTO**

Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas, orientada pela Senhora Professora Doutora Isabel Marques Carreira e pela Senhora Professora Doutora Maria Joana Barbosa de Melo e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.



Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

2014

Titulo DESEQUILÍBRIOS GENÓMICOS NAS PATOLOGIAS DO DESENVOLVIMENTO E DO COMPORTAMENTO

Autor Eunice Maria Ruas de Campos Matoso

Edição do Autor

Ano 2014

"Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso."

Albert Einstein

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, desejo expressar o meu profundo agradecimento pela orientação deste trabalho e revisão desta tese, pelo incentivo e estímulo constantes em todo o meu percurso profissional e académico. As suas qualidades científicas serão sempre um exemplo e os seus ensinamentos foram fundamentais para a meu percurso científico e profissional.

À Professora Doutora Joana Barbosa de Melo, co-orientadora deste trabalho, agradeço a colaboração na revisão da tese e o incentivo para que este trabalho se concretizasse.

Ao Professor Doutor Jorge Saraiva, director do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra, e a toda a equipa clínica desejo agradecer o apoio imprescindível para a realização deste trabalho. Em particular à Dra. Lina Ramos, Dra. Fabiana Ramos, Doutora Ana Beleza e Dra. Renata Oliveira agradeço a avaliação e revisão das histórias clínicas, assim como o contributo com a participação nos artigos científicos.

À equipa do Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina de Coimbra, onde desenvolvi o meu projecto, em particular aos meus colegas Susana Ferreira, Ana Jardim, Miguel Pires e José Ferrão, desejo agradecer toda a colaboração directa e indirecta na realização deste projecto.

À Dra. Teresa Castela, do Centro de Desenvolvimento do Hospital Pediátrico de Coimbra, agradeço a colaboração clínica numa das famílias descritas neste projecto.

Ao Professor Doutor Eduardo Silva, do Serviço de Oftalmologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, agradeço a colaboração na avaliação clínica de alguns pacientes incluídos neste estudo.

À Professora Doutora Guiomar Oliveira, da Unidade de Neurodesenvolvimento e Autismo do Hospital Pediátrico de Coimbra, agradeço a revisão e colaboração neste trabalho.

Aos meus Pais desejo expressar o meu profundo reconhecimento pelo seu amor e apoio incondicionais. A eles devo a minha formação pessoal e académica.

Ao Amadeu e ao Afonso, agradeço o estímulo de vida que representam para mim.

Índice de Figuras e Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Acrónimos	xiii
Resumo	1
Abstract	3
Capítulo 1 – Introdução	5
1.1 Diagnóstico de Desequilíbrios Genómicos – do cromossoma ao nucleótido	7
1.1.1 Citogenética Clássica - perspectiva histórica	7
1.1.2 Citogenética Molecular	11
1.1.2.1 <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>	12
1.1.2.2 <i>Comparative Genomic Hybridization</i>	14
1.1.2.3 <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	15
1.1.3 <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>	17
1.1.3.1 Array-CGH utilizando clones do tipo BAC	18
1.1.3.2 Array-CGH utilizando Oligonucleótidos	19
1.1.3.3 <i>Single Nucleotide Polymorphism array</i>	20
1.2 A Variabilidade do Genoma Humano	20
1.2.1 Variantes Genómicas	21
1.2.2 Mecanismos na Origem da Variabilidade Genómica	22
1.2.2.1 Recombinação Homóloga Não-Alélica	22
1.2.2.2 <i>Non-Homologous End-Joining</i>	23
1.2.2.3 <i>Fork Stalling and Template Switching</i>	23
1.2.2.4 <i>Chromothripsis</i>	25
1.3 Patologias do Neurodesenvolvimento e Comportamento	25
1.3.1 Défice Intelectual	25
1.3.2 Autismo	26
1.4 Desequilíbrios Genómicos na Etiologia do Défice Intelectual, Autismo e Anomalias Congénitas	27
1.4.1 Anomalias Cromossómicas	27
1.4.2 Aneusomias Segmentais e as Síndromes de Genes Contíguos	28
1.4.3 Interpretação das CNVs – princípios e dilemas	29
1.4.3.1 Variantes frequentes na população – benignas	29

1.4.3.2 CNVs raras herdadas – são benignas?	30
1.4.3.3 CNVs recorrentes associadas a um fenótipo específico	31
1.4.3.4 CNVs maiores serão mais provavelmente causais	32
1.4.3.5 O novo paradigma das CNVs mendelianas	33
1.5 Objectivos deste projecto	37
1.6 Referências	39
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	53
2.1 Grupo de pacientes	55
2.2 Citogenética convencional	55
2.2.1 Cultura sincronizada de linfócitos para obtenção de prometáfases	55
2.2.2 Bandagem GTG	56
2.2.3 Análise ao microscópio óptico	57
2.3 Oligo array-CGH	57
2.3.1 Preparação das amostras	57
2.3.2 Hibridização	60
2.3.3 <i>Scanning e Feature Extraction</i>	61
2.3.4 Análise das CNVs	63
2.3.5 Validação das CNVs	65
2.3.5.1 MLPA	65
2.3.5.2 Citogenética molecular – FISH	66
2.3.6 Interpretação da patogenicidade das CNVs	67
2.4 Referências	69
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	71
3.1 CNVs patogénicas microscópicas	75
3.1.1 Artigos publicados	77
Artigo 1: Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the <i>EPHA5</i> gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder	
Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A, Castelo TM, Weise A, Carreira IM	
American Journal of Medical Genetics Part A (2013)	79
Artigo 2: Cryptic 7q36.2q36.3 deletion causes multiple congenital eye anomalies and craniofacial dysmorphism	

Beleza-Meireles A*, Matoso E* , Ramos L, Melo JB, Carreira IM, Silva ED, Saraiva JM American Journal of Medical Genetics Part A (2013)	87
Artigo 3: Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille syndrome region Ferreira SI, Matoso E , Venâncio M, Saraiva J, Melo JB, Carreira IM Molecular Cytogenetics (2012)	95
Artigo 4: Molecular cytogenetic characterisation of a mosaic add(12)(p13.3) with an inv dup(3)(q26.31→qter) detected in an autistic boy Carreira IM, Melo JB, Rodrigues C, Backx L, Vermeesch J, Weise A, Kosyakova N, Oliveira G, Matoso E Molecular Cytogenetics (2009)	105
Artigo 5: Inv21p12q22del21q22 and intellectual disability Oliveira R, Dória S, Madureira C, Lima V, Almeida C, Pinho MJ, Ramalho C, Matoso E , Barros A, Carreira IM, Moura CP Gene (2013)	115
3.2 CNVs patogénicas submicroscópicas	123
3.2.1 Artigos em submissão	137
Artigo 6: Interstitial 287 kb deletion of 4p16.3 including <i>FGFRL1</i> gene associated with an atypical phenotype Matoso E , Ramos F, Ferrão J, Pires LM, Mascarenhas A, Melo JB, Carreira IM European Journal of Human Genetics (2014)	139
Artigo 7: Interstitial triplication 20p11.22p11.21 in a girl with development delay and vertebral anomalies, an overlapping phenotype to the trisomy 20p syndrome Matoso E , Ramos L, Ferreira SI, Vermeesch JR, Melo JB, Carreira IM	151
3.3 CNVs de SCI provavelmente patogénicas, provavelmente benignas ou apenas SCI	167
3.4 Conclusão	184
3.5 Referências	185
Capítulo 4 – Conclusões e Perspectivas	189
4.1 Conclusões gerais	191
4.2 Array-CGH como teste de primeira linha – benefícios e limitações	192
4.3 Perspectivas com as novas técnicas de sequenciação massiva	194
4.4 Referências	197

Figuras

Figura 1 <i>Timeline</i> Principais marcos na história da Citogenética Humana.	9
Figura 2 – Cariograma humano com um padrão de bandas GTG.	10
Figura 3 – Técnica de FISH com diferentes tipos de sondas de DNA.	13
Figura 4 – Esquema representativo da técnica de MLPA.	16
Figura 5 – Representação esquemática das etapas fundamentais da técnica de array-CGH.	17
Figura 6 - Variantes estruturais - mecanismos de formação e rearranjos resultantes.	24
Figura 7 – Modelo em <i>loop</i> para array-CGH.	59
Figura 8 – Imagem resultante após a leitura de uma lâmina no <i>Agilent Microarray Scanner</i> .	61
Figura 9 – <i>Overview</i> do programa de análise <i>Agilent Genomic Workbench</i> (v6.0).	62
Figura 10 – Análise de uma CNV.	64
Figura 11 - Algoritmo de avaliação da patogenicidade de uma CNV.	68
Figura 12 – Perfil do cromossoma 8 da análise por oligo array-CGH, do paciente SM826/10.	131

Tabelas

Tabela I – Pacientes com desequilíbrios genómicos citogenéticos.	76
Tabela II – Pacientes com CNVs em regiões de síndromes estabelecidas.	127
Tabela III – Pacientes com CNVs patogénicas que não correspondem a síndromes recorrentes já estabelecidas.	135
Tabela IV – Pacientes apenas com CNVs de SCI, provavelmente patogénicas, provavelmente benignas ou apenas de SCI.	175

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

ADI-R *Autism Diagnostic Interview-Revised*

ADOS *Autism Diagnostic Observation Schedule*

ADPM Atraso do Desenvolvimento Psicomotor

array-CGH *array-based Comparative Genomic Hybridization*

BAC *Bacterial Artificial Chromosome*

bp par de bases

BP ponto de quebra

CARS *Childhood Autism Rating Scale*

cDNA DNA codificante

CGH *Comparative Genomic Hybridization*

CHARGE *Coloboma, Heart malformation, choanal Atresia, Retardation of growth and/or development, Genital anomalies, and Ear anomalies*

CIA Comunicação Interauricular

CIV Comunicação Interventricular

CNP *Copy Number Polimorphism*

CNV(s) *Copy Number Variant(s)*

CR *Critical Region*

Cy3 *Cyanine 3*

Cy5 *Cyanine 5*

DA Dificuldades de Aprendizagem

DECIPHER *DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources*

Abreviaturas e Acrónimos

del deleção

DGV *Database of Genomic Variants*

DNA ácido desoxirribonucleico

dup duplicação

EDTA *Ethylenediamine tetraacetic acid*

FBS *Fetal Bovine Serum*

FISH *Fluorescence in situ Hybridization*

GTG *G-bands by trypsin using Giemsa*

ISCA *The International Standards for Cytogenomic Arrays*

Kb Kilobase

LCG-FMUC Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

LCR *Low Copy Repeat*

LOH *Loss of Heterozygosity*

Mb Megabase

MC malformações congénitas

M-CHAT *Modified Checklist for Autism in Toddlers*

MCB *Multicolor Chromosome Banding*

M-FISH *Multicolor Fluorescence in situ Hybridization*

MLPA *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MMBIR *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*

NAHR *Non Allelic Homologous Recombination*

NGS *Next Generation Sequencing*

NOR *Nucleolus Organizing Region*

QD Quociente de Desenvolvimento

QI Quociente de Inteligência

OFC *Occipital Frontal Circumference*

oligo array-CGH *oligonucleotide array-based Comparative Genomic Hybridization*

OMIM *Online Mendelian Inheritance in Man*

PAC *P1 Artificial Chromosome*

PCR *Polymerase Chain Reaction*

PEA Perturbação do Espectro do Autismo

PHDA Perturbação da Hiperactividade e Défice de Atenção

RNA ácido ribonucleico

rpm rotações por minuto

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

SCI Significado Clínico Incerto

SNP *Single Nucleotide Polymorphism*

SKY *Spectral Karyotyping*

TAR *Thrombocytopenia-Absent Radius*

TE Tampão de Eluição

UCSC *University of California Santa Cruz*

VNTRs *Variable Number of Tandem Repeats*

WHS *Wolf-Hirschhorn Syndrome*

WHSCR *Wolf-Hirschhorn Syndrome Critical Region*

WISC *Wechsler Intelligence Scale for Children*

Abreviaturas e Acrónimos

YAC *Yeast Artificial Chromosomes*

Resumo

A citogenética convencional desde a década de 1970 que se tornou uma técnica fundamental no diagnóstico de alterações cromossómicas numéricas e estruturais. Esta área da genética clínica proporciona um diagnóstico em 10-15% dos pacientes com perturbações do neurodesenvolvimento, em particular o défice intelectual (DI), as perturbações do espectro do autismo (PEA) e malformações congénitas (MC). Contudo, a sua capacidade de resolução não vai além das 3-10 Mb, mesmo com bandas de alta resolução. Com a introdução das técnicas de citogenética molecular, a *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH) e mais tarde a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), foi possível alargar o leque de diagnósticos a um maior nível de resolução, aumentando o número de desequilíbrios genómicos identificáveis em aproximadamente 5% dos pacientes, com particular relevância no caso das síndromes de microdeleção e microduplicação e nos rearranjos das regiões subteloméricas. Nos últimos anos a introdução das metodologias de *array-based Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH) tornou possível fazer a análise de todo o genoma numa só experiência mas com uma resolução até 100 vezes superior à citogenética convencional, dependendo da capacidade de resolução da plataforma utilizada. Surge assim uma nova escala de detecção dos desequilíbrios genómicos, passando-se do número de cópias de um cromossoma (aneuploidia) ou da duplicação e deleção de segmentos cromossómicos microscópicos para a detecção de desequilíbrios envolvendo segmentos genómicos submicroscópicos, que podem ser menores que 100 Kb e denominados de *Copy Number Variants* (CNVs). Abriram-se assim novas perspectivas para a procura da etiologia dos distúrbios do neurodesenvolvimento, como o DI e o PEA, assim como para as malformações congénitas. Com a aplicação das técnicas de array-CGH em grandes grupos de pacientes tem sido possível estabelecer recentemente novas síndromes de microdeleção e microduplicação, construir bases de dados para recolha, organização e comparação das CNVs identificadas e do seu significado clínico. Os desafios e dilemas de interpretação da causalidade de algumas cromossomopatias estenderam-se à escala das CNVs, sendo imperativo interpretar com clareza, determinando as que constituem variantes benignas ou polimórficas, as que são patogénicas e as que permanecem de significado clínico incerto (SCI). Para atingir este objectivo é determinante que o laboratório tenha acesso a uma caracterização clínica detalhada,

que permita uma boa correlação genótipo-fenótipo. Neste trabalho um grupo de 147 pacientes com DI, PEA e/ou MC, foi avaliado utilizando uma plataforma de array-CGH com oligonucleótidos, determinando-se a prevalência de CNVs benignas (polimórficas), patogénicas ou de significado clínico incerto. Estabeleceu-se um algoritmo com critérios claros de avaliação e interpretação do significado clínico das CNVs identificadas. Em seis pacientes com desequilíbrios microscópicos, diagnosticados pela citogenética convencional, a caracterização por array-CGH revelou-se fundamental na identificação do conteúdo génico envolvido, na reclassificação do rearranjo, em dois pacientes, e detectou uma nova CNV patogénica envolvida no fenótipo em outros dois. Nos outros 141 pacientes, 22 revelaram uma CNV submicroscópica classificada como patogénica (15,6%) e em 34 pacientes apenas se observaram CNVs de SCI (24,1%). No grupo das CNVs patogénicas submicroscópicas, 50% correspondem a microdeleções ou microduplicações recorrentes em regiões de síndromes já estabelecidas, a outra metade foi classificada como patogénica pelo seu conteúdo génico e ou pacientes sobreponíveis já reportados. Com este trabalho sai reforçada a estratégia de aplicação da array-CGH como teste de primeira linha no diagnóstico de pacientes com distúrbios do neurodesenvolvimento e MC, quando não existe uma orientação clínica específica. Inverte-se a estratégia laboratorial passando a FISH e a MLPA ou mesmo a citogenética convencional para uma segunda etapa de caracterização do rearranjo e/ou avaliação dos progenitores por vezes portadores equilibrados. As novas técnicas de sequenciação denominadas por *Next Generation Sequencing* (NGS) irão eventualmente substituir a array-CGH no diagnóstico dos distúrbios do neurodesenvolvimento e MC. A sequenciação massiva tem a capacidade de detectar mutações pontuais assim como deleções, duplicações mas também rearranjos equilibrados como translocações e inversões. No presente, sequenciar todo o genoma é exequível, mas muito dispendioso, em poucos anos será financeiramente comportável e talvez mais aplicável em larga escala. Contudo, será necessária uma evolução ao nível bioinformático de modo a resolver alguns impasses relacionados com a aplicação da NGS. A interpretação do grande número de novas variantes que serão identificadas será um desafio enorme para cientistas e clínicos, com a necessidade de integração concertada do genótipo com o fenótipo.

Palavras-chave: array-CGH, citogenética, défice intelectual, neurodesenvolvimento

Abstract

Conventional karyotyping has been used as the standard technique since the 1970s in the diagnosis of numerical and structural chromosomal aberrations. This area of clinical genetics gives a diagnosis in 10-15 % of the patients with neurodevelopment disorders, including intellectual disability (ID), autism spectrum disorders (ASD) and congenital malformations (CM). However, conventional karyotyping usually only detects rearrangements larger than 3-10 Mb, even in high resolution banding. With the development of molecular cytogenetics, the Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), and the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), it was possible to detect a larger number of genomic imbalances with a high resolution, increasing the detection rate in 5 % of the patients, particularly in the diagnosis of microdeletion and microduplication syndromes and subtelomeric rearrangements. In recent years with the introduction of array-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) techniques it became possible to screen the whole human genome in a single experiment with an increasing resolution that can be 100 times higher than conventional karyotyping, depending on the resolution of the array. Genomic imbalances can be detected with a higher resolution, starting in the copy number of a chromosome (aneuploidy) or the duplication and deletion of microscopic chromosome segments and achieving the detection of submicroscopic genomic imbalances, even smaller than 100 kb, the Copy Number Variants (CNVs). The etiology of neurodevelopment disorders including ID, ASD and CM, has new perspectives of diagnosis. Since the application of array-CGH in large cohorts of patients, it was possible in recent years to establish new microdeletion and microduplication syndromes and to construct databases with the collection of the identified CNVs allowing the comparison of its clinical significance. The challenges and dilemmas of the interpretation of genomic variation in cytogenetics extend to the resolution of the CNVs size, being essential to determine which CNVs are benign or polymorphic, which are pathogenic and which remain unclassified variants with uncertain clinical significance. To achieve this goal it is very important that it is provided to the laboratory a detailed clinical characterization, for an ascertain genotype-phenotype correlation. In the present work a group of 147 patients with ID, ASD and CM, was

evaluated using oligonucleotide array-CGH, in order to ascertain the prevalence of benign (or polymorphic) CNVs, pathogenic or CNVs of uncertain clinical significance. An algorithm with clear criteria of evaluation and interpretation of the clinical significance of the identified CNVs was established. In six patients with previous identified microscopic rearrangements, the characterization by array-CGH was essential to identify the genes involved, leading to the re-classification of the type of rearrangement in two of the patients and disclosing a new pathogenic CNV involved in the phenotype in two other ones. In the other 141 patients, 22 revealed a submicroscopic CNV classified as pathogenic (15,6%) and in 34 patients were only identified CNVs of uncertain clinical significance (24,1%). In the group of the submicroscopic pathogenic CNVs, 50% were recurrent microdeletions or microduplications in regions of previous established syndromes, the other half were classified as pathogenic because of its genic content and/or previous overlapping reports. With this work the use of array-CGH as the first tier diagnostic technique of patients with neurodevelopment disorders and CM, when there isn't a specific clinical orientation, is reinforced. The strategy of the laboratory investigations is now inverted, FISH and MLPA techniques or even conventional karyotyping could be a second step in the investigation when it is needed the characterization of the rearrangement involved and the screening of the parents that could be balanced carriers. Next Generation Sequencing (NGS) technologies will eventually replace the array-CGH in the genetic diagnosis of neurodevelopment disorders and CM. Massive sequencing will be able to detect mutations as well as deletions, duplications, and balanced rearrangements like inversions and translocations. At the moment sequencing the whole genome is feasible, but an expensive strategy, probably in a few years it will be affordable and maybe suitable for a large scale. However, several bioinformatics advances will be necessary to solve some issues related with NGS. The interpretation of a large number of new variants will be a huge challenge for scientists and clinicians, that will need to collaborate to achieve a good integration of the genotype and the phenotype.

Keywords: array-CGH, cytogenetics, intellectual disability, neurodevelopment

Capítulo 1

Introdução

1.1 Diagnóstico de Desequilíbrios Genómicos - do cromossoma ao nucleótido

1.1.1 Citogenética Clássica - perspectiva histórica

A citogenética humana nasce com Walther Flemming, um citologista Austríaco e professor de anatomia, que publicou as primeiras ilustrações de cromossomas humanos em 1882. Flemming usou o termo *chromatin* para designar a porção do núcleo que corava e se tornava visível ao microscópio óptico, foi ele que pela primeira vez utilizou o termo *mitosis* [Flemming, 1882]. Em 1888, Heinrich von Waldeyer introduz a palavra *chromosome* que deriva do Grego das palavras *chroma* que designa cor e de *soma* que designa corpo [Waldeyer, 1888]. Mais tarde, após a redescoberta das leis da hereditariedade de Mendel em 1900, Theodor Boveri and Walter Sutton propuseram de forma independente que os cromossomas seriam os portadores dos factores da hereditariedade, ou seja os genes, sendo Walter Sutton a associar as disciplinas de citologia e genética e o primeiro a referir-se ao estudo dos cromossomas como “citogenética” [Boveri, 1902; Sutton, 1903].

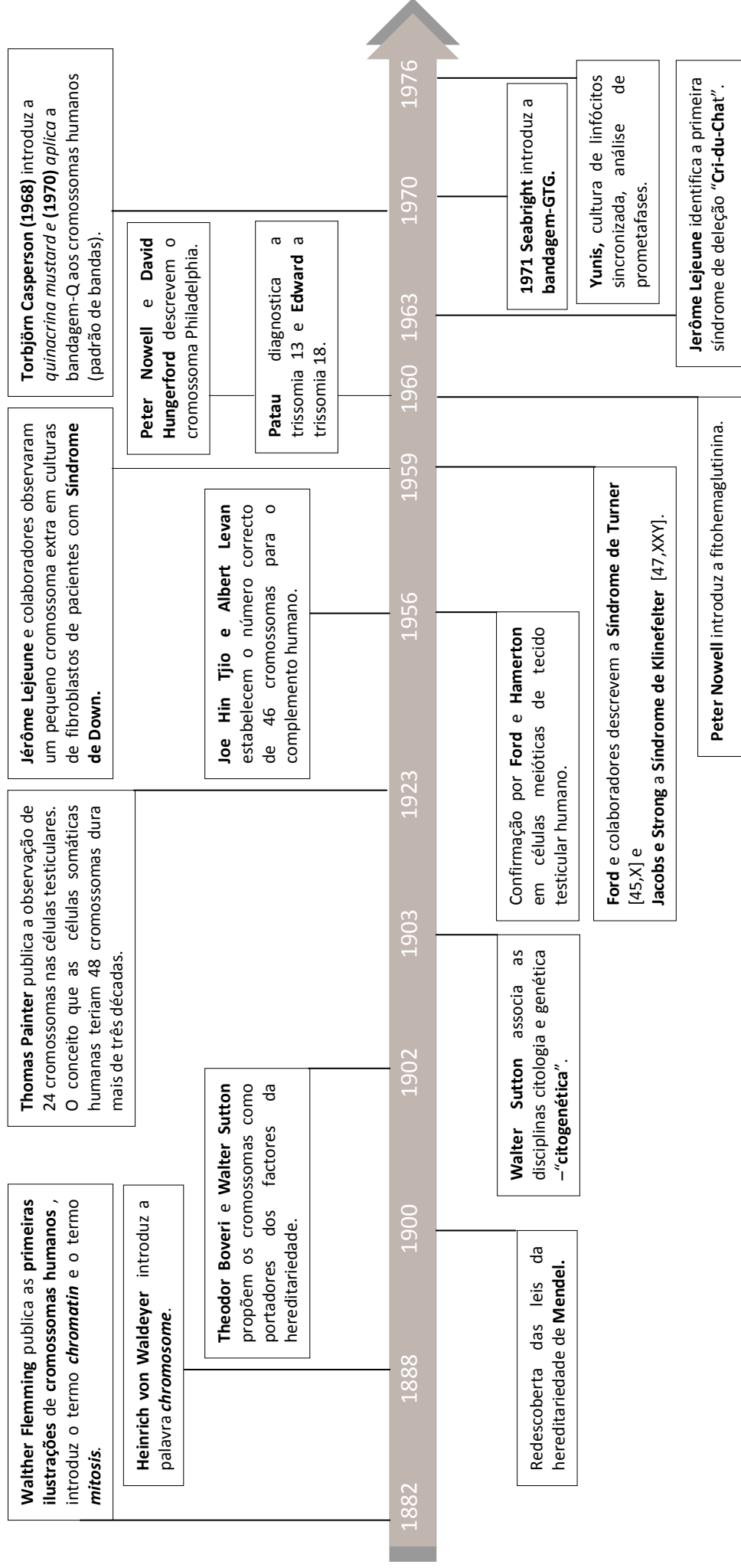
Em 1923, Thomas Painter publicou a observação de 24 cromossomas nas células testiculares, pressupondo que as células somáticas humanas teriam 48 cromossomas [Painter, 1923]. Durante mais de três décadas o conceito de que o complemento cromossómico humano era 48 foi aceite pela generalidade dos citogeneticistas. Só em 1956 Joe Hin Tjio e Albert Levan estabeleceram que o número correcto de cromossomas era 46 [Tjio e Levan, 1956]. Tudo se ficou a dever a uma alteração accidental no protocolo, a adição de uma solução hipotónica em vez de isotónica à suspensão de células em mitose, antes da etapa de fixação, provocou a tumefacção celular por osmose e levou a uma melhor dispersão dos cromossomas [Hsu, 1952]. Esta alteração técnica em conjugação com a utilização da *colchicina* [Levan, 1938], permitiu que Tjio e Levan conseguissem contar de um modo inequívoco o complemento de 46 cromossomas humanos. Ainda durante o mesmo ano, este achado foi confirmado independentemente por Ford e Hamerton, em células meióticas de tecido testicular humano [Ford e Hamerton, 1956].

A primeira associação entre patologia e cromossomas surge três anos mais tarde, quando Jérôme Lejeune e seus colaboradores [1959] observaram um pequeno cromossoma extra em metafases obtidas da cultura de fibroblastos de pacientes com

Síndrome de Down [Lejeune *et al.*, 1959]. Num curto intervalo de tempo outras anomalias cromossômicas foram descritas envolvendo tanto os cromossomas sexuais como os autossomas. No mesmo ano foram identificadas a Síndrome de Turner com o complemento 45,X [Ford *et al.*, 1959] e a Síndrome de Klinefelter com 47,XXY [Jacobs e Strong, 1959]. No ano seguinte Patau diagnosticou a trissomia 13 e Edward a trissomia 18 [Patau *et al.*, 1960; Edwards *et al.*, 1960]. Enquanto Peter Nowell e David Hungerford [1960] descrevem o cromossoma Philadelphia, supondo uma deleção do cromossoma 22, em pacientes com leucemia mielóide crónica [Nowell e Hungerford, 1960].

Nos anos seguintes, a citogenética humana sofreu vários avanços tecnológicos (Fig. 1) assim como as áreas da biologia molecular, química e instrumentação. Peter Nowell identificou a fitohemaglutinina, lecitina extraída do feijão vermelho *Phaseolus vulgaris*, agente mitogénico que estimula a divisão dos linfócitos T *in vitro* [Nowell, 1960]. Esta descoberta permitiu usar o sangue periférico para a análise citogenética, em vez de colheitas mais invasivas como os fibroblastos e os aspirados de medula. Em 1963, mais uma vez Jérôme Lejeune constatou que pacientes com um quadro de défice cognitivo severo e um choro muito característico semelhante ao miar de um gato, a Síndrome de *Cri-du-Chat*, apresentavam no braço curto do cromossoma 5 a falta de um segmento terminal, identificando o primeiro síndrome de deleção [Lejeune *et al.*, 1963]. O segundo marco no desenvolvimento da citogenética humana, resultou de um estudo em cromossomas de plantas realizado por Torbjörn Casperson, um corante fluorescente (*quinacrine mustard*) foi utilizado conferindo aos cromossomas um padrão diferencial e específico de bandas (bandagem-Q) facilitando a sua identificação [Casperson *et al.*, 1968] e mais importante ainda a detecção de alterações estruturais. Em 1970 realizou-se a primeira bandagem de cromossomas humanos por este método [Casperson *et al.*, 1970]. A bandagem-Q revelou-se muito útil na identificação de várias anomalias cromossômicas. Contudo, para além de ser necessário um microscópio de fluorescência esta decaía muito rapidamente, foi assim largamente substituída pela bandagem-G. A bandagem-G, também denominada de GTG, confere uma coloração permanente, consiste na incubação com uma enzima proteolítica, a tripsina, seguida de coloração com Giemsa [Seabright, 1971].

Figura 1
Timeline | Principais marcos na história da Citogenética Humana



Este é o método de bandagem mais utilizado nos laboratórios de citogenética (Fig. 2), excepto em França e outros países com o mesmo idioma onde se utiliza a bandagem-R que confere aos cromossomas um padrão de bandas reverso ao da bandagem-G [Dutrillaux e Lejeune, 1971].

Todos estes avanços técnicos, que se reflectiram na capacidade de diagnóstico da citogenética clínica, foram acompanhados por uma inevitável evolução na classificação e nomenclatura dos cromossomas humanos. A primeira classificação dos cromossomas humanos consistiu na distribuição dos pares de homólogos em sete grupos diferentes (A-G), baseada na sua morfologia [Patau, 1960]. Este sistema de nomenclatura foi proposto na conferência de Denver em 1960 [Denver Conference, 1960]. Mais tarde esta classificação foi oficialmente aprovada na conferência de Londres [London Conference, 1963], os cromossomas eram identificados com base no seu tamanho e posição do centrómero. Com a introdução das técnicas de bandagem, foi possível a rápida identificação dos cromossomas e das suas alterações nomeadamente deleções, duplicações, translocações, inversões e inserções. Na conferência de Paris, em 1971, foi introduzido um novo sistema para a classificação dos cromossomas, baseado nos padrões de bandagem-Q, G e R, permitindo a identificação de cada cromossoma e suas regiões [Paris Conference, 1971].



Figura 2 – Cariograma humano com um padrão de bandas GTG. Indivíduo do sexo feminino com cariótipo 46,XX [ISCN, 2013] (Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC).

Seguiu-se a publicação em 1978 de um novo documento, que incluía as decisões mais importantes das conferências de Denver, Londres e Paris, intitulado “An International System of Human Cytogenetic Nomenclature” [ISCN 1978]. Este sistema de nomenclatura é regularmente actualizado, a mais recente é de 2013 [ISCN 2013], sendo utilizada na rotina dos laboratórios de citogenética.

Contudo, as técnicas de rotina da citogenética têm uma resolução relativamente limitada de 400-550 bandas, o que permite a identificação de rearranjos estruturais até 3-10 Mb. A resolução global depende de diferentes parâmetros tais como: as características ópticas do microscópio, a qualidade das metafases e a maneira complexa como o DNA está compactado nos cromossomas. A cultura de linfócitos sincronizada, veio permitir a análise dos cromossomas em prometáfase com um maior nível de resolução e conseqüentemente a identificação de rearranjos mais subtis [Yunis, 1976]. No entanto, a similaridade e ambigüidade por vezes da interpretação das bandas cromossómicas, constitui um factor limitativo do nível de resolução. Esta barreira só foi possível de ultrapassar com o advento da área de Citogenética Molecular.

1.1.2 Citogenética Molecular

Esta nova área da citogenética veio permitir aumentar substancialmente o nível de resolução no diagnóstico dos rearranjos estruturais. A aplicação das técnicas de biologia molecular aos cromossomas teve por base a observação de que sequências de nucleótidos complementares podiam hibridizar entre si e formar complexos mais estáveis do que as sequências não complementares [Speicher e Carter, 2005].

A primeira experiência de hibridização *in situ* foi reportada em 1969 por Joe Gall e Mary Lou Pardue, que usaram a hibridização DNA-RNA para localizar os genes que codificam o RNA ribossómico [Gall e Pardue, 1969]. Estas hibridizações *in situ* dependiam da detecção radioactiva, seguindo-se em 1977 a introdução dos anticorpos marcados com fluorescência que reconheciam os híbridos DNA-RNA específicos [Rudkin e Stollar, 1977]. Mais tarde, começou a utilizar-se a associação química de um fluorocromo a uma sonda de RNA para a visualização rápida e directa, conhecida por *fluorescence in situ hybridization* [Bauman *et al.*, 1980].

1.1.2.1 *Fluorescence in situ Hybridization*

Os elementos essenciais da *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH) são a sonda de DNA e a sequência alvo. A sonda pode ser de marcação indirecta, se incluir um nucleótido associado a um hapteno com afinidade para o anticorpo que faz a detecção, ou de marcação directa se um dos nucleótidos incorporados na sonda já contém o fluoróforo. A aplicação da FISH como técnica para pesquisa de *loci* específicos, foi introduzida nos anos 80 [Van Prooijen-Knegt *et al.*, 1982], permitindo a detecção de anomalias cromossómicas directamente em metafase ou em núcleos em interfase. As sondas utilizadas podem ser originadas de *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC), *P1 Artificial Chromosome* (PAC), clones do tipo cosmídeo ou fosmídeo, ou a partir de produtos de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). A resolução depende do tamanho da sonda (> 50 kb – 2 Mb) e da sua especificidade.

Consoante a região alvo do estudo e o seu objectivo assim o tipo de sonda (sequência) e estratégia de hibridização a utilizar. As sondas para as regiões centroméricas (α -satélite) são muito utilizadas para a detecção de aneuploidias em interfase, para identificar a origem de cromossomas marcadores e derivativos de estrutura ambígua; as sondas β -satélite e das regiões satélite clássicas aplicam-se ao esclarecimento das regiões de heterocromatina com alterações dúbias de possível significado clínico (Fig. 3a); as sondas de sequência única, também designadas por *locus*-específicas, são utilizadas quando há uma suspeita clínica de uma síndrome de microdeleção (Fig. 3b). As sondas subteloméricas, um grupo particular do tipo *locus*-específicas, aplicam-se na pesquisa de rearranjos cromossómicos crípticos nas regiões terminais dos cromossomas (Fig. 3c). As sondas de “pintura” cromossómica, geradas a partir de um conjunto de clones específicos para um cromossoma (ambos os braços “p” e “q” ou com marcação diferencial para cada um deles), permitem caracterizar e identificar cromossomas ou segmentos cromossómicos de origem desconhecida (Fig. 3d). A FISH rapidamente se tornou uma técnica fundamental para a detecção rápida e com elevada sensibilidade tanto de anomalias numéricas como estruturais em metafase e interfase. Contudo, é uma técnica laboriosa estando limitada às sondas disponíveis, à sua resolução assim como ao número de *loci* que é possível testar em simultâneo ou às sucessivas hibridizações necessárias para chegar a um diagnóstico.

A sequenciação do genoma humano gerou um extraordinário recurso de clones mapeados e sequenciados, que têm vindo a revolucionar a citogenética molecular.

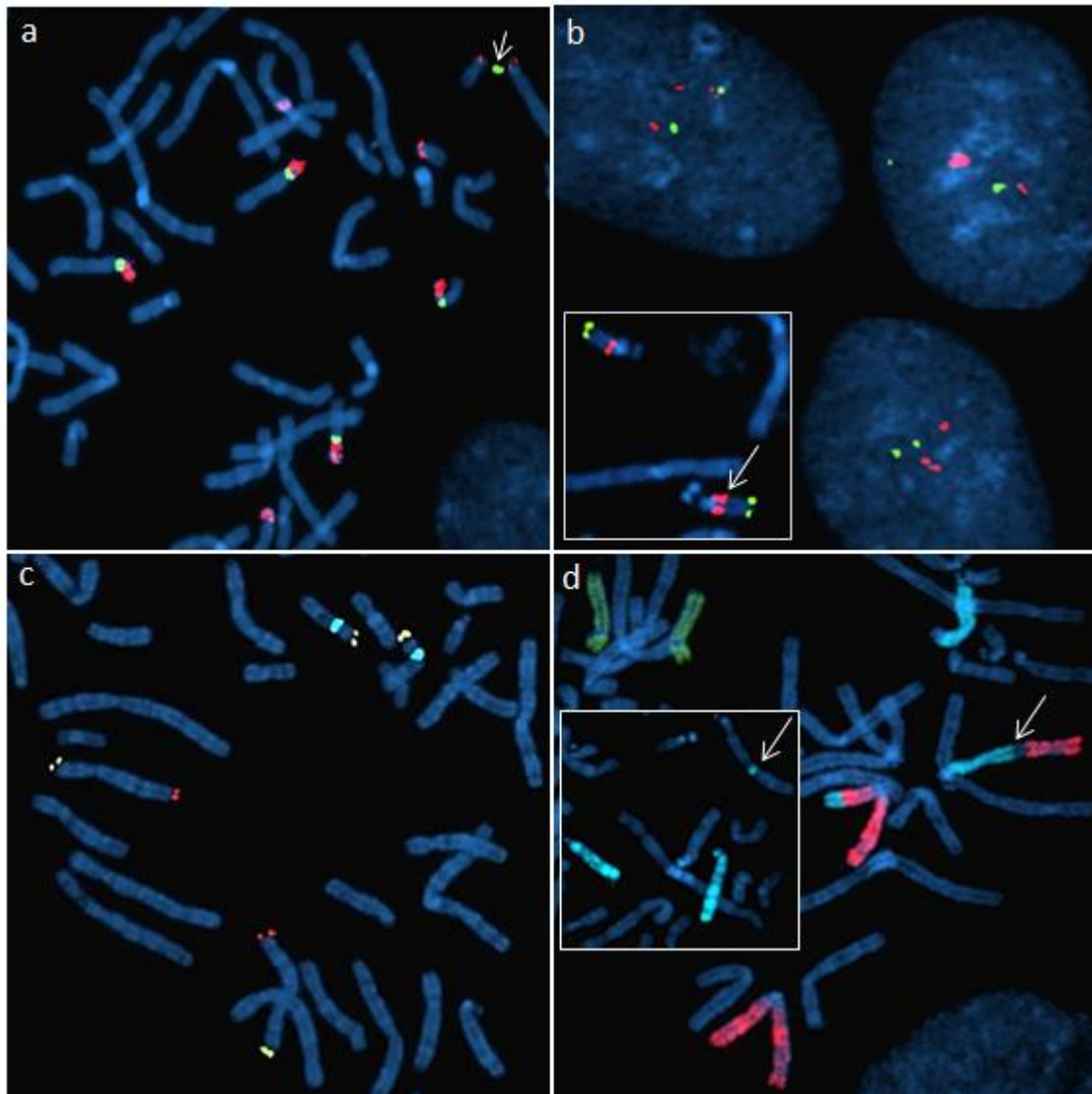


Figura 3 – Técnica de FISH com diferentes tipos de sondas de DNA (marcação directa). Aplicação a metafases/interfases obtidas pela cultura sincronizada de linfócitos: (a) sonda α -satélite para os centrómeros dos cromossomas 14 e 22 (verde), identificando a origem de um cromossoma marcador (\rightarrow), sonda para as regiões NOR marcando os braços curtos dos cromossomas acrocêntricos (vermelho); (b) sondas de sequência única: *locus* D22S75 (vermelho) na região crítica 22q11.2 associada à Síndrome de DiGeorge, um dos homólogos evidencia uma duplicação, sonda para região subtelo mérica (verde); (c) sondas subtelo méricas para o cromossoma 8 (8pter – verde; 8qter – vermelho) e para o braço curto do cromossoma 17 (vermelho/verde – amarelo); (d) sondas de pintura para os cromossomas: 3 (vermelho), 15 e 14 (azul “aqua” em duas áreas de hibridização) e 17 (verde), rearranjo complexo (3;15;14), a seta indica a região de inserção de material do cromossoma 14 no cromossoma derivativo 15 (Laboratório de Citogenética e Genómica da FMUC).

Com os avanços técnicos não só da biologia molecular, como dos métodos de detecção desenvolveram-se aplicações mais avançadas desde o *multicolor* FISH (M-FISH) ao *fiber* FISH. O M-FISH e o *Spectral Karyotyping* (SKY) são metodologias em que numa só experiência é possível marcar cada par cromossómico com um espectro de cor diferente, utilizando várias combinações e proporções dos diferentes fluorocromos [Speicher *et al.*, 1996; Schröck *et al.*, 1996]. Estas técnicas são muito úteis na caracterização de rearranjos complexos de células tumorais, que envolvam translocações ou inserções e na pesquisa da origem de cromossomas marcadores. A grande desvantagem do SKY e do M-FISH é que não detectam inversões, deleções e duplicações intracromossómicas. No entanto, esta barreira foi ultrapassada com o desenvolvimento das “pinturas” parciais para cada braço cromossómico e para regiões específicas de cada cromossoma, surgindo o *Multicolor Chromosome Banding* (MCB) [Liehr *et al.*, 2004]. O *fiber* FISH permite a detecção de deleções e duplicações de apenas algumas kilobases [Heng *et al.*, 1992; Wiegant *et al.*, 1992], utilizando fibras de cromatina estendidas e tendo a capacidade de caracterizar rearranjos cromossómicos complexos. A *fiber* FISH é um recurso poderoso no mapeamento de sequências de DNA, em regiões específicas do genoma, pois permite a exacta localização relativa e determinação da distância entre sequências adjacentes [Florijn *et al.*, 1995; Giles *et al.*, 1997].

Todas estas metodologias, desde a FISH mais básica aos protocolos mais avançados e especializados permitiram uma análise cada vez mais detalhada ao nível da morfologia dos cromossomas, mas num outro nível de resolução.

1.1.2.2 Comparative Genomic Hybridization

O princípio básico da técnica de FISH foi desenvolvido numa outra metodologia, a *Comparative Genomic Hybridization* (CGH), que permite analisar em simultâneo todo o genoma. Em vez das sondas, o DNA do paciente e um DNA de referência marcados com fluoróforos diferentes, são hibridizados em metafases de um controlo normal espalhadas em lâmina de vidro. Com um *software* adequado, o rácio de fluorescência é calculado ao longo da sequência de cada cromossoma, reflectindo o número de cópias relativo para cada região cromossómica do paciente comparativamente ao do genoma de referência [Kallioniemi *et al.*, 1992]. Esta técnica tornou possível a detecção de

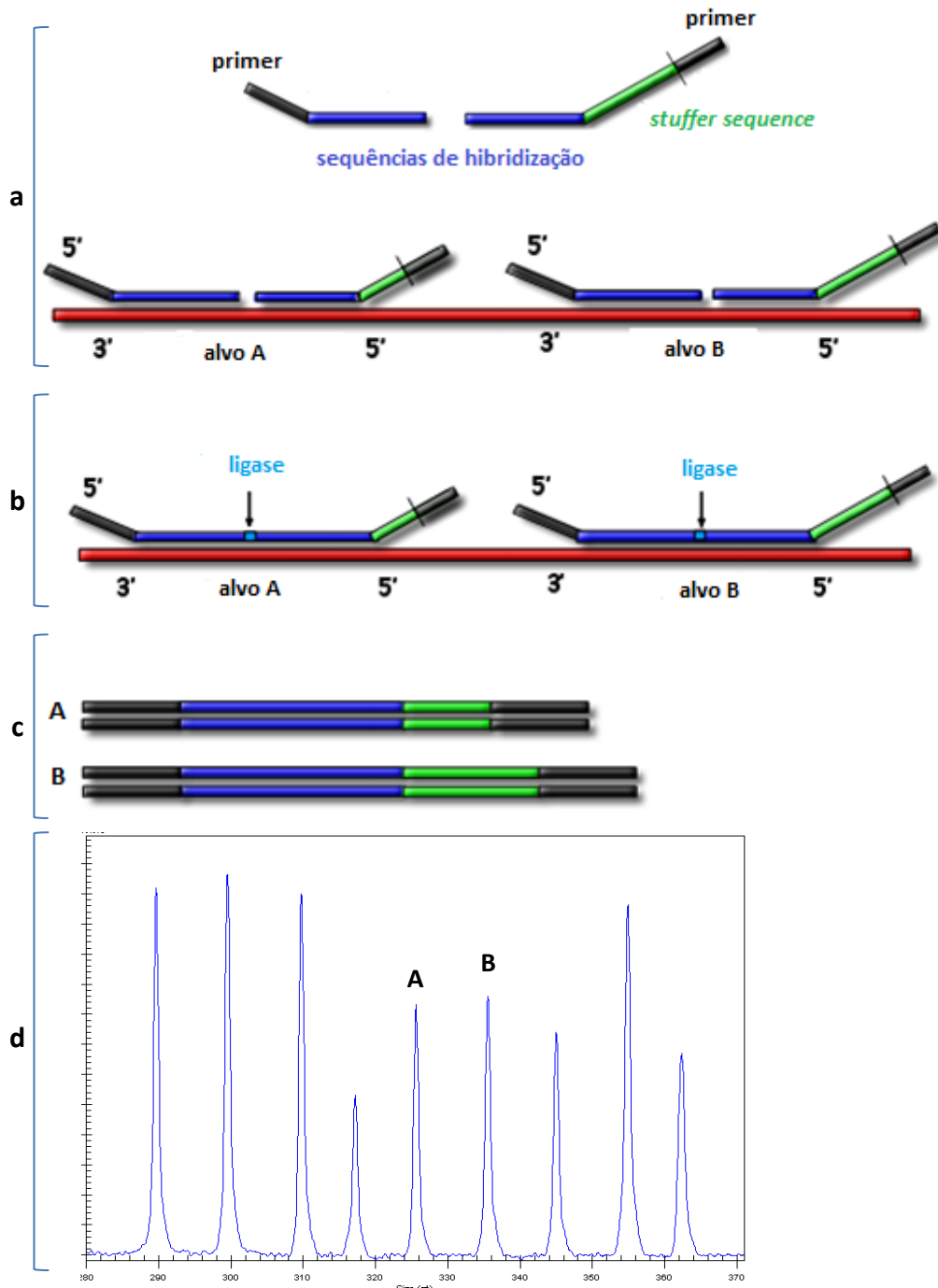
desequilíbrios cromossômicos em amostras onde não se conseguia realizar o estudo citogenético convencional, por insucesso da cultura ou falta de qualidade das metafases, como é o caso de algumas amostras tumorais.

1.1.2.3 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

No ano de 2002, Shouten e colaboradores descrevem um novo método para a quantificação rápida e precisa de mais de 40 sequências de DNA numa só experiência, a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Trata-se de uma técnica de PCR multiplex robusta, que se baseia na hibridização e ligação de duas sondas adjacentes complementares à sequência alvo (Fig. 4a). Só se a sequência alvo estiver presente ocorre hibridização e subsequentemente ligação das duas sondas (por uma ligase termoestável), esta sequência é que será o *template* para a amplificação por PCR (Fig. 4b). As diferentes sondas de uma mesma experiência têm sequências terminais comuns, logo podem ser amplificadas em simultâneo com apenas um par de *primers* universal (um deles marcado com um fluoróforo). Uma das duas sondas (para cada sequência alvo) contém ainda uma sequência *stuffer*, destinada a produzir um fragmento de tamanho pré-definido e cujo comprimento varia dentro de cada experiência para os diferentes *loci* alvo (Fig. 4c). Os produtos de PCR resultantes poderão ser separados por electroforese capilar de acordo com o seu tamanho e quantificados (Fig. 4d). A quantidade de produto de PCR, para cada sequência, é proporcional à quantidade de DNA alvo presente na amostra. O uso de vários fluoróforos para detecção, permite na mesma amostra combinar um maior número de sondas e aumentar a resolução da electroforese capilar [Schouten *et al.*, 2002; White *et al.*, 2004] .

A técnica de MLPA veio parcialmente substituir a técnica de FISH, tendo como principais vantagens: utilizar uma pequena quantidade de DNA (20 – 80 ng), dispensar cultura celular ou núcleos bem preservados; permitir o processamento de um maior número de amostras em simultâneo e maior rapidez da análise; permitir a pesquisa de um maior número de *loci* para uma mesma região ou mesmo várias regiões/genes em simultâneo; proporcionar uma maior fiabilidade e precisão na detecção de amplificações como duplicações e triplicações, que escapam muitas vezes à resolução da técnica de FISH. Mas, por outro lado não é adequada no caso da pesquisa e

caracterização de rearranjos cromossómicos estruturais, pois não detecta os equilibrados nem permite localizar as sequências para propor o seu mecanismo de formação. A MLPA não detecta ploidias, uma vez que se trata de uma quantificação relativa, nem permite um diagnóstico claro em situações de mosaicismo.



[adaptado de MRC-Holland, www.mlpa.com/]

Figura 4 – Esquema representativo da técnica de MLPA. (a) **Hibridização** das duas sondas adjacentes específicas para cada sequência alvo; (b) Reacção de **ligação** pela enzima ligase; (c) Produtos resultantes após a **amplificação** por PCR; (d) Separação por electroforese capilar e **quantificação**.

1.1.3 Array Comparative Genomic Hybridization

Em 1997 foi desenvolvida uma variante da CGH, a *array-based Comparative Genomic Hybridization* (array-CGH), em que o DNA do paciente e o DNA de referência são hibridizados num (*micro*)array de sondas de DNA imobilizadas numa lâmina de vidro segundo um modelo pré-definido [Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 1998]. O rácio de fluorescência é medido para cada *spot* do array, reflectindo o número de cópias do DNA teste relativamente ao de referência para o *locus* de cada sonda (Fig. 5).

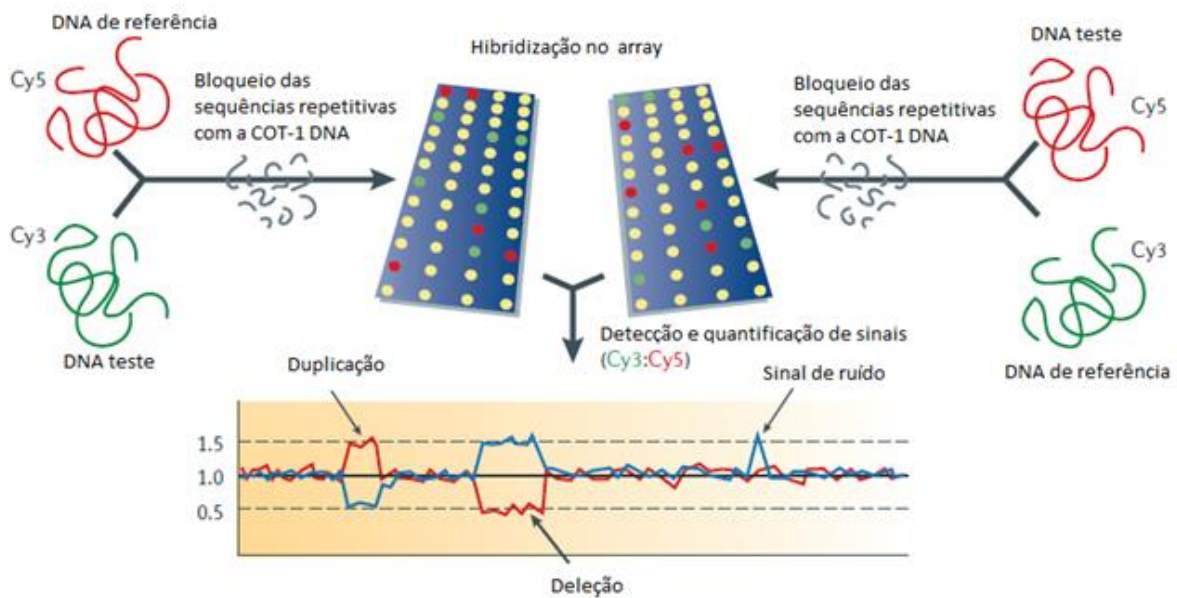


Figura 5 – Representação esquemática das etapas fundamentais da técnica de array-CGH: o DNA teste e de referência são marcados diferencialmente com os fluoróforos Cy3 ou Cy5, após o bloqueio das sequências repetitivas com a COT-1 DNA as amostras são hibridizadas no array; o dispositivo de array pode conter sequências do tipo BAC ou oligonucleótidos; após a hibridização o rácio de fluorescência (Cy3: Cy5), para cada “spot”, revela a diferença no número de cópias entre as duas amostras. Para cada amostra é realizada uma segunda hibridização com a marcação inversa, o método “dye-swap”, esta segunda análise reversa (linha azul) permite eliminar sinais de ruído que não serão observados na hibridização reversa [adaptado de Feuk *et al.*, 2006].

1.1.3.1 Array-CGH utilizando clones do tipo BAC

Estas plataformas de array eram construídas com clones do tipo BAC e PAC cobrindo todo o genoma (BAC array) e foram na sua maioria formatos produzidos no próprio laboratório e não comerciais [Solinas-Toldo *et al.*, 1997; Pinkel *et al.*, 1998]. Os BAC array permitiam a detecção de deleções e duplicações aproximadamente 100 vezes mais pequenas do que as identificáveis pela citogenética convencional. A sua resolução dependia da distância entre a posição genómica das sondas assim como do seu tamanho. As primeiras plataformas continham aproximadamente um clone por Mb (cerca de 3500 clones do tipo BAC cobrindo o genoma), seguindo-se um *array* com uma resolução 10 vezes superior (de 33000 BACs). Esta técnica baseia-se na hibridização competitiva do DNA teste e do DNA de referência marcados com fluoróforos diferentes Cy3 (*Cyanine 3*) ou Cy5 (*Cyanine 5*), num array com cada um dos clones BAC immobilizados. A leitura do array é realizada por um *scanner* de elevada resolução (10 μm), na imagem recolhida é calculado para cada *spot* a intensidade relativa da fluorescência de cada um dos fluoróforos. As regiões cromossómicas com sequências igualmente representadas nos genomas das duas amostras aparecem com um espectro amarelo, mas as que estão deletadas na amostra teste aparecem com predominância do verde (marcação do DNA de referência) e as regiões amplificadas surgem com predominância do espectro vermelho (marcação do DNA teste). Esta avaliação resulta em rácios de intensidade para cada um dos clones testados no array, reflectindo as alterações no número de cópias que podem ter um perfil de visualização consoante o *software* de análise utilizado.

A grande tendência de evolução das plataformas de array focou-se essencialmente num maior número de sequências testadas e numa diminuição do seu tamanho, ambas com grande impacto ao nível da resolução. Estas plataformas utilizaram desde clones do tipo BAC, YAC (*Yeast Artificial Chromosomes*) ou PAC (40-200 kb), seguiram-se os do tipo cosmídeo e fosmídeo (1.5-4.5 kb) [Pinkel e Albertson, 2005], clones de cDNA (0.5-2 kb), produtos de PCR (100 bp-1.5 kb) e oligonucleótidos (25-80 bp). Enquanto a resolução de um array cobrindo todo o genoma depende do número, distribuição e tamanho das sondas, a capacidade de detectar variação no

número de cópias depende do rácio sinal/ruído e das características de resposta da sonda [Ylstra *et al.*, 2006].

1.1.3.2 Array-CGH utilizando Oligonucleótidos

Os oligonucleótidos proporcionaram um elevado potencial de resolução para as plataformas de array-CGH, e cedo surgiram plataformas construídas de um modo automatizado com oligonucleótidos previamente sintetizados [Carvalho *et al.*, 2004]. Tal como para as plataformas de clones, um máximo de cerca de 60,000 oligonucleótidos pode ser aplicado no suporte do array (lâmina de vidro), de modo que a sua cobertura está limitada a 50 kb. Posteriormente, surgiram formas comerciais em que os oligonucleótidos são sintetizados directamente no suporte. A Agilent® e a OGT® utilizam aplicações tecnológicas que permitem a síntese dos oligonucleótidos “spot-by-spot”, tendo já atingido os 244,000 oligonucleótidos por array. A NimbleGen® utiliza uma tecnologia que permite a síntese dos oligonucleótidos por fotolitografia e atingiu os 385,000 oligonucleótidos por array, posteriormente surgiram plataformas de 2.1 milhões (HD2) e que potencialmente poderão atingir os 4.2 milhões de oligonucleótidos [Carter, 2007].

Uma desvantagem do array-CGH de oligonucleótidos (oligo array-CGH), é o fraco rácio sinal/ruído das hibridizações que leva a uma variação considerável nos rácios finais. Tipicamente, o desvio padrão dos rácios \log_2 num array de oligonucleótidos é da ordem de 0.25, enquanto na plataforma de BACs o desvio padrão é da ordem de 0.05. Além disso o sinal da sonda tende a ser suprimido pelas alterações de rácio. Por causa destas limitações, os resultados para alguns nucleótidos têm de ser normalizados (*averaged*) de forma a reduzir a variação dos valores dentro de limites aceitáveis, o que reduz o poder de resolução global do array [Carter, 2007]. Na prática o poder de resolução destas plataformas ficará entre 40-60 kb. As regiões do genoma mais ricas em sequências repetitivas têm uma menor cobertura relativamente às regiões mais ricas em genes com uma cobertura mais densa, pelas sondas presentes no array, o que lhes confere uma maior resolução. Estas plataformas podem ser construídas para projectos direccionados, uma vez que os oligonucleótidos podem ser desenhados de forma a atingir uma resolução quase ao nível do nucleótido, com uma sobreposição entre oligonucleótidos de um par de bases ao longo da

sequência da região de interesse. No caso dos pontos de quebra de translocações foi possível, com este tipo de abordagem, mapear estas regiões ao nível dos 4 bp [Gribble *et al.*, 2007].

1.1.3.3 Single Nucleotide Polymorphism array

Esta plataforma de array foi inicialmente desenvolvida para estudos genómicos de *linkage* e de associação em certas patologias. As sondas utilizadas são um tipo específico de oligonucleótidos, os *single nucleotide polymorphism* (SNP), depois também utilizadas na construção de plataformas de array para análise do número de cópias (Affymetrix® e Illumina®). A vantagem deste array é que para além da análise do número de cópias pode identificar perda de heterozigotia (LOH) ao nível do nucleótido. Estas plataformas são constituídas por oligonucleótidos de 25-mer, estando cada SNP representado por uma cadeia *sense* e *antisense*. No SNP array apenas um DNA genómico é hibridizado no array, as variações no número de cópias são identificadas por comparação com hibridizações independentes do controlo. A maior vantagem deste tipo de array é que pode ser utilizado tanto para análise do número de cópias como para estudos de genotipagem [Bignell *et al.*, 2004; Speicher e Carter, 2005].

1.2 A Variabilidade do Genoma Humano

A análise do genoma humano de dois indivíduos não aparentados permite-nos observar uma semelhança entre sequências de DNA que atinge cerca de 99,9%, resultando apenas em 3 milhões de pares de bases diferentes [Przeworski *et al.*, 2000; Reich *et al.*, 2002]. O projecto de sequenciação do genoma humano foi construído usando sobretudo o DNA de um único indivíduo, sendo assim não permitiu por si só um total esclarecimento sobre a extensão destas regiões variáveis. Para atingir este objectivo foi iniciado um outro projecto, o “International HapMap Project” [The International HapMap Consortium, 2003]. Este projecto tem por finalidade descrever os padrões comuns da variabilidade genética, proporcionando um recurso chave para os investigadores na sua procura de genes responsáveis por susceptibilidade ou resistência a patologias, a fármacos e factores ambientais. A maioria destes estudos sobre a variabilidade do genoma humano focaram-se nos SNPs. No entanto, as regiões

variáveis do genoma humano podem envolver apenas um nucleótido até segmentos cromossômicos superiores a 10 Mb.

1.2.1 Variantes Genómicas

As primeiras diferenças observadas na constituição genética dos indivíduos consistiam em alterações no número e estrutura dos cromossomas. Algumas destas alterações, como é o caso das aneuploidias e de alguns rearranjos estruturais desequilibrados, estavam muitas vezes associadas a patologia, mas outras não como os heteromorfismos [Verma *et al.*, 1978] e os pontos de fragilidade [Gardner e Sutherland, 2004], sendo identificáveis ao microscópio. Estas variantes de tamanho igual ou superior a 3 Mb podem definir-se como variantes estruturais microscópicas. Com o advento da biologia molecular e em particular das técnicas de sequenciação, observaram-se alterações muito mais pequenas. Estas variações incluíam SNPs, repetições de pequenas sequências de DNA designados por *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs, por exemplo mini- e microsatélites), e pequenas (< 1 kb) inserções, deleções, inversões e duplicações [Wright, 2003].

Estima-se que existam pelo menos 10 milhões de SNPs na população [Kruglyak e Nickerson, 2001], o que dá em média 1 em cada 300 nucleótidos de entre os ~3 biliões de pares de nucleótidos que constituem o genoma de cada indivíduo. Com as plataformas de array tem sido possível revelar variações na sequência do genoma humano de ~1 kb a 3 Mb, consideradas variações estruturais submicroscópicas [Feuk *et al.*, 2006]. Nos últimos anos foram descritas centenas de *Copy Number Variants* (CNVs) submicroscópicas e inversões do genoma humano [Tuzun *et al.*, 2005; Sharp *et al.*, 2005].

Uma *Copy Number Variant* (CNV) é definida como um segmento de DNA no mínimo de 1 kb que difere no número de cópias relativamente a um genoma de referência representativo da população. A designação de “CNV” não implica significado clínico, assim sendo a classificação em CNV benigna ou patogénica é necessária, também não está implícito o número de cópias relativo, se é deleção ou duplicação terá de ser especificado [Kearney *et al.*, 2011]. Esta designação atribui-se a variantes que se observam com uma frequência <1% na população, caso contrário denomina-se polimorfismo ou seja *Copy Number Polimorphism* (CNP) [Feuk *et al.*, 2006].

O conceito de desequilíbrio genômico refere-se a perda ou ganho na sequência do genoma cuja expressão pode resultar em fenótipo patológico. Estes desequilíbrios podem ser originados por recombinação homóloga não-alélica em regiões de duplicações segmentais, por *non-homologous end-joining*, por *fork stalling and template switching* ou ainda por um mecanismo denominado de *chromothripsis*. Estes mecanismos podem ocorrer na meiose (células germinativas), mas também podem ocorrer nas células somáticas levando a situações de mosaicismo e ao processo de carcinogénese [Gu *et al.*, 2008].

1.2.2 Mecanismos na Origem da Variabilidade Genómica

1.2.2.1 Recombinação Homóloga Não-Alélica

As espécies diplóides têm uma vantagem evolutiva significativa através do mecanismo que ocorre na meiose e que se designa por recombinação homóloga. Este processo pode resultar do *crossover* entre cromossomas homólogos e consequentemente na troca de segmentos genómicos. O *crossing over* foi pela primeira vez descrito por Thomas Hunt Morgan [1911], ocorre entre as sequências homólogas emparelhadas, durante a prófase I, havendo quebra e re-união com troca de segmentos [Morgan, 1911]. Se a quebra ocorrer no mesmo *locus* das sequências de pares de bases, o resultado é apenas a troca de segmentos cromossómicos entre os homólogos parentais, o resultado é normal gerando apenas variabilidade. Contudo, neste processo propicia-se muitas vezes a ocorrência de erros. A homologia de sequência entre repetições pode originar um alinhamento imperfeito entre cromatídeos, não exactamente entre sequências correspondentes, levando a um *crossing over* desigual. Estes erros serão muito provavelmente os responsáveis pela formação de VNTRs, ocorrendo por todo o genoma [Ostertag *et al.*, 2003]. Se as regiões repetitivas são de maior tamanho, designam-se por elementos *Low Copy Repeat* (LCR) ou duplicações segmentais (1–200 kb), sendo estas muito abundantes nas regiões pericentroméricas e subteloméricas [Bailey *et al.*, 2001; Eichler, 2001; Bailey *et al.*, 2002]. Se ocorrer *crossing over* entre regiões de LCRs pode resultar na duplicação de genes num dos homólogos e deleção no outro, este processo denomina-se recombinação homóloga

não-alélica (*Non Allelic Homologous Recombination* – NAHR) [Emanuel e Shaikh, 2001].

Este mecanismo medeia muitas das microdeleções e microduplicações recorrentes (Fig. 6a), nomeadamente das síndromes associadas às regiões 22q11.2, 7q11.23 e 17p11.2.

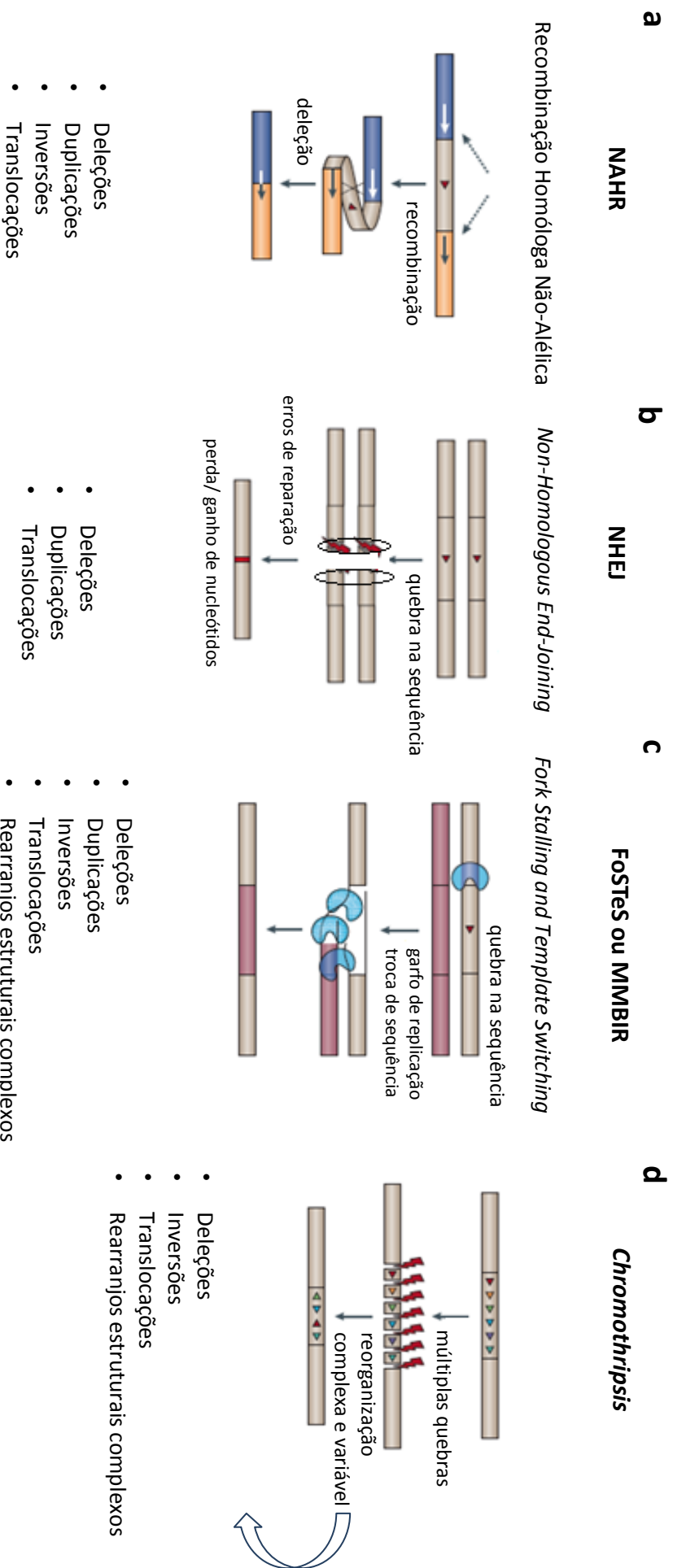
1.2.2.2 Non-Homologous End-Joining

Um outro mecanismo envolvido nos rearranjos genómicos, mas entre regiões não homólogas, denomina-se *Non-Homologous End-Joining* (NHEJ). Pensa-se ser responsável por muitas das translocações associadas à carcinogénese ou por microdeleções e translocações não recorrentes (Fig. 6b). É a via principal de reparação das quebras do DNA de cadeia dupla nas fases do ciclo celular G0, G1 ou início da S [Lieber *et al.*, 2003]. Algumas das enzimas envolvidas na re-ligação directa ou NHEJ, estão também envolvidas no processo de recombinação V(D)J que ocorre durante a maturação das células B e T e que é responsável pela variabilidade dos genes que codificam para as imunoglobulinas e receptores das células T [Grawunder *et al.*, 1998].

1.2.2.3 Fork Stalling and Template Switching

Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) é um mecanismo baseado na replicação ao contrário dos mecanismos de NAHR e NHEJ que se baseiam na recombinação. Este mecanismo está na origem de alguns rearranjos complexos não recorrentes responsáveis por patologias como a doença de Pelizaeus-Merzbacher [Lee *et al.*, 2007] e as duplicações e triplicações do gene *MECP2* [del Gaudio *et al.*, 2006]. No mecanismo de FoSTeS é proposto que durante a replicação do DNA, o “garfo” de replicação pára quando encontra uma quebra na sequência, muitas vezes junto a regiões de LCRs. A cadeia de síntese solta-se gradualmente e liga-se a outra região com microhomologia (*Microhomology-Mediated Break-Induced Replication* - MMBIR) [Hastings *et al.*, 2009] e com o garfo de replicação activo, podendo evoluir na direcção 5’ para 3’ ou inversa, esta região pode estar fisicamente próxima mas à distância linear de algumas megabases (Fig. 6c). Este processo pode repetir-se e originar rearranjos complexos incluindo duplicações, triplicações, deleções e inversões [Lee *et al.*, 2007].

Figura 6 - Variantes estruturais - mecanismos de formação e rearranjos resultantes.



[adaptado de Weischenfeldt *et al.*, 2013]

1.2.2.4 Chromothripsis

Este mecanismo resulta da reparação da sequência de DNA após um fenómeno súbito que origina múltiplas quebras na cadeia (*shattering*), formam-se numerosos segmentos com a subsequente reparação do DNA que é propícia à ocorrência de erros e vários rearranjos (Fig. 6d). Este mecanismo ocorre não só no contexto da carcinogénese como nas linhas germinativas [Weischenfeldt *et al.*, 2013].

1.3 Patologias do Neurodesenvolvimento e Comportamento

1.3.1 Défice Intelectual

O défice intelectual (DI), designação que veio substituir a de “atraso mental” [Schalock *et al.*, 2007], é um distúrbio do sistema nervoso central de grande heterogeneidade clínica e genética.

O DI envolve limitações nas capacidades cognitivas com impacto no funcionamento adaptativo em três domínios, estes domínios determinam o modo como um indivíduo se adapta aos aspectos da vida diária. O domínio conceptual, engloba a linguagem, leitura, escrita, matemática, conhecimentos e memória; o domínio social refere-se à empatia, atitude social, comunicação interpessoal e capacidade de estabelecer e manter relações de amizade; e o domínio prático de cuidado pessoal, relação com as responsabilidades de trabalho e escolares, e outros aspectos práticos da rotina diária. Os seus sintomas começam a manifestar-se durante o desenvolvimento e o seu diagnóstico é baseado na gravidade dos défices do funcionamento adaptativo. É um distúrbio crónico que muitas vezes ocorre em simultâneo com outros distúrbios mentais como a depressão, a hiperactividade e défice de atenção e o espectro do autismo [American Psychiatric Association, 2013].

Pelas novas directrizes da Sociedade Americana de Psiquiatria, descritas no *Diagnostic and statistic Manual of Mental Disorders* (DSM-5), o diagnóstico do DI deve basear-se tanto na avaliação clínica como nos testes *standard* de inteligência, mas a determinação da sua gravidade deve basear-se na função adaptativa em vez de apenas nos valores do quociente de inteligência (QI) que no caso do DI apresenta valores iguais ou inferiores a 70 [American Psychiatric Association, 2013].

Estima-se que 2 a 3% de indivíduos da população geral sofram de DI, com uma frequência 1.3 a 1.9 superior no sexo masculino relativamente ao feminino. Contudo, a prevalência é bastante variável entre estudos pela diversidade de grupos avaliados, das metodologias e critérios utilizados. Se o DI for a única manifestação clínica é denominado de não-sindrómico, se estiver associado com outras anomalias físicas e/ou do comportamento, é denominado de sindrómico [Winnepenninchx *et al.*, 2003].

1.3.2 Autismo

O autismo (MIM#209850) engloba um grupo heterogéneo de distúrbios do neurodesenvolvimento, denominando-se por isso de Perturbações do Espectro do Autismo (PEA).

As PEA caracterizam-se por limitações funcionais em três áreas do neurodesenvolvimento: interação social, comunicação/linguagem, e comportamento repetitivo (restrito e/ou estereotipado). As manifestações clínicas surgem na maioria dos casos antes dos 3 anos de idade, ocorrendo predominantemente no sexo masculino numa proporção de 4:1. Concomitantemente às manifestações da PEA, verifica-se em cerca de 75% dos casos a presença de DI, convulsões em 15 a 30%, Perturbação da Hiperactividade e Défice de Atenção (PHDA) em 59-75% dos casos, esquizofrenia em 5%, distúrbio obsessivo-compulsivo em cerca de 60% e anomalias electroencefalográficas em 20 a 50% dos casos [Fombonne, 2001].

O diagnóstico baseia-se na observação clínica. Existem dois instrumentos de diagnóstico considerados o *gold standard*: o “*Autism Diagnostic Interview-Revised*” (ADI-R) que se baseia numa entrevista aos pais semi-estruturada [Lord *et al.*, 1997], e o “*Autism Diagnostic Observation Schedule*” (ADOS) que utiliza observação e interacção com a criança [Lord *et al.*, 2000]. No contexto clínico é muito utilizado o “*Childhood Autism Rating Scale*” (CARS), para quantificação da gravidade [Schopler *et al.*, 1991]. O “*Modified Checklist for Autism in Toddlers*” (M-CHAT), desenvolvido no fim dos anos 90, é um breve questionário relativo ao desenvolvimento e comportamento da criança, utilizado entre os 18 e os 24 meses, com o objectivo de rastrear precocemente as PEA [Robins *et al.*, 2001].

As PEA apresentam uma prevalência que varia entre 0.9-2,6% [Kogan *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011], a prevalência em Portugal é de aproximadamente 10 por

10000 crianças do 1º ciclo [Oliveira *et al.*, 2007]. Existem fortes evidências de estudos familiares para o envolvimento de factores genéticos no autismo. A taxa de recorrência das situações de autismo quando já existe um caso índice é de 8-10%, 25 vezes superior à da população em geral [Abrahams e Geschwind, 2008]. Vários estudos têm demonstrado uma elevada taxa de concordância (88%) entre gémeos monozigóticos relativamente aos dizigóticos (31%) [Rosenberg *et al.*, 2009].

O DI e as PEA são distúrbios do neurodesenvolvimento que se cruzam muitas vezes tanto nas suas manifestações clínicas como na etiologia. As causas genéticas são muitas vezes comuns, embora com frequências de manifestação distintas, passando tanto pelas aneuploidias como a Síndrome de Down e a Síndrome de Turner, pelas síndromes de genes contíguos nomeadamente a Síndrome de Angelman, a duplicação 15q11q13, a microdeleção 22q13, a microdeleção/duplicação 16p11.2, como pelas alterações monogénicas tanto autossómicas como ligadas ao cromossoma X. A Síndrome de X-frágil é a forma familiar mais comum, em particular no sexo masculino, no caso do DI.

1.4 Desequilíbrios Genómicos na Etiologia do Défice Intelectual, Autismo e Anomalias Congénitas

Os desequilíbrios genómicos podem ser cromossómicos (microscópicos), segmentos genómicos submicroscópicos, ou monogénicos. Na realidade mesmo quando estão envolvidos segmentos com vários genes em deleção ou duplicação ou apenas um gene, as anomalias fenotípicas podem ser resultantes da alteração na expressão de um único gene, entre os vários envolvidos no desequilíbrio, ou ao efeito pleiotrópico do único gene mutado.

1.4.1 Anomalias Cromossómicas

A Síndrome de Down (trissomia 21) continua a representar a causa genética mais comum de défice intelectual (ligeiro a moderado), com uma incidência 1/800 nados vivos [Roizen e Patterson, 2003]. Esta síndrome é acompanhada por anomalias craniofaciais, hipotonia, mas também são frequentes malformações *major* nomeadamente a nível cardíaco, risco elevado para leucemia linfocítica aguda entre

outras patologias. No entanto apenas alguns dos genes envolvidos foram identificados como responsáveis pela sua patofisiologia [Antonarakis *et al.*, 2004].

Para além das aneuploidias, outras cromossomopatias como rearranjos estruturais desequilibrados incluindo derivativos de translocações ou inserções, cromossomas recombinantes, deleções, duplicações, cromossomas marcadores, podem ser diagnosticados pela citogenética convencional com uma resolução de 3-10 Mb. Estes rearranjos são responsáveis por 10-15% dos casos de DI [Rauch *et al.*, 2006; Ropers, 2008], muitas vezes associado a distúrbios do espectro do autismo e/ou malformações congénitas.

1.4.2 Aneusomias Segmentais e as Síndromes de Genes Contíguos

As aneusomias segmentais são desequilíbrios genómicos que podem envolver deleções e/ou duplicações. Quando um grupo de genes adjacentes de uma determinada região cromossómica está envolvido numa patologia, de um modo recorrente, é utilizada a designação de síndrome de genes contíguos [Schmickel, 1986]. Algumas síndromes de microdeleção começaram por ser identificadas pela citogenética convencional, nomeadamente as síndromes de Prader-Willi/Angelman [Butler *et al.*, 1986] e a síndrome de Wolf-Hirschhorn [Hirschhorn *et al.*, 1965; Wolf *et al.*, 1965]. Mas só com o advento das técnicas de citogenética molecular, primeiro a FISH e mais tarde a MLPA, foi possível uma detecção rápida e precisa destas alterações geralmente submicroscópicas confirmando o diagnóstico clínico, com uma prevalência global de 5,3% [Rauch *et al.*, 2006], nomeadamente nas síndromes de Williams-Beuren, Velo-Cardio-Facial, Smith-Magenis e Miller-Diecker. O rastreio das regiões subtelo méricas veio ainda permitir o diagnóstico em 2,5 a 5 % dos casos com DI, muitas vezes também associado a distúrbios do comportamento e malformações congénitas [Knight *et al.*, 1999].

A implementação das técnicas de microarray na citogenética clínica levou à sua aplicação a grandes grupos de pacientes com DI, outros distúrbios do neurodesenvolvimento como o autismo, muitas vezes com malformações congénitas associadas. Consequentemente a identificação de CNVs específicas destes pacientes relativamente aos controlos conduziu à rápida descoberta de um grande número de

novas síndromes de microdeleção e microduplicação associados a estes distúrbios do desenvolvimento [Mefford e Eichler, 2009]. No entanto, a genómica aumentou de tal forma o leque de diagnósticos que a grande maioria das vezes as alterações encontradas não são até à data recorrentes e levantam dúvidas quanto à sua causalidade, torna-se assim necessário não só estruturar como aumentar o intercâmbio de informação na comunidade científica de forma a que o número de CNVs com significado incerto seja cada vez menor.

1.4.3 Interpretação das CNVs – princípios e dilemas

A ocorrência das CNVs no genoma e os dilemas da interpretação da sua patogenicidade, constituem desafios comuns e de longa data que são do conhecimento dos geneticistas desde os primeiros diagnósticos das cromossomopatias.

Em 50 anos de experiência da citogenética convencional algumas regras gerais foram sendo formuladas e aplicadas na interpretação das variantes cromossómicas. É no entanto expectável que na nova era da genómica, com as técnicas de array-CGH que proporcionam uma resolução ao nível submicroscópico atingindo alguns pares de nucleótidos, os desafios que surgem na sua interpretação sejam maiores ou mesmo mais complexos. Torna-se assim imperativo na sua análise determinar:

- que CNVs são benignas, sem relação com o fenótipo;
- quais estão associadas à patologia, sendo causais;
- quais permanecem sem classificação com “significado incerto”.

1.4.3.1 Variantes frequentes na população – benignas

O reconhecimento de uma variante benigna deve estar bem documentado de forma a poder ser utilizado para fins de diagnóstico. Estudos colaborativos em larga escala de grupos populacionais “normais” resultaram numa listagem acessível das denominadas CNVs “benignas”. Na tentativa de mapear estas variantes, plataformas de array com uma resolução cada vez superior foram sendo aplicadas com o objectivo de identificar CNVs sem consequências ou com um impacto *minor* ao nível dos genes [Wong *et al.*, 2007; de Smith *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2008]. Existem contudo vários genes parcial ou

totalmente incluídos nestas regiões variáveis aparentemente benignas, cerca de 68% de 800 CNVs reportadas com uma frequência de pelo menos 3% (de nível polimórfico) são sobreponíveis à sequência de genes [Wong *et al.*, 2007] e 14,5% dos genes estão descritos associados a patologia [Redon *et al.*, 2006]. Durante a interpretação das CNVs toda esta informação deve estar acessível e facilmente visualizável.

Após a publicação dos primeiros artigos que reportavam a prevalência de CNVs no genoma de indivíduos saudáveis, clinicamente sem patologia [lafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004], surge a necessidade de catalogar esta informação num formato acessível à comunidade científica, tanto a investigadores como clínicos. Com este objectivo foi criada uma base que reúne variações estruturais do genoma humano, de tamanho superior a 50 kb, a *Database of Genomic Variants* (DGV) [MacDonald *et al.*, 2014]. Esta informação tanto pode ser consultada directamente na base de dados [<http://dgv.tcag.ca/>], como através de outros *browsers* do genoma incluindo a UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Browser [<http://genome.ucsc.edu/>].

1.4.3.2 CNVs raras Herdadas – são benignas?

Considerando o princípio de que se um progenitor saudável é portador de uma CNV pouco frequente, esta será muito provavelmente uma variante benigna, sobretudo se estiver presente em uma ou mais gerações sem causar patologia. No entanto, é preciso ter sempre presente a penetrância incompleta e expressividade variável observada na herança de microdeleções e microduplicações associadas a síndromes já reportadas. Existem ainda outras condicionantes da expressão génica, nomeadamente os genes sujeitos ao processo de *imprinting*, só expressos pelo alelo herdado de um dos progenitores e “silenciados” no outro alelo. Também uma CNV em deleção pode levar à expressão do outro alelo, associado a uma patologia autossómica recessiva. Sendo assim, mesmo no caso de uma CNV herdada por vários indivíduos através de numerosas gerações como uma variante benigna, a herança do segundo progenitor quer de um gene mutado ou da mesma CNV no caso da co-sanguinidade, poderá conduzir a que a mesma CNV deixe de ser “benigna” [de Ravel, 2009].

1.4.3.3 CNVs recorrentes associadas a um fenótipo específico

Tal como aconteceu na citogenética convencional, desde a trissomia 21 associada à Síndrome de Down, às várias síndromes de microdeleção já estabelecidas, a sua patogenicidade ficou comprovada pela recorrente associação a um determinado fenótipo.

Com as técnicas de array-CGH a grande maioria das CNVs observadas são até à data raras, não havendo outros casos previamente reportados, o que dificulta a sua interpretação. De modo a que seja possível progressivamente estabelecer a causalidade num maior número de CNVs relativamente a um determinado fenótipo, é necessária a recolha de um grande número de genótipos e fenótipos associados. Assim, têm sido criadas bases de dados em algumas universidades e consórcios internacionais nomeadamente a *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER), que estimulam este processo de recolha contribuindo para uma interpretação mais robusta dos desequilíbrios genómicos potencialmente patogénicos. É também disponibilizada uma listagem das síndromes, algumas já uma entidade na base de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), que constitui também um catálogo dos genes e das patologias genéticas humanas.

Com a nova era da genómica novas síndromes de microdeleção e microduplicação têm sido estabelecidas [Mefford e Eichler, 2009]. Algumas das novas microdeleções foram identificadas em pacientes com quadros clínicos semelhantes, sendo consideradas sindrómicas, como é exemplo da microdeleção 17q21.31 descrita por três grupos em simultâneo [Koolen *et al.*, 2006; Sharp *et al.*, 2006; Shaw-Smith *et al.*, 2006]. Esta síndrome está associada a DI moderado a severo, hipotonia, dismorfismos faciais, ocasionalmente anomalias cardíacas ou renais e convulsões. É uma microdeleção de 500 a 650 kb, submicroscópica, *de novo* e nunca observada em amostras controlo de indivíduos saudáveis, estima-se uma prevalência de 1 em 16.000 indivíduos [Koolen *et al.*, 2008]. A deleção na região 15q24, muito mais rara e de tamanho mais variável, foi observada em pacientes com um quadro de DI, atraso grave na linguagem, dismorfismos, hipotonia, hiperlaxidez dos joelhos, e manifestações do espectro do autismo [Mefford *et al.*, 2012]. Mas, outras microdeleções e

microduplicações também recorrentes estão associados a um fenótipo muito variável. As deleções na região 1q21.1 estão associadas a graus muito variáveis de DI, nalguns casos microcefalia ou mesmo esquizofrenia, muitas vezes herdadas de um progenitor com um quadro ligeiro ou mesmo sem alterações. Já duplicações da mesma região têm sido associadas a quadros de DI moderado a ligeiro, macrocefalia e manifestações do espectro do autismo [Brunetti-Pierri *et al.*, 2008]. Outra CNV de expressão muito variável é a deleção 16p11.2, identificada em pacientes com PEA com uma frequência >1% [Weiss *et al.*, 2008], mas nalguns apenas está presente o DI [Rosenfeld *et al.*, 2009] e noutros pacientes a obesidade precoce com ou sem DI [Walters *et al.*, 2010].

1.4.3.4 CNVs maiores serão mais provavelmente causais

Tal como já acontecia na citogenética, quando uma CNV não corresponde a uma síndrome reconhecida, muitas vezes o seu tamanho é correlacionado com a causalidade. Contudo, mesmo as grandes CNVs, muitas vezes superiores a 1 Mb podem ser observadas em indivíduos “normais”, o tamanho pode ser um indicativo mas nunca por si só um bom determinante da causalidade. Surge assim, a necessidade de consultar as bases de dados para a interpretação de cada CNV identificada durante a análise por array-CGH.

A história familiar e um exame clínico detalhado são co-adjuvantes essenciais durante o processo de interpretação das CNVs, devem ser registados e disponibilizados ao laboratório. A utilização de bases de dados com a informação estruturada, com as interfaces necessárias a outras fontes de informação, não só das CNVs frequentes na população, como das síndromes reconhecidas com diferentes graus de penetrância, detalhes dos genes envolvidos e patologias associadas, informação de pacientes semelhantes já reportados, devem ser convenientemente consultadas. Esta análise permitirá fundamentar e sempre que possível tirar conclusões sobre a causalidade de cada CNV.

1.4.3.5 O novo paradigma das CNVs mendelianas

As CNVs podem ser classificadas de acordo com as categorias genéticas convencionais de transmissão mendeliana. Existem CNVs aparentemente benignas responsáveis por distúrbios autossômicos recessivos, autossômicos dominantes, ligados ao X ou associadas a *imprinting*.

CNVs associadas a distúrbios de transmissão autossômica recessiva

Por analogia às patologias de transmissão autossômica recessiva, nas CNVs autossômicas recessivas a patologia resulta da ausência do produto correcto codificado por um determinado gene localizado num *locus* específico dentro dessa região. O que poderá resultar quer da nulissomia desse *locus*, quer da combinação de uma microdeleção que inclua o gene, total ou parcialmente, num dos homólogos e uma mutação pontual no outro alelo. Muito frequentemente resultam da herança de alelos nulos, um de cada progenitor, mas que no estado de hemizigotia são CNVs benignas. O seu risco de recorrência é de 25%, e a sua prevalência está relacionada com a frequência da CNV na população.

Um exemplo de uma microdeleção intragénica numa região variável é a Síndrome de Cohen. Esta é caracterizada por défice intelectual moderado a severo, microcefalia, obesidade do tronco, um facies típico com distrofia da retina e miopia acentuada. É uma síndrome autossômica recessiva provocada por mutações no gene *COH1*. No entanto, em cerca de 36% dos pacientes cumprindo os critérios clínicos, apenas um alelo ou mesmo em nenhum deles se encontra a mutação por sequenciação [Kolehmainen *et al.*, 2003]. Este *locus* é contudo muito coberto por CNVs reportadas na DGV. Nalguns pacientes têm sido no entanto identificadas deleções intragénicas quer em homozigotia, quer em heterozigotia composta, com um dos alelos com uma microdeleção e o outro com uma mutação pontual [Balikova *et al.*, 2009].

Mas uma patologia não ocorre só por perda de função, mesmo no caso da transmissão autossômica recessiva. Também a amplificação em vários números de cópias para determinados *loci*, envolvendo genes críticos em sobre expressão, pode tornar-se patogénica. A mesma CNV pode ser inócua no caso dos progenitores portadores de uma, duas ou mais cópias, mas quando transmitida nos dois alelos o

número total de cópias no descendente pode já ter um efeito patogénico. Exemplo é o caso da susceptibilidade à psoríase, associada a um número elevado de cópias (>12) do cluster de genes da β -defensina [Hollox *et al.*, 2008].

CNVs de transmissão autossómica dominante, com penetrância e expressão variável

Num grupo de 5218 pacientes com défice intelectual e/ou malformações congénitas, foi realizado um *screening* com uma plataforma de BAC array, identificaram-se 25 pacientes com uma microdeleção recorrente de 1.35 Mb em 1q21.1 [Mefford *et al.*, 2008]. Em nove pacientes a microdeleção foi herdada de um progenitor com um fenótipo ligeiro ou mesmo sem manifestações aparentes. Em oito crianças observou-se a microduplicação recíproca. Brunetti-Pierri e colaboradores [2008] descreveram 21 pacientes com a mesma microdeleção 1q21.1 e 15 com a microduplicação. Concluíram também que esta CNV apresenta uma expressão fenotípica variável com penetrância incompleta, embora mostre uma consistência estatística da microcefalia associada à deleção e a macrocefalia à duplicação, existindo já um gene candidato o *HYDIN2*, com base na categorização dos pontos de quebra e conteúdo génico envolvido. Apenas a microduplicação foi observada em baixa frequência num grupo controlo de 4737 indivíduos [Mefford *et al.*, 2008].

Na região 16p13.11 encontra-se mais uma síndrome de microdeleção com penetrância incompleta e expressão variável, associada a DI e/ou malformações congénitas. Esta CNV tem muito provavelmente origem num mecanismo de NAHR, sendo uma região flanqueada por regiões LCR. A proporção de deleções e duplicações num grupo de 1027 pacientes foi igual com grande homologia no segmento envolvido (~1.65 Mb) o que sugere um mecanismo recíproco de formação. Apenas a duplicação foi observada num grupo controlo de 2014 indivíduos, podendo representar uma variante benigna [Hannes *et al.*, 2009].

CNVs herdadas ligadas ao cromossoma X

As deleções e duplicações envolvendo segmentos do cromossoma X têm um efeito análogo às patologias monogénicas também ligadas ao X. As deleções poderão originar perda de função, enquanto as duplicações poderão originar sobre expressão (no caso

de genes susceptíveis) ou perda de função quando o ponto de quebra interrompe a sequência de um gene.

No caso de deleções que envolvem genes associados a patologia de expressão recessiva, a hemizigotia do cromossoma X no caso masculino determina a manifestação do distúrbio. As deleções e duplicações ligadas ao X são geralmente herdadas da mãe sem manifestações, já que o pai evidenciará também a patologia. No entanto, o padrão de inativação do cromossoma X é geralmente aleatório, salvo quando a mutação envolve genes essenciais em que este X é preferencialmente inativado. Sendo assim a mesma CNV pode ter expressões variáveis mesmo num indivíduo do sexo feminino herdada por via materna. Já no caso das CNVs ligadas ao X de expressão dominante, tanto nas deleções como amplificações é determinante nas portadoras do sexo feminino o padrão de inativação do cromossoma X e a expressão do gene envolvido. É essencial que nas bases de dados todas as CNVs ligadas ao cromossoma X evidenciem o sexo do seu portador, só assim poderá ser correctamente interpretada a sua patogenicidade.

CNVs “imprinted”

O “imprinting” é um mecanismo biológico que determina que alguns genes sejam diferencialmente expressos dependendo da sua origem paterna ou materna. Este mecanismo envolve modificações epigenéticas que podem ocorrer no alelo paterno ou materno ou em ambos durante a gametogénese. Se a CNV envolver estes *loci*, as manifestações fenotípicas só surgirão se a herança for do progenitor que transmite o alelo activo, caso contrário será silenciosa. Tanto no caso de deleções como amplificações as consequências dependerão do número de cópias expressas.

O exemplo mais típico é a região 15q11.2 associada às síndromes de Prader-Willi e Angelman, cuja manifestação depende da ausência do *locus* paterno (por deleção ou dissomia materna) na primeira e por ausência do *locus* materno (por deleção ou dissomia paterna) na segunda. Claro que as patologias são provocadas por perda de expressão de genes diferentes. Já a duplicação da mesma região está associada a fenótipos muito variáveis desde autismo e dismorfismos ligeiros, o que dependerá da transmissão e expressão dos genes envolvidos.

1.5 Objectivos deste projecto

É assim imperativo que cada vez um maior número de pacientes com perturbações do neurodesenvolvimento e/ou malformações congénitas sejam avaliados pelas metodologias de array-CGH, para que não só se encontre uma etiologia como se contribua para a identificação de novos *loci* envolvidos em patologias do desenvolvimento. Propõe-se assim neste projecto:

Objectivo 1: Caracterizar e esclarecer os desequilíbrios genómicos envolvidos em rearranjos cromossómicos crípticos ou de segmentos não identificáveis pela citogenética convencional, para uma melhor correlação genótipo-fenótipo e compreensão dos mecanismos envolvidos na sua formação.

Objectivo 2: Avaliar a incidência de desequilíbrios genómicos submicroscópicos em pacientes com DI, distúrbios do comportamento e/ou malformações congénitas.

Objectivo 3: Identificar as CNVs em regiões de síndromes de microdeleção e microduplicação já estabelecidas, assim como nas potencialmente patogénicas correlacionar com o seu conteúdo génico e comparar com outros casos já descritos na literatura e/ou em bases de dados.

Objectivo 4: Propor um algoritmo de análise para a interpretação do significado clínico das CNVs identificadas e uma estratégia de re-avaliação periódica para as que permanecem com significado incerto.

1.6 Referências

Fontes da Web

DECIPHER, <https://decipher.sanger.ac.uk/>

DGV, <http://dgv.tcag.ca/>

MRC-Holland, www.mlpa.com/

OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>

Referências

Abrahams BS, Geschwind DH. 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9: 341–355.

American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. (DSM- 5), Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.

Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Raymond A, Deutsch S. 2004. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5:725-738.

Bailey JA, Yavor AM, Massa HF, Trask BJ, Eichler EE. 2001. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res* 11:1005-1017.

Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE. 2002. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297:1003-1007.

Balikova I, Lehesjoki AE, de Ravel TJ, Thienpont B, Chandler KE, Clayton-Smith J, Träskelin AL, Fryns JP, Vermeesch JR. 2009. Deletions in the VPS13B (COH1) gene as a cause of Cohen syndrome. *Hum Mutat* 30:E845-854.

Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. 1980. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* 128:485-490.

Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, Grigorova M, Jones KW, Wei W, Stratton MR, Futreal PA, Weber B, Shapero MH, Wooster R. 2004. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 14:287-295.

Boveri T. 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh Phys-med Ges* 35:67-90.

Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang SH, Pursley A, Lotze T, Kennedy G, Lansky-Shafer S, Weaver C, Roeder ER, Grebe TA, Arnold GL, Hutchison T, Reimschisel T, Amato S, Geraghty MT, Innis JW, Obersztyn E, Nowakowska B, Rosengren SS, Bader PI, Grange DK, Naqvi S, Garnica AD, Bernes SM, Fong CT, Summers A, Walters WD, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung SW, Patel A. 2008. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet* 40:1466-1471.

Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG. 1986. Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 23:793-809.

Carter NP. 2007. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* 39:S16-21.

Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. 2004. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 57:644-646.

Casperson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49:219-222.

Casperson T, Zech L, Modest EJ. 1970. Fluorescent labeling of chromosomal DNA: superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science* 170:762.

del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, Neul JL, Patel A, Lee JA, Irons M, Berry SA, Pursley AA, Grebe TA, Freedenberg D, Martin RA, Hsich GE, Khera JR, Friedman NR, Zoghbi HY, Eng CM, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW, Roa BB. 2006. Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet Med* 8:784-792.

de Ravel. 2009. Genetic diagnosis in mental retardation: the contribution of array comparative genomic hybridization. Doctoral Thesis in Medical Sciences, Leuven.

de Smith AJ, Tsalenko A, Sampas N, Scheffer A, Yamada NA, Tsang P, Ben-Dor A, Yakhini Z, Ellis RJ, Bruhn L, Laderman S, Froguel P, Blakemore AI. 2007. Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: implications for association studies of complex diseases. *Hum Mol Genet* 16:2783-2794.

Denver Conference. 1960. A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet* 1:1063-1065.

Dutrillaux B, Lejeune J. 1971. A new technic of analysis of the human karyotype. *C R Acad Sci hebdomadaire Seances Acad Sci D* 272:2638-2640.

Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wol OH. 1960. A new trisomic syndrome. *Lancet* 1:787-790.

Eichler EE. 2001. Segmental duplications: what's missing, misassigned, and misassembled – and should we care? *Genome Res* 11:653-656.

Emanuel BS, Shaikh TH. 2001. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* 2:791-800.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. 2006. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7:85-97.

Flemming W. 1882. *Zellsubstanz, Kern und Zellteilung*. Vogel, Leipzig.

Florijn RJ, Bonden LA, Vrolijk H, Wiegant J, Vaandrager JW, Baas F, den Dunnen JT, Tanke HJ, van Ommen GJ, Raap AK. 1995. High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet* 4:831-836.

Fombonne E. 2001. Is there an epidemic of autism? *Pediatrics* 107:411–412.

Ford C E, Hamerton JL. 1956. The chromosomes of man. *Nature* 178:1020–1023.

Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH. 1959. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713.

Gall JG, Pardue ML. 1969. Formation and detection of RNA–DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63: 378–383.

Gardner RJ, Sutherland GR. 2004. *Chromosome abnormalities and genetic counselling*. 3th ed., Oxford University Press.

Gillberg C, Coleman M. 2000. The biology of autistic syndromes, 3rd ed., Mac Keith, London.

Giles RH, Petrij F, Dauwerse HG, den Hollander AI, Lushnikova T, van Ommen GJ, Goodman RH, Deaven LL, Doggett NA, Peters DJ, Breuning MH. 1997. Construction of a 1.2-Mb contig surrounding, and molecular analysis of, the human CREB-binding protein (CBP/CREBBP) gene on chromosome 16p13.3. *Genomics* 42:96-114.

Grawunder U, Zimmer D, Fugmann S, Schwarz K, Lieber MR. 1998. DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol Cell* 2:477-484.

Gribble SM, Kalaitzopoulos D, Burford DC, Prigmore E, Selzer RR, Ng BL, Matthews NS, Porter KM, Curley R, Lindsay SJ, Baptista J, Richmond TA, Carter NP. 2007. Ultra-high resolution array painting facilitates breakpoint sequencing. *J Med Genet* 44:51-58.

Gu W, Zhang F, Lupski JR. 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 1:4.

Oliveira G, Ataíde A, Marques C, Miguel TS, Coutinho AM, Mota-Vieira L, Gonçalves E, Lopes NM, Rodrigues V, Carmona da Mota H, Vicente AM. 2007. Epidemiology of autism spectrum disorder in Portugal: prevalence, clinical characterization, and medical conditions. *Dev Med Child Neurol* 49:726-733.

Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A, Stewart H, Hennekam RC, Cooper GM, Regan R, Knight SJ, Eichler EE, Vermeesch JR. 2009. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet* 46:223-32.

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. 2009. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10:551-564.

Heng HH, Squire J, Tsui LC. 1992. High-resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9509-9513.

Hirschhorn K, Cooper HL, Firschein IL. 1965. Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. *Humangenetik* 1:479-482.

- Hollox EJ, Barber JC, Brookes AJ, Armour JA. 2008. Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1. *Genome Res* 18:1686-1697.
- Hsu TC. 1952. Mammalian chromosomes in vitro: 1. The karyotype of man. *J Heredity* 43:167-172.
- lafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36:949–951.
- ISCN 1978: An international System of Human Cytogenetic Nomenclature. *Birth Defects Orig Artic Ser* 14:313-404.
- ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Nomenclature, ISCHC. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. Switzerland: S. Karger AG.
- Jacobs PA, Strong JA. 1959. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* 183:302-303.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 258:818-821.
- Kearney HM, South ST, Wolff DJ, Lamb A, Hamosh A, Rao KW. 2011. Working Group of the American College of Medical Genetics. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. *Genet Med* 13:676-679.
- Kim YS, Leventhal L, Koh YJ. 2011. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry* 168:904–912.
- Knight SJL, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354:1676–1681.
- Kogan MD, Blumberg SJ, Schieve LA. 2009. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics* 124:1395–1403.

Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Träskelin AL, Perveen R, Kivitie-Kallio S, Norio R, Warburg M, Fryns JP, de la Chapelle A, Lehesjoki AE. 2003. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet* 72:1359-1369.

Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, de Leeuw N, Knight SJ, Regan R, Kooy RF, Reyniers E, Romano C, Fichera M, Schinzel A, Baumer A, Anderlid BM, Schoumans J, Knoers NV, van Kessel AG, Sistermans EA, Veltman JA, Brunner HG, de Vries BB. 2006. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet* 38:999-1001.

Koolen DA, Sharp AJ, Hurst JA, Firth HV, Knight SJ, Goldenberg A, Saugier-Veber P, Pfundt R, Vissers LE, Destrée A, Grisart B, Rooms L, Van der Aa N, Field M, Hackett A, Bell K, Nowaczyk MJ, Mancini GM, Poddighe PJ, Schwartz CE, Rossi E, De Gregori M, Antonacci-Fulton LL, McLellan MD 2nd, Garrett JM, Wiechert MA, Miner TL, Crosby S, Ciccone R, Willatt L, Rauch A, Zenker M, Aradhya S, Manning MA, Strom TM, Wagenstaller J, Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Price SM, Stewart H, Shaw-Smith C, Brunner HG, Wilkie AO, Veltman JA, Zuffardi O, Eichler EE, de Vries BB. 2008. Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome. *J Med Genet* 45:710-20. [Erratum, *J Med Genet* 2009;46:576.]

Kruglyak L, Nickerson DA. 2001. Variation is the spice of life. *Nature Genet* 27:234–236.

Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. 2007. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131:1235-1247.

Lejeune J, Turpin R, Gautier M. 1959. Chromosomal diagnosis of mongolism. *Arch Fr Pediatr* 16:962-963.

Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. 1963. Trios cas de délétion partielle de bras court d'un chromosome 5. *C R Hebd Seances Acad Sci* 257:3098-3102.

Levan A. 1938. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Heredity* 24:471–486.

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. 2003. Mechanism and regulation of human nonhomologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:712-720.

Liehr T, Starke H, Weise A, Lehrer H, Claussen U. 2004. Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histol Histopathol* 19:229–237.

London Conference on the Normal Human Karyotype. 1963. *Cytogenetics* 2:264-268.

Lord C, Pickles A, McLennan J. 1997. Diagnosing autism: analyses of data from the Autism Diagnostic Interview. *Autism Dev Disord* 27:501-517.

Lord C, Risi S, Lambrecht L. 2000. The autism diagnostic observation schedule-generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. *Autism Dev Disord* 30:205-223.

MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. 2014. The database of genomic variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue):D986-992.

Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D, Collins A, Mercer C, Norga K, de Ravel T, Devriendt K, Bongers EM, de Leeuw N, Reardon W, Gimelli S, Bena F, Hennekam RC, Male A, Gaunt L, Clayton-Smith J, Simonic I, Park SM, Mehta SG, Nik-Zainal S, Woods CG, Firth HV, Parkin G, Fichera M, Reitano S, Lo Giudice M, Li KE, Casuga I, Broomer A, Conrad B, Schwerzmann M, Räber L, Gallati S, Striano P, Coppola A, Tolmie JL, Tobias ES, Lilley C, Armengol L, Spyschaert Y, Verloo P, De Coene A, Goossens L, Mortier G, Speleman F, van Binsbergen E, Nelen MR, Hochstenbach R, Poot M, Gallagher L, Gill M, McClellan J, King MC, Regan R, Skinner C, Stevenson RE, Antonarakis SE, Chen C, Estivill X, Menten B, Gimelli G, Gribble S, Schwartz S, Sutcliffe JS, Walsh T, Knight SJ, Sebat J, Romano C, Schwartz CE, Veltman JA, de Vries BB, Vermeesch JR, Barber JC, Willatt L, Tassabehji M, Eichler EE. 2008. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 359:1685-1699.

Mefford HC, Eichler EE. 2009. Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease. *Curr Opin Genet Dev* 19:196-204.

Mefford HC, Rosenfeld JA, Shur N, Slavotinek AM, Cox VA, Hennekam RC, Firth HV, Willatt L, Wheeler P, Morrow EM, Cook J, Sullivan R, Oh A, McDonald MT, Zonana J, Keller K, Hannibal MC, Ball S, Kussmann J, Gorski J, Zelewski S, Banks V, Smith W, Smith R, Paull L, Rosenbaum KN, Amor DJ, Silva J, Lamb A, Eichler EE. 2012. Further clinical and molecular delineation of the 15q24 microdeletion syndrome. *J Med Genet* 49:110-118.

Capítulo 1

Morgan TH. 1911. Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. *Science* 34:384.

Nowell PC, Hungerford DA. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25:85-109.

Nowell PC. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 20:462-466.

Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian JHH. 2003. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet* 73:1444-1451.

Painter TS. 1923. Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool* 37:291-336.

Paris Conference 1971. 1972. Standardization in Human Cytogenetics. *Birth Defects Orig Artic Ser* 8:1-46.

Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP. 1960. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1:790-793.

Patau K. 1960. The identification of individual chromosomes, especially in man. *Am J Hum Genet* 12:250-276.

Perry GH, Ben-Dor A, Tsalenko A, Sampas N, Rodriguez-Revenga L, Tran CW, Scheffer A, Steinfeld I, Tsang P, Yamada NA, Park HS, Kim JI, Seo JS, Yakhini Z, Laderman S, Bruhn L, Lee C. 2008. The fine-scale and complex architecture of human copy-number variation. *Am J Hum Genet* 82:685-695.

Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. 1998. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20:207-211.

Pinkel D, Albertson DG. 2005. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 37:S11-S17.

Przeworski M, Hudson RR, Di Rienzo A. 2000. Adjusting the focus on human variation. *Trends Genet* 16:296-302.

Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U. 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* 140:2063-2074.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444:444-454.

Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, Richter DJ, Lander ES, Altshuler D. 2002. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nature Genet* 32:135–142.

Robins D, Fein D, Barton M, Green J. 2001. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: an initial study investigating the early detection of autism and pervasive developmental disorders. *Autism Dev Disord* 31:131-151.

Roizen NJ, Patterson D. 2003. Down's syndrome. *Lancet* 361:1281-1289.

Ropers HH. 2008. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev* 18:241-50.

Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G. 2009. Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med* 163:907–914.

Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA, Girirajan S, Eichler EE, Shaffer LG, Ballif BC. 2009. Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodev Disord* 2:26-38.

Rudkin GT, Stollar BD. 1977. High resolution detection of DNA–RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265:472–473.

Schalock RL, Luckasson RA, Shogren KA, Borthwick-Duffy S, Bradley V, Buntinx WH, Coulter DL, Craig EM, Gomez SC, Lachapelle Y, Reeve A, Snell ME, Spreat S, Tassé MJ, Thompson JR,

Verdugo MA, Wehmeyer ML, Yeager MH. 2007. The renaming of mental retardation: understanding the change to the term intellectual disability. *Intellect Dev Disabil* 45:116-124.

Schmickel RD. Contiguous gene syndromes: a component of recognizable syndromes. 1986. *J Pediatr* 109:231-241.

Schopler E, Reichler R, Renner BR. 1991. The childhood autism rating scale. Los Angeles: Western Psychological Services; 1988, *Psychol Monogr* 117:313-357.

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2:971-972.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305:525–528.

Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Seagraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE. 2005. Segmental duplications and copy number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 77:78–88.

Sharp AJ, Hansen S, Selzer RR, Cheng Z, Regan R, Hurst JA, Stewart H, Price SM, Blair E, Hennekam RC, Fitzpatrick CA, Seagraves R, Richmond TA, Guiver C, Albertson DG, Pinkel D, Eis PS, Schwartz S, Knight SJ, Eichler EE. 2006. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat Genet* 38:1038-1042.

Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, Martin H, Rickman L, Gribble S, Curley R, Cumming S, Dunn C, Kalaitzopoulos D, Porter K, Prigmore E, Krepischi-Santos AC, Varela MC, Koiffmann CP, Lees AJ, Rosenberg C, Firth HV, de Silva R, Carter NP. 2006. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. *Nat Genet* 38:1032-1037.

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

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12:368-375.

Speicher MR, Carter NP. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 6:782-792.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. 1997. Matrixbased comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407.

Sutton WS. 1903. The chromosomes in heredity. *Biol Bull* 4: 231-251.

The International HapMap Consortium. 2003. The International HapMap Project. *Nature* 426:789-796.

Tjio H, Levan A. 1956. The chromosome numbers of man. *Hereditas* 42:1-6.

Tuzun, E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D, Olson MV, Eichler EE. 2005. Fine-scale structural variation of the human genome. The first description of a clone-end sequencing strategy to discover mainly intermediate-sized structural variants in the human genome. *Nature Genet* 37:727–732.

Van Prooijen-Knegt AC, Van Hoek JF, Bauman JG, Van Duijn P, Wool IG, Van der Ploeg M. 1982. In situ hybridization of DNA sequences in human metaphase chromosomes visualized by an indirect fluorescent immunocytochemical procedure. *Exp Cell Res* 141:397-407.

Verma RS, Dosik H, Lubs H A. 1978. Size and pericentric inversion heteromorphisms of secondary constriction regions (h) of chromosomes 1, 9, and 16 as detected by CBG technique in Caucasians: classification, frequencies, and incidence. *Am J Med Genet* 2:331–339.

Waldeyer W. 1888. Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikr Anat* 32:1.

Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A de Smith AJ, Martinet D, Andersson J, Falchi M, Chen F, Andrieux J, Lobbens S, Delobel B, Stutzmann F, El-Sayed Moustafa JS, Chèvre JC, Lecoeur C, Vatin V, Bouquillon S, Buxton JL, Boute O, Holder-Espinasse M, Cuisset JM, Lemaitre MP, Ambresin AE, Brioschi A, Gaillard M, Giusti V, Fellmann F, Ferrarini A, Hadjikhani N, Champion D, Guilmatre A, Goldenberg A, Calmels N, Mandel JL, Le Caignec C, David A, Isidor B, Cordier MP, Dupuis-Girod S, Labalme A, Sanlaville D, Béri-Dexheimer M, Jonveaux P, Leheup B, Ounap K, Bochukova EG, Henning E, Keogh J, Ellis RJ, Macdermot KD, van Haelst MM, Vincent-Delorme

C, Plessis G, Touraine R, Philippe A, Malan V, Mathieu-Dramard M, Chiesa J, Blaumeiser B, Kooy RF, Caiazzo R, Pigeyre M, Balkau B, Sladek R, Bergmann S, Mooser V, Waterworth D, Reymond A, Vollenweider P, Waeber G, Kurg A, Palta P, Esko T, Metspalu A, Nelis M, Elliott P, Hartikainen AL, McCarthy MI, Peltonen L, Carlsson L, Jacobson P, Sjöström L, Huang N, Hurles ME, O'Rahilly S, Farooqi IS, Männik K, Jarvelin MR, Pattou F, Meyre D, Walley AJ, Coin LJ, Blakemore AI, Froguel P, Beckmann JS. 2010. A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 463:671-675.

Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korbel JO. 2013. Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nat Rev Genet* 14:125-138.

Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, Platt OS, Ruderfer DM, Walsh CA, Altshuler D, Chakravarti A, Tanzi RE, Stefansson K, Santangelo SL, Gusella JF, Sklar P, Wu BL, Daly MJ; Autism Consortium. 2008. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 358:667-675.

White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, Bakker B, Breuning MH, den Dunnen JT. 2004. Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat* 24:86-92.

Wiegant J, Kalle W, Mullenders L, Brookes S, Hoovers JM, Dauwerse JG, van Ommen GJ, Raap AK. 1992. High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* 1:587-591.

Winnepenninckx B, Rooms L, Kooy RF. 2003. Mental retardation: a review of the genetic causes. *Brit J Dev Disabil* 49:29-44.

Wolf U, Reinwein H, Porsch R, Schro"tter R, Baitsch H. 1965. Deficiency on the short arms of a chromosome no. 4. *Humangenetik* 1:397-413.

Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL. 2007. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 80:91-104.

World Health Organization. 2005. International Statistical Classification of Diseases and Health Related Problems Tenth Revision (ICD-10), 2nd ed., Geneva: World Health Organization.

Wright AF. 2003. Nature Encyclopedia of the Human Genome. Nature Publishing Group, London 2:959–968.

Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. 2006. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). Nucleic Acids Res 34:445-450.

Yunis J. 1976. High resolution of human chromosomes. Science 191: 1268-1270.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Grupo de pacientes

Um grupo de 147 pacientes com DI e/ou malformações congénitas (MC) e/ou PEA, referidos ao Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC), pela consultas de Genética e do Desenvolvimento do Hospital Pediátrico de Coimbra foram seleccionados para análise por array-CGH. Em 50% dos casos já tinham sido realizados estudos por citogenética convencional com bandas de alta resolução (550-750 bandas por genoma haplóide), por citogenética molecular (FISH/MLPA) das regiões subteloméricas ou mesmo outros testes moleculares. Em seis pacientes o resultado do cariótipo é que conduziu ao estudo por array-CGH, nos outros 141 pacientes as análises já realizadas não revelaram um diagnóstico etiológico, sendo a sua selecção realizada por indicação clínica.

A validação das CNVs detectadas por array-CGH, com excepção das que se consideraram polimórficas, foi realizada por FISH, MLPA, e em algumas situações por uma nova análise por array-CGH. O método de validação foi o utilizado para estudo dos progenitores.

2.2 Citogenética convencional

Em seis pacientes foi o cariótipo com bandas de alta resolução que conduziu à análise por array-CGH (Tabela I). Em três pacientes o array foi realizado para uma melhor caracterização do desequilíbrio genómico envolvido e estabelecer a correlação com o fenótipo. Nos outros três pacientes foi realizado porque o tamanho e/ou complexidade do rearranjo não permitia um diagnóstico claro e num deles por ser um rearranjo aparentemente equilibrado mas associado a DI.

2.2.1 Cultura sincronizada de linfócitos para obtenção de prometafases

Para cada amostra foram estabelecidas duas culturas sincronizadas de linfócitos, a partir de sangue periférico heparinizado, segundo o protocolo de rotina estabelecido no LCG-FMUC (adaptado a partir do manual “Current Protocols in Human Genetics”) [Haines *et al.*, 1995]. Resumidamente, a 5 ml de meio de cultura completo (PB-MAX, Gibco®) adiciona-se 0,5 ml de sangue periférico, homogeneiza-se suavemente e coloca-se numa incubadora a 37°C. Após 72 horas de incubação, adiciona-se a cada

cultura 100 µl de metotrexato 5×10^{-3} µM, de forma a bloquear o ciclo celular na fase S, por inibição da replicação do DNA. Após uma incubação de 17 horas a 37°C, renova-se o meio das culturas (RPMI1640 com glutamax, suplementado com FBS 10% e penicilina/estreptomicina 1%, Gibco®) e adiciona-se 50 µl de timidina 10^{-3} M, o que permite às células avançar para a fase G2 e prosseguir com o ciclo celular. Depois de 5 horas de incubação, adiciona-se a cada cultura 50 µl de colcemida (10 µg/ml N-desacetyl-N-methylcolchicine), homogeneiza-se suavemente e incuba-se durante 15 minutos a 37°C, de forma a bloquear a mitose em metafase por inibição da polimerização da tubulina e consequentemente da formação dos microtúbulos do fuso acromático. Segue-se o choque hipotónico com 6-8 ml de KCl 75 mM, após remoção prévia do meio depois da centrifugação a 1200 rpm, durante 20 minutos a 37°C. Centrifuga-se a 1200 rpm, remove-se o sobrenadante e sob agitação contínua do sedimento no *vortex* adiciona-se 4 ml de fixador (3 volumes de metanol:1 volume de ácido acético glacial) preparado de fresco e a uma temperatura de -20°C. Centrifuga-se novamente e renova-se o fixador duas vezes, com um repouso de 20 minutos a 4°C entre a 2ª e a 3ª fixação.

Os sedimentos celulares obtidos são espalhados em lâminas de vidro, previamente limpas, sendo que a densidade celular e as condições de temperatura e humidade (22°C/54% humidade relativa) são factores determinantes na qualidade de espalhamento das metafases.

2.2.2 Bandagem GTG

A bandagem GTG confere um padrão de bandas característico de cada par de cromossomas permitindo a sua identificação e o reconhecimento das suas regiões, bandas e sub-bandas, denominadas de acordo com o descrito no sistema de nomenclatura internacional [ISCN 2013].

Resumidamente, após a preparação das lâminas com as prometáfases, estas são incubadas a 80°C durante 4 horas. Segue-se uma incubação sequencial numa bateria de soluções preparadas previamente e à temperatura ambiente: tripsina [0,04% em tampão fosfato *Sorensen* pH 6.8 (m/v)] 6-8 s, FBS [5% em tampão *Gürr* (v/v)] agita-se 2 s, lava-se em tampão *Gürr*, incuba-se 5-6 minutos em Giemsa a 4% [em tampão fosfato *Sorensen* pH 6.8 (v/v)], lava-se duas vezes em tampão *Gürr* e

deixa-se escorrer e secar na vertical. Avalia-se ao microscópio óptico (1000x) e ajustam-se os tempos de incubação na tripsina e no Giemsa se necessário.

2.2.3 Análise ao microscópio óptico

A análise é realizada seleccionando metafases com bandas de alta resolução, construindo os kariogramas e confirmando todas as bandas por par de homólogos. O número de metafases avaliadas é no mínimo 15, nos casos de mosaicismo devem ser avaliadas pelo menos 50 metafases. O kariótipo final é estabelecido com base nas regras de nomenclatura internacionais [ISCN, 2013].

2.3 Oligo array-CGH

A plataforma de array utilizada para análise foi a *Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray* 180 K (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA). Este array de oligonucleótidos contém aproximadamente 180 000 sondas de 60-mer com um espaçamento médio de 17 kb. Por cada paciente foram processadas 1100 ng de DNA (por reacção) obedecendo ao protocolo do fabricante (versão 6.2.1, fevereiro de 2010). Cada dispositivo do array apresenta quatro áreas de hibridização, podendo ser aplicados quatro pacientes, cada um cruzado com um controlo.

2.3.1 Preparação das amostras

Extração de DNA

O DNA genómico foi obtido a partir de sangue periférico (3 ml, em EDTA), utilizando o “*JetQuick Blood & Cell Culture DNA MIDI Spin Kit*” (Genomed®, Löhne, Germany), seguindo o protocolo do fornecedor. Resumidamente, começa-se por pipetar 3 ml de sangue para um tubo de centrifugação (tipo *falcon* de 50 ml), adiciona-se 300 µl de protease (20 mg/ml Genomed®), homogeneiza-se no agitador tipo *vortex* e adiciona-se 3ml do tampão K1 homogeneizando novamente (três pulsos de 5 segundos). Incuba-se durante 10 minutos a 70°C. A esta mistura adiciona-se 3 ml de etanol absoluto (96-100%), homogeneiza-se imediatamente no *vortex*, pulsando para evitar a precipitação dos ácidos nucleicos. Monta-se a coluna *JetQuick MIDI-Spin* num tubo colector de 50 ml, aplica-se toda a amostra obtida no passo anterior, rolha-se sem apertar demasiado de modo a permitir a ventilação durante a centrifugação de 3 minutos a 2000xg (centrífuga com rotor *swing-out*). Descarta-se o filtrado e aplica-se

10 ml de tampão KX (reconstituído com etanol) na coluna, centrifuga-se novamente 2 minutos a 5000xg. Descarta-se novamente o filtrado e coloca-se a coluna no tubo de recolha, aplica-se 10 ml de tampão K2 (reconstituído com etanol) na coluna e centrifuga-se 2 minutos a 5000xg. Desperdiça-se o filtrado, recoloca-se a coluna no tubo colector e centrifuga-se 10-15 minutos a 5000xg, de modo a limpar a membrana de sílica do líquido residual. Inserir a coluna *JetQuick MIDI-Spin* num novo tubo estéril de 50 ml e eluir o DNA retido na membrana com 0,8 ml de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 9.0) ou tampão TE (pré-aquecer o tampão de eluição a 70°C) ou simplesmente H₂O. Após a aplicação do tampão de eluição, deixa-se repousar à temperatura ambiente e subsequentemente centrifuga-se 2 minutos a 5000xg. O eluído contém o DNA purificado pronto a processar.

As amostras de DNA obtidas são quantificadas e avaliadas quanto ao seu grau de pureza no espectrofotómetro (*Nanodrop ND-1000*, Thermo Fisher®). Os parâmetros pretendidos são uma concentração ≥ 40 ng/ μ l, um quociente das absorvâncias 260/280 nm entre 1,8-2,0 e o quociente das absorvâncias 260/230nm superior a 2.0.

Marcação (Labeling)

Optou-se por em vez de hibridizar o DNA de cada paciente contra um controlo normal, hibridizar paciente *versus* paciente em duas áreas diferentes, seguindo o *loop model* (Fig. 7), com marcação alternada (Cy3/Cy5) cruzando três pacientes diferentes [Menten *et al.*, 2006]. As duplas de hibridização são estabelecidas por conjugação de pacientes do mesmo sexo com histórias clínicas diferentes. Geralmente hibridizam-se três dispositivos em simultâneo, começando por se preparar as amostras de DNA genómico para um volume final de 26 μ l (realizam-se os cálculos e respectivas diluições para todas as amostras em função da amostra limitante para as 1100 ng pretendidas).

Avança-se para a marcação das amostras com os respectivos fluoróforos utilizando o *Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling kit*. Começar por identificar 24 microtubos (0.2 μ l volume, nº interno/fluoróforo) e coloca-se o volume de água (*Nuclease-free water*, Promega Corporation®, Wisconsin, USA) necessário para ajustar à concentração final pretendida, adiciona-se 5 μ l de *random primers*, homogeneiza-se

suavemente e adiciona-se o DNA genómico (1100 ng DNA, 31 μ l de volume final). Segue-se uma incubação a 95°C durante 10 minutos no termociclador (*Veriti*, Applied Biosystems®, Foster City, USA), após o que se transferem para o gelo durante no mínimo 5 minutos. Preparam-se as *Labeling Master Mix* para os fluoróforos Cy3 e Cy5, adiciona-se por reação 19 μ l da *Mix* Cy3 ou Cy5, segundo o plano de marcação estabelecido. Incuba-se as amostras obtidas durante 2 horas a 37°C. Transferem-se rapidamente as amostras para um banho estabilizado a 65°C e mantem-se durante 10 minutos (para a reação por inativação da enzima), após o que se colocam imediatamente em gelo. Segue-se o *Clean-up* para remoção do fluoróforo não incorporado, através de um sistema de purificação em colunas (filtros *Amicon*® 30kDa) e lavagens com TE (pH 8.0). Depois das amostras purificadas e mantendo-as protegidas da luz, passa-se à quantificação do processo de marcação no *Nanodrop*, estabelece-se o valor de referência com o tampão TE (branco) e inicia-se a quantificação das amostras, começando pelas amostras marcadas com Cy3 e só depois com o Cy5. O grau de marcação ou actividade específica esperada deverá variar para o fluoróforo Cy3 entre 25 a 40 pmol/ μ g e para o Cy5 entre 20 e 35 pmol/ μ g. As amostras devem ser mantidas a -20°C, protegidas da luz.

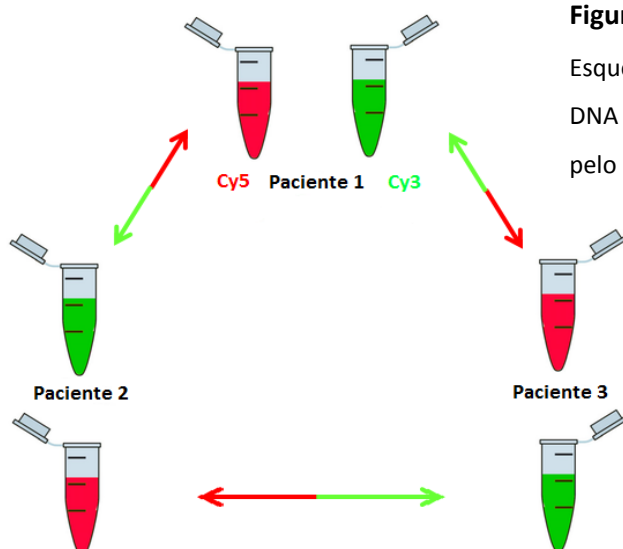


Figura 7 – Modelo em *loop* para array-CGH. Esquema representativo do plano de marcação do DNA genómico de 3 pacientes para a hibridização pelo modelo de análise em *loop*.

2.3.2 Hibridização

Segue-se a preparação das amostras para a etapa de hibridização (dia 2), começa-se por rotular os microtubos com as duplas estabelecidas (paciente1 Cy3/paciente2 Cy5), misturam-se as duas amostras transferindo a marcada com Cy3 para a marcada com Cy5. Prepara-se a *Hybridization Master Mix* [5 µl de Cot-1 DNA (1 mg/ml), 11 µl de Agilent 10x blocking agent, 55 µl de Agilent 2x Hi-RPM buffer], adiciona-se 71 µl a cada uma das duplas e transfere-se o volume total para os tubos previamente rotulados. Incubam-se no termociclador a 95°C durante 3 minutos e transferem-se para o banho a 37°C mantendo-os no mínimo 30 minutos, até à etapa de hibridização. Prepara-se o material, peças da câmara de hibridização e o *gasket*. Retiram-se do banho as primeiras quatro amostras a hibridizar, coloca-se o *gasket* na base da câmara de hibridização e dispensam-se as amostras (118 µl das duplas Cy3/Cy5) nas áreas do *gasket* numa posição pré-definida. Deve-se pegar cuidadosamente no dispositivo do array pelas extremidades, orientando o lado activo e posicionando por cima do *gasket* alinhando com o lado activo virado para baixo e evitando a formação de bolhas. Colocam-se as restantes peças da câmara (*cover* e *clamp*), roda-se o parafuso com o indicador sem forçar, terminando com ¼ de volta. Roda-se a câmara na vertical e verifica-se se a solução das amostras roda livremente e se as eventuais bolhas também rodam. Coloca-se a câmara de hibridização no forno já estabilizado a 65°C, e depois de proceder da mesma forma para o segundo dispositivo de array, colocando-os em posições de equilíbrio, inicia-se a rotação a 20 rpm durante 24 horas.

Lavagens pós-hibridização

No dia seguinte (dia 3) retira-se a primeira câmara do forno, coloca-se na bancada e desaperta-se o parafuso (sentido contrário aos ponteiros do relógio), retira-se o *clamp* e a *cover*. Submerge-se a *sandwich* lâmina/*gasket* na tina com o *Wash Buffer 1*. Mantendo a dupla imersa, insere-se uma pinça entre as duas lâminas e roda-se deixando cair o *gasket*, orienta-se o dispositivo de array e transfere-se rapidamente para a *rack* dentro de uma tina ainda com o *Wash buffer 1*, mantém-se sob agitação contínua 5 minutos. Transfere-se a *rack* com as lâminas para o recipiente com o *Wash buffer 2*, mantendo a 37°C durante 1 minuto (solução previamente aquecida, manter sob agitação dentro de um recipiente isotérmico). Retira-se a *rack* muito lentamente e

sem pausas inclinando para o lado do código de barras ligeiramente (secagem mais uniforme). Coloca-se a *rack* na bancada, pega-se na lâmina lateralmente pelo lado rotulado e coloca-se numa cassette com o lado *agilent* virado para cima (colocar a *ozone barrier slide cover*).

2.3.3 Scanning e Feature Extraction

As cassetes são colocadas no carrocel do *Agilent Microarray Scanner*, e a leitura é processada pelo *Feature Extraction Software* (v10.7), a resolução utilizada para a plataforma 4x180 K é de 3 μm (Fig. 8).

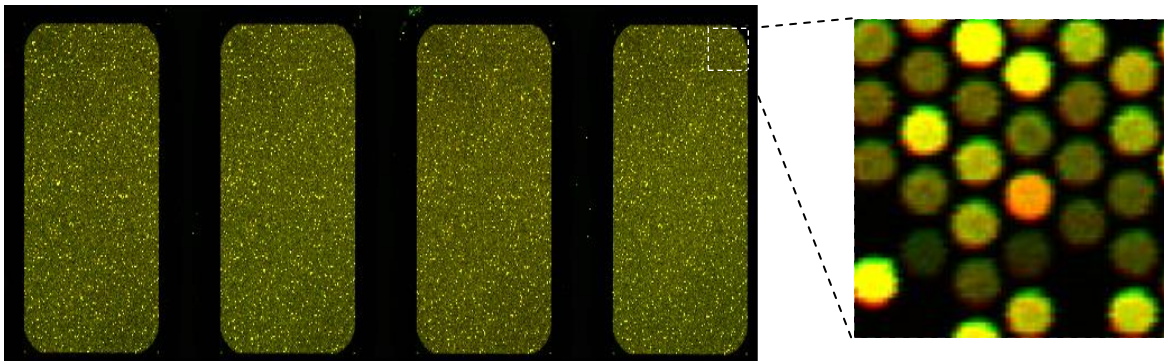


Figura 8 – Imagem resultante após a leitura de uma lâmina no *Agilent Microarray Scanner*.

O software determina a intensidade de fluorescência para cada *spot* para ambos os fluoróforos, subtraindo o ruído e normalizando os resultados. Os resultados foram processados usando o *Agilent Genomic Workbench* (v6.0), com os parâmetros: ADM2 (*aberration algorithm*), *threshold* 6.0, *moving average* 2 Mb. Cada dispositivo de array tem um código de barras que o identifica e que permite ao programa selecionar o *design* do estudo, fazendo-o corresponder a uma grelha com o posicionamento dos oligos na versão do genoma utilizada para análise (UCSC genome browser – NCBI build 37, Feb 2007). Os resultados obtidos estão de acordo com a *Human Genome build 19* (hg19) e incluem os desequilíbrios com pelo menos três sondas consecutivas com valores dos raios \log_2 alterados (Fig. 9).

Todas as CNVs foram analisadas e interpretadas consultando as bases de dados:

- UCSC genome browser [<http://genome.ucsc.edu/>];
- DGV [<http://projects.tcag.ca/>];
- OMIM [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>];
- Decipher [<http://decipher.sanger.ac.uk/>];
- ISCA (*The International Standards for Cytogenomic Arrays*) [<https://www.iscaconsortium.org/>].

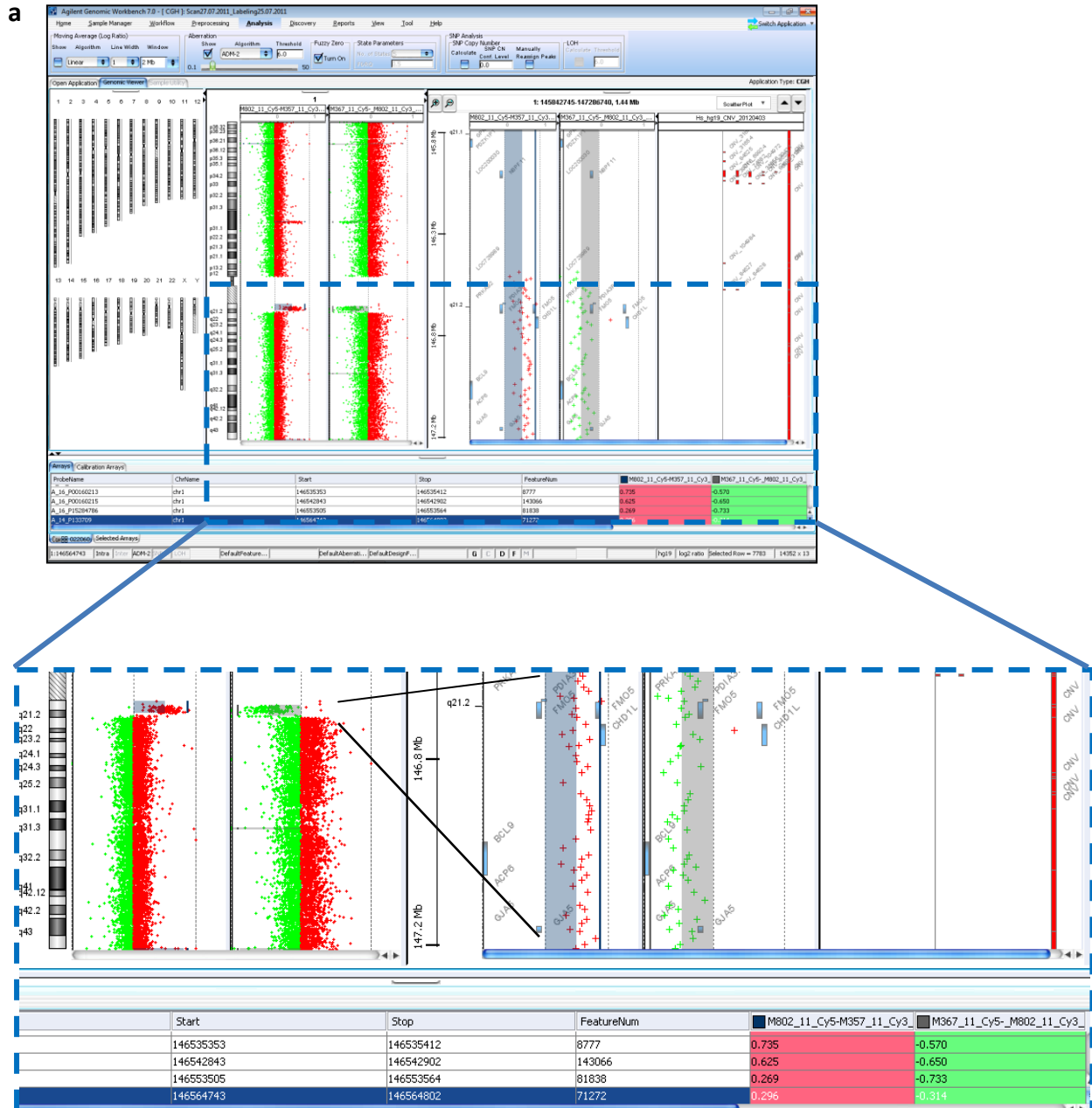


Figura 9 – (a) *Overview* do programa de análise *Agilent Genomic Workbench* (v6.0). Evidencia-se em (b) a região duplicada, com o resultado das duas hibridizações (Cy3/Cy5) da análise em *loop*.

2.3.4 Análise das CNVs

Para cada CNV procedeu-se do seguinte modo:

1º Colocar as posições nucleotídicas no UCSC Genome Browser (hg19):

Exemplo - chr1:144,526,927-147,824,207 (Fig. 10a).

2º Verificar se existem CNVs totalmente sobreponíveis descritas na DGV (no mesmo: nº de cópias, tamanho/conteúdo génico, sexo se associadas ao X), se são frequentes (Fig. 10b) e se também são comuns na base de CNVs interna do laboratório.

Quando as CNVs já são muito comuns, já avaliadas e consideradas sem patogenicidade, tanto na DGV como na base interna, são consideradas CNVs polimórficas, sem avaliação adicional.

Caso contrário prossegue-se com a avaliação:

3º Verificar se existem associadas à região síndromes de genes contíguos estabelecidas na base OMIM, qual a homologia e padrão de expressão (Fig. 10c). Verificar também na base DECIPHER e ISCA.

4º O tamanho de uma CNV não é determinante por si só, o que é relevante é o conteúdo génico: verificar quais dos RefSeq genes estão descritos na OMIM, qual a sua função e se estão associados a patologia por mutação qual o seu padrão de expressão e se há possível relação com o tipo de CNV em causa (deleção/duplicação), fazer o cruzamento da informação com a PubMed mesmo nos genes da OMIM não associados a patologia mas com função e expressão relevante para o fenótipo em causa (Fig. 10d).

5º Verificar se existem pacientes semelhantes na base DECIPHER (Fig. 10e) e também se existem CNVs semelhantes reportadas em pacientes na PubMed.

Na Figura 10(a-e) encontram-se representadas as diferentes etapas de avaliação da patogenicidade de uma CNV a partir da UCSC Genome Browser.

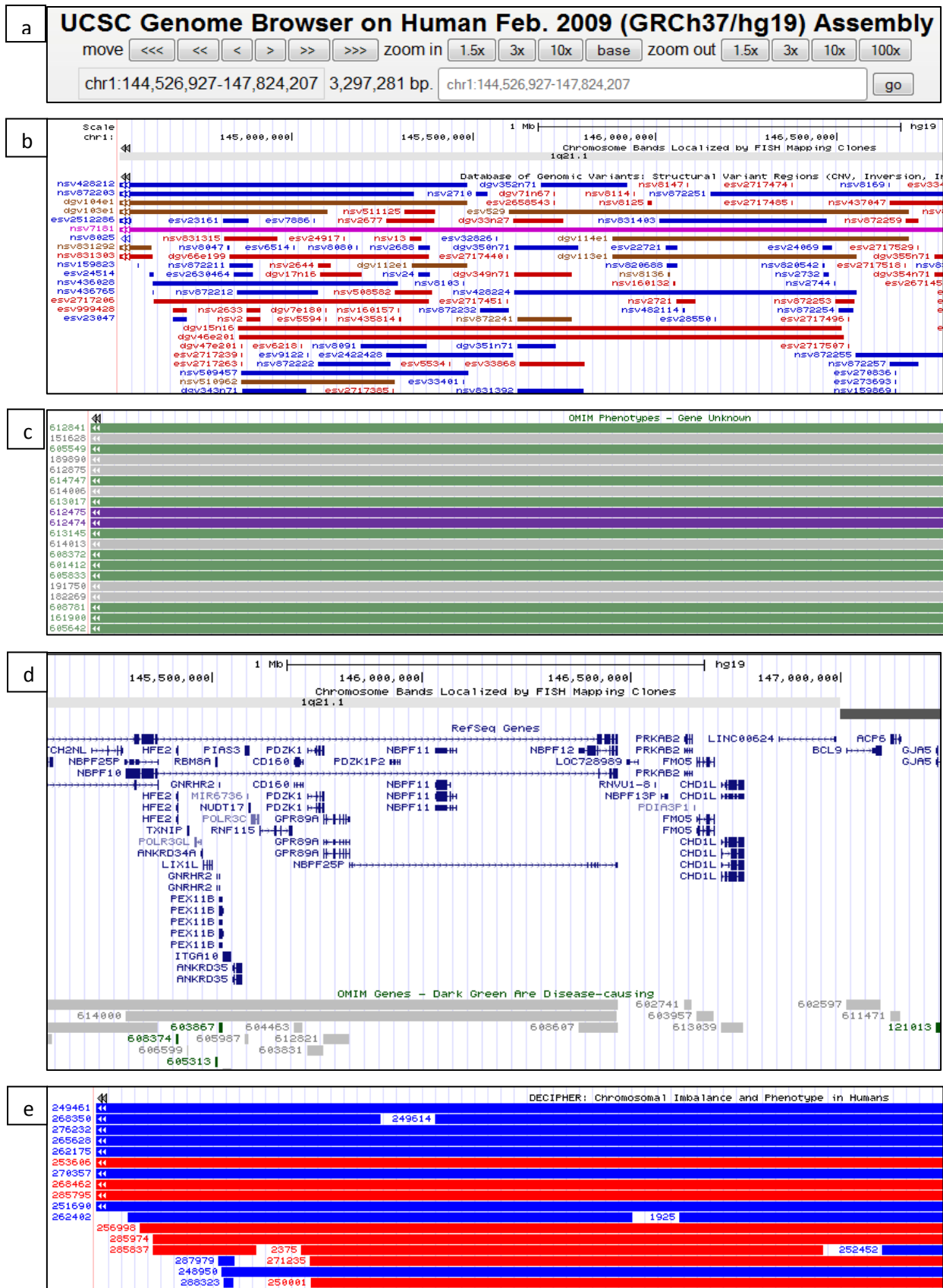


Figura 10 – Análise de uma CNV. (a-e) Etapas de avaliação da patogenicidade de uma CNV a partir do UCSI Genome Browser.

2.3.5 Validação das CNVs

Todas as CNVs patogénicas são validadas por outra metodologia, assim como são avaliados os progenitores.

2.3.5.1 MLPA

Em alguns pacientes a validação das alterações encontradas por array-CGH e o estudo dos progenitores foi realizada pela técnica de MLPA, recorrendo aos painéis comercialmente disponíveis que incluíam sondas direccionadas para os genes envolvidos (MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands).

O procedimento experimental da técnica de MLPA seguiu o que está descrito pelo fabricante. Em cada reacção utilizaram-se entre 80 a 100 ng de DNA num volume de 5 µl. Procedeu-se à desnaturação a 95°C durante 10 minutos no termociclador (ABI 2720, Applied Biosystems®, Foster City, USA). Adicionou-se a *probe mix*, seguiu-se uma desnaturação durante 1 minuto a 95°C e subsequentemente as amostras permaneceram durante 15 horas a 60°C, ocorrendo a reacção de hibridização (termociclador). Adicionou-se 32 µl da ligase (*Ligase-65 master mix*) e a reacção de ligação ocorreu a 54°C durante 15 minutos (termociclador). A ligase é inactivada por acção da temperatura, 98°C durante 5 minutos. Segue-se a amplificação por PCR, após a adição da 10 µl da *polymerase master mix* (termociclador ABI 2720: 35 ciclos, 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 20 minutos a 72°C). Os produtos da amplificação foram sujeitos a electroforese capilar no sequenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems®, Foster City, USA). Os resultados foram processados através do *software* GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems®, Foster City, USA), e a sua análise foi realizada utilizando o *software* Coffalyser 9.4 (MRC-Holland®, Amsterdão, Holanda). Este compara a quantidade relativa dos produtos de amplificação das sondas na amostra do paciente com uma amostra de DNA de referência, refletindo o número de cópias do DNA alvo. Sempre que o valor para o número de cópias foi inferior a 0,7 foi interpretado como perda e valores superiores a 1,3 foram interpretados como ganho.

2.3.5.2 Citogenética Molecular - FISH

Nos pacientes em que pelo tamanho do desequilíbrio e/ou a região envolvida havia a suspeita de poder estar na origem um rearranjo cromossômico, podendo ser equilibrado nos progenitores, a validação das CNVs patogénicas foi realizada recorrendo à citogenética molecular FISH, assim como a avaliação dos progenitores. As sondas utilizadas no caso de regiões de síndromes de microdeleção ou subteloméricas foram sondas de sequência única e no caso de outros rearranjos intercromossómicos sondas de pintura disponíveis comercialmente (Vysis, Abbott Molecular®; Aquarius, Cytocell®; Kreatech®), ou BACs sobreponíveis à CNV (BlueGnome, Illumina®).

As lâminas com prometafasas foram obtidas pela metodologia já descrita em 2.2.1, preparadas 2-3 dias antes da hibridização e mantidas à temperatura ambiente. Resumidamente, as lâminas são desidratadas numa série alcoólica [etanol 70%, 85% e ~100%, 2 minutos/solução] nalguns casos após uma prévia incubação numa solução salina de citrato de sódio [15 minutos a 37°C, 2XSSC, pH 7.0]. No caso das sondas de rotina (sequências disponíveis comercialmente), a desnaturação da lâmina e sonda foi conjunta [2-3 minutos, 74°C na placa térmica]; no caso das do tipo BAC (BlueGnome) a desnaturação da lâmina foi separada num solução de formamida [70% em 2XSSC, 72°C durante 3 minutos] com a submersão imediata em etanol gelado [70% a -20°C] para parar a desnaturação, completando-se a desidratação à temperatura ambiente [etanol 85%, ~100%, 2 minutos]. Após a aplicação da sonda (preparada previamente pelas instruções do fabricante) a hibridização decorre *overnight* numa câmara húmida a 37°C. A lavagem pós-hibridização é realizada, após remoção da lamela e lavagem em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), a 70°C numa solução de SSC/formamida de estringência adequada à sonda utilizada. Segue-se a contrastação com a solução DAPI/Antifade [VECTASHIELD Mounting Media, Vector Laboratories®], para se poder visualizar a cromatina e prevenir o decair rápido da fluorescência. A observação é realizada ao microscópio de fluorescência com os filtros adequados a cada espectro de emissão da sonda utilizada. Verifica-se em metafase a localização da sonda em cada homólogo e confirma-se o número de cópias em interfase.

O estudo é realizado no probando e nos progenitores, sempre que foi disponibilizado o material de colheita para realizar o estudo.

2.3.6 Interpretação da patogenicidade das CNVs

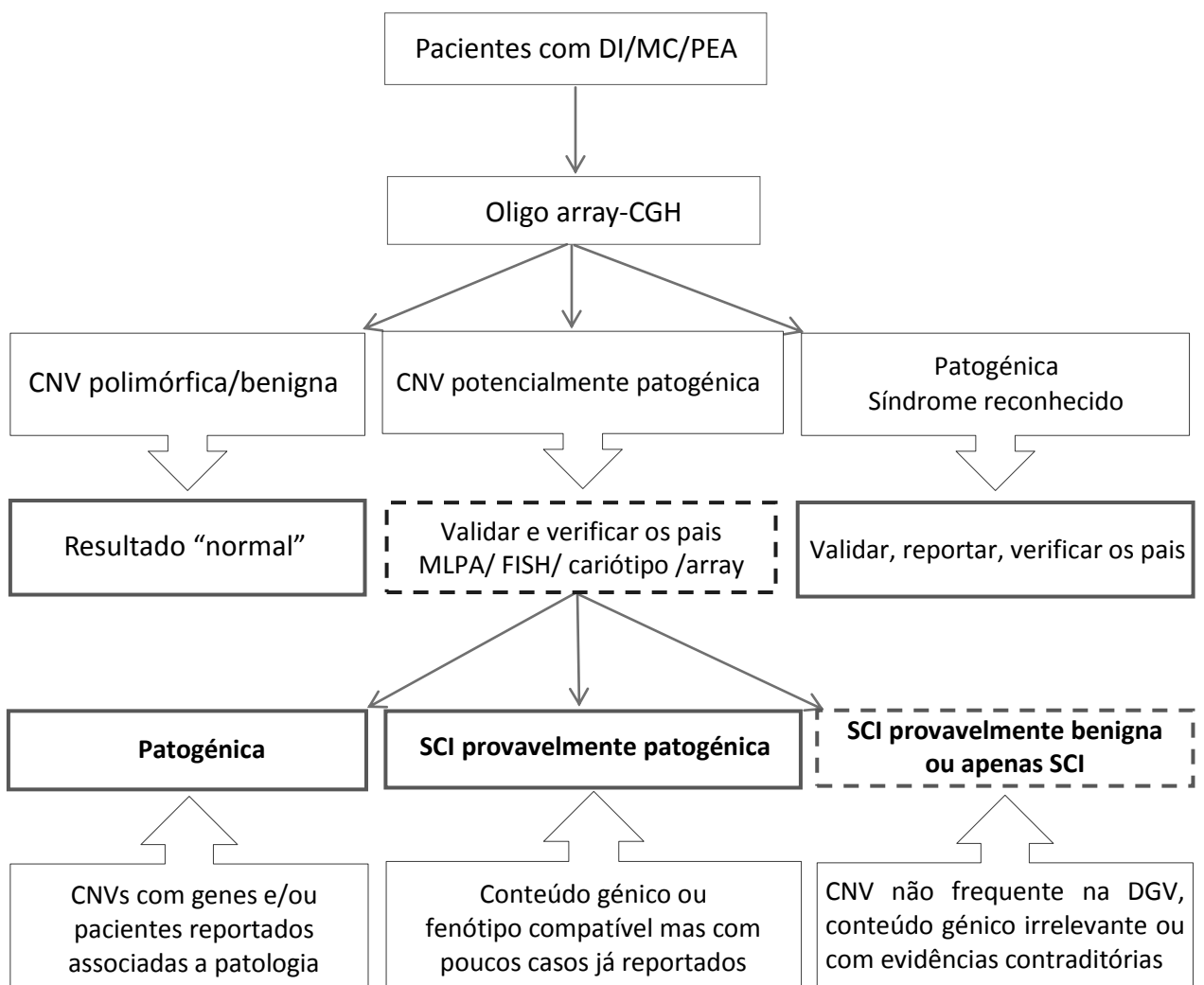
Após todo o procedimento laboratorial e análise das CNVs encontradas, é necessário tirar conclusões que permitam emitir um diagnóstico (Fig. 11). É recomendável utilizar uma terminologia consistente e não ambígua que permita categorizar o seu significado clínico. Esta categorização segue em linhas gerais as recomendações das *guidelines* do *American College of Medical Genetics* [Kearney *et al.*, 2011].

Uma CNV será considerada patogénica se está muito bem documentada com significado clínico, mesmo se a penetrância e expressividade forem variáveis. Esta categoria inclui regiões sobreponíveis a: síndromes de microdeleção/microduplicação, a CNVs com vários outros casos com significado clínico estabelecido, genes associados a síndromes/patologias com expressão relevante para a CNV em causa, CNVs superiores a 3-5 MB (excluindo os heteromorfismos citogenéticos) com uma clara interpretação quanto ao seu significado clínico. Mas se não existirem evidências bem documentadas que comprovem claramente se são patogénicas ou benignas, devem ser categorizadas como CNV de significado clínico incerto (SCI). Contudo, poderá fazer-se uma previsão se será mais provavelmente patogénica ou benigna, baseada nas evidências já existentes, o que não dispensa uma interpretação clínica final. A CNV de SCI será provavelmente patogénica se: (1) está descrita, mesmo que em apenas uma publicação, mas com uma região e fenótipo bem definidos, ambos concordantes e relevantes para o paciente em causa; (2) um gene incluído na CNV tem uma função muito relevante e específica para o fenótipo do paciente (mas não no caso de indicações clínicas inespecíficas como ADPM ou DI), as deduções apenas a partir de modelos animais devem ser discretas e por si só não relevantes assim como evidências restritas à função do gene (ex. apenas por estar documentada uma função neuronal). A CNV de SCI será provavelmente benigna se: (1) não tem conteúdo génico ou este é aparentemente irrelevante, mas tem um tamanho significativo; (2) está descrita num pequeno número de casos na DGV e não representa um polimorfismo comum; (3) o tamanho/conteúdo génico são irrelevantes, é herdada de um progenitor sem manifestações clínicas. A CNV será somente de SCI se: (1) contém genes, mas sobre os quais se desconhece o impacto se em nº cópias variável; (2) a CNV está descrita de uma forma contraditória em publicações ou bases de dados, não sendo possível tirar

conclusões. A CNV será considerada benigna se está reportada em múltiplas publicações e bases de dados fiáveis como uma variante benigna (para um determinado nº de cópias), bem caracterizada e/ou representa um polimorfismo comum (>1% na população).

Todas as CNVs de significado incerto devem ser mantidas numa base interna, com uma re-avaliação periódica nas bases de dados. Compete também à parte clínica alertar sobre eventuais novos diagnósticos que clarifiquem a causa etiológica.

Figura 11 - Algoritmo de avaliação da patogenicidade de uma CNV.



2.4 Referências

Fontes da Web

DECIPHER, <https://decipher.sanger.ac.uk/>

DGV, <http://dgv.tcag.ca/>

ISCA, <https://www.iscaconsortium.org/>

OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>

Referências

Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR. 1995. Current Protocols in Human Genetics. John Wiley & Sons, Vol.1,Cap.4: 4.1.3-4.1.4.

ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Nomenclature, ISCHC. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. Switzerland: S. Karger AG.

Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. 2011. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. Genet Med 13:680-685.

Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR. 2006. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. J Med Genet 43:625-633.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Capítulo 3 (organização)

Este capítulo está dividido em secções de acordo com o significado clínico e nível de resolução dos rearranjos genómicos diagnosticados no grupo de pacientes. Dos 147 pacientes analisados por oligo array-CGH, em 85 apenas se observaram CNVs classificadas como variantes benignas não sendo alvo de mais nenhuma investigação. Os outros 62 pacientes apresentaram CNVs que não correspondem a variantes benignas conhecidas e que foram classificadas de acordo com as *guidelines* descritas na secção (2.3.6). Com base nesta classificação os resultados foram organizados em diferentes grupos de pacientes consoante são portadores de:

Secção 3.1 - CNVs patogénicas microscópicas**3.1.1** – Artigos publicados**Secção 3.2** - CNVs patogénicas submicroscópicas**3.2.1** – Artigos em submissão**Secção 3.3** – CNVs de SCI provavelmente patogénicas, provavelmente benignas e apenas de SCI.

Nas sub-secções 3.1.1 e 3.2.1 dos artigos publicados e em submissão, as referências bibliográficas de cada publicação não estão duplicadas no final do capítulo. Em todas as publicações que incluem fotografias de pacientes foi obtido o respectivo consentimento informado pelo clínico responsável.

3.1 CNVs patogénicas microscópicas

Os pacientes portadores de CNVs patogénicas que envolvem rearranjos microscópicos, com um diagnóstico citogenético prévio e com caracterização por array-CGH dos desequilíbrios genómicos envolvidos (Tabela I), estão descritos em artigos publicados (3.1.1).

Caracterização por array-CGH

No paciente SM69/10 para além da deleção microscópica a técnica de oligo array-CGH detectou outra CNV patogénica submicroscópica, sobreponível à síndrome de Alagille que veio a explicar o fenótipo do paciente [Ferreira *et al.*, 2012]. No paciente SM75/07 a citogenética detectou um rearranjo estrutural em mosaico, caracterizado por citogenética molecular e por BAC array-CGH (único caso analisado com uma plataforma de BACs), o que permitiu propor o mecanismo de formação do rearranjo [Carreira *et al.*, 2009]. No probando SM2/10 uma aparente duplicação citogenética do cromossoma 21 foi reclassificada para uma inserção intercromossómica com duplicação do cromossoma 4(q13), estando esta família detalhadamente descrita em publicação [Matoso *et al.*, 2013]. O paciente SM43/10 é portador de uma deleção intersticial 7(q36) de 2.9 Mb confirmada e caracterizada por oligo array-CGH, num quadro clínico de MC sem DI [Beleza-Meireles *et al.*, 2013]. Uma inversão do cromossoma 21 aparentemente equilibrada pela citogenética convencional, num paciente (M444/11) com DI, revelou uma deleção intersticial de 1.7 Mb por oligo array-CGH [Oliveira *et al.*, 2013].

Tabela 1 – Pacientes com desequilíbrios genômicos citogenéticos - caracterização por oligo array-CGH.

ID	Motivo do estudo	Desequilíbrio	Cromossoma (região)	Início (bp)	Fim (bp)	Tamanho (bp)	Publicação (seção 3.1.1)
CNVs patogênicas em pacientes com rearranjos microscópicos							
SM69/10	46,XX,del(2)(q32.1~q32.3)dn	deleção	2q32.1q32.3	186,138,564	193,143,843	7,005,280	Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille syndrome region.
		deleção	20p12.2p12.3	7,993,915	11,937,648	3,943,734	
SM322/10	46,XX,del(2)(q31.2~q32.3)dn	deleção	2q31.2q32.3	178,121,127	194,943,948	16,822,822	Mol Cytogenet 2012, 5:25. [Artigo 3]
SM75/07	mos 46,XY,add(12)(p13.3)dn[56] /46,XY[44]	triplicação	3q26.31qter	174,37 Mb	199.69 Mb	25,32 Mb	Molecular cytogenetic characterisation of a mosaic add(12)(p13.3) with an inv dup(3)(q26.31 --> qter) detected in an autistic boy. Mol Cytogenet 2009, 2:16. [Artigo 4]
SM2/10	46,XX,add(21)(q21)mat	duplicação	4q13.1q13.3	62,818,354	71,447,607	8,629,253	Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the EPHA5 gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet Part A 2013, 161A:1923–1928. [Artigo 1]
SM43/10	46,XY,del(7)(q36.1~q36.3)dn	deleção	7q36.2q36.3	153,206,357	156,133,135	2,926,778	Cryptic 7q36.2q36.3 deletion causes multiple congenital eye anomalies and craniofacial dysmorphism. Am J Med Genet Part A 2013, 161A:589-593. [Artigo 2]
M444/11*	46,XX,inv(21)(p12q22)mat	deleção	21q22.11	32,692,811	34,454,579	1,761,769	Inv21p12q22del21q22 and intellectual disability. Gene 2013, 517:120-124. [Artigo 5]

ID identificação do paciente; (*) paciente registrado na base DECIPHER (# 266699).

3.1.1 Artigos publicados

Artigo 1

Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the *EPHA5* gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder

Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A, Castelo TM, Weise A, Carreira IM

American Journal of Medical Genetics Part A (2013) [doi: 10.1002/ajmg.a.36032](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36032)

Insertional Translocation Leading to a 4q13 Duplication Including the *EPHA5* Gene in Two Siblings With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder

Eunice Matoso,^{1,2,3} Joana B. Melo,^{1,3} Susana I. Ferreira,¹ Ana Jardim,¹ Teresa M. Castelo,⁴ Anja Weise,⁵ and Isabel M. Carreira^{1,2,3*}

¹Laboratory of Cytogenetics and Genomics, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

²Laboratory of Cytogenetics, Paediatrics Hospital, Coimbra, Portugal

³CIMAGO—Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

⁴Child Development Center, Paediatrics Hospital, Coimbra, Portugal

⁵Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Kollegiengasse, Jena, Germany

Manuscript Received: 28 April 2012; Manuscript Accepted: 15 April 2013

An insertional translocation (IT) can result in pure segmental aneusomy for the inserted genomic segment allowing to define a more accurate clinical phenotype. Here, we report on two siblings sharing an unbalanced IT inherited from the mother with a history of learning difficulty. An 8-year-old girl with developmental delay, speech disability, and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), showed by GTG banding analysis a subtle interstitial alteration in 21q21. Oligonucleotide array comparative genomic hybridization (array-CGH) analysis showed a 4q13.1–q13.3 duplication spanning 8.6 Mb. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with bacterial artificial chromosome (BAC) clones confirmed the rearrangement, a $der(21)ins(21;4)(q21;q13.1q13.3)$. The duplication described involves 50 RefSeq genes including the *EPHA5* gene that encodes for the EphA5 receptor involved in embryonic development of the brain and also in synaptic remodeling and plasticity thought to underlie learning and memory. The same rearrangement was observed in a younger brother with behavioral problems and also exhibiting ADHD. ADHD is among the most heritable of neuropsychiatric disorders. There are few reports of patients with duplications involving the proximal region of 4q and a mild phenotype. To the best of our knowledge this is the first report of a duplication restricted to band 4q13. This abnormality could be easily missed in children who have nonspecific cognitive impairment. The presence of this behavioral disorder in the two siblings reinforces the hypothesis that the region involved could include genes involved in ADHD. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: array-CGH; insertional translocation; 4q13 duplication; attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD); *EPHA5* gene

How to Cite this Article:

Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A, Castelo TM, Weise A, Carreira IM. 2013. Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the *EPHA5* gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder.

Am J Med Genet Part A 161A:1923–1928.

INTRODUCTION

The intercalation of a part of one chromosome into another non-homologous chromosome is called an interchromosomal insertional translocation or insertional translocation (IT). Direct ITs keep their original orientation with respect to the centromere, while inverted ITs show a reversed orientation. Estimations of the incidence of insertions range from 1:10,000 to 1:80,000 live births based on results from banding cytogenetics [Van Hemel and Eussen, 2000]. However, using a combination of array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) and fluorescence

Conflict of interest: none.

*Correspondence to:

Isabel Marques Carreira, Ph.D., Laboratory of Cytogenetics and Genomics, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal Pólo Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra, Portugal.

E-mail: i_marques@hotmail.com

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 4 July 2013

DOI 10.1002/ajmg.a.36032

in situ hybridization (FISH) analyses, the detection rate is 20-fold greater than the one established in the literature. The increased detection of IT events has reinforced the need to confirm copy number gains using methodologies such as FISH to determine the genomic position or location of the additional material [Kang et al., 2010].

IT events can affect gene function in several ways; genes located at the insertion site may be deleted, duplicated, or disrupted or may result in abnormal gene expression due to position effect. An IT can result in pure segmental aneusomy for the inserted genomic segment giving the opportunity to define a clinical phenotype more exactly. Clinical correlation becomes more challenging when the unbalanced IT event is inherited from an apparently phenotypically “normal” parent [Kang et al., 2010]. A maternal origin is seen in 59.5% of the cases, a paternal origin in 26.6% and 13.9% are *de novo* [Van Hemel and Eussen, 2000].

Constitutional proximal duplications of 4q have been described rarely [Mattei et al., 1979; Shashi et al., 1999; Zollino et al., 1995; Bonnet et al., 2006]. Probably given a mild phenotype, without any malformations or growth retardation, duplications of this segment can go unnoticed. Here, we report on two sibs with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and speech disability, carrying a “pure” segmental trisomy of 4q13.1–q13.3 inserted at 21q21, maternal in origin. The genomic content of the imbalance IT is evaluated, and the possible involvement of dosage-sensitive gene(s) for the ADHD is discussed. This family reinforces the relevance of performing array-CGH analysis in children with non-specific cognitive disorders.

CLINICAL REPORTS

Patient 1

The 8-year-old girl was the first child of healthy unrelated parents. She was born after a normal delivery at 40 weeks of gestation, Apgar score of 10 after 5 min, with a birth weight of 2.780 kg (10th centile), length of 47 cm (10–25th centile), and head circumference

of 32 cm (5th centile). The perinatal course was uneventful. Her first words occurred at 18 months, with poor speech progression. During the first years of life she had some bronchiolitis episodes. Since the age of 2-years her weight remained at the 5th centile and height on the 25th centile. At 3 years all developmental milestones were delayed. She attended regular school classes at 6 years, and since then she has revealed a hyperactive behavior. At 7 years and 11 months her weight was 19.8 kg (5–10th centile), height 119.5 cm (10th centile), and head circumference of 49.1 cm (10th centile). At 8 years she was referred for cytogenetic evaluation, because of global learning disability, limitations in language articulation, and hyperactive behavior with attention deficit. At this age the patient met the criteria set out in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV (DSM-IV), for attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), combined type. The test of reception of grammar (TROG) met the 25th centile (appropriate for 6 years). Cognitive evaluation was performed according to the Wechsler Intelligence Scale for Children-III (WISC-III), she presented a Full Scale IQ of 83, with a Verbal IQ of 80, a Performance IQ of 93, a Verbal Comprehension Index of 103 and a Perceptual Organization Index of 89. During the evaluation she was aggressive and not collaborative. The patient has no remarkable dysmorphic features (Fig. 1A). Neurological examination showed normal tone and strength of muscles, intact cranial nerves, and deep tendon reflexes. After the diagnosis of ADHD the patient was placed on methylphenidate at 0.7 mg/kg/day, which greatly reduced her hyperactivity and improved her behavior. The paternal family history is unremarkable. However, her 39-year-old mother is reported to have had learning difficulties during regular school. There is a maternal family history with two aunts and an uncle with remarkable learning difficulties, and an illiterate grandfather also with learning difficulties.

Patient 2

Patient 2 is a 5-year-old male, the younger brother of Patient 1. He was born after an unremarkable pregnancy, delivered pre-term at 35 weeks by cesarean due to placental abruption, the



FIG. 1. A: Patient 1 facial image showing no obvious dysmorphic features. B,C: Patient 2 facial appearance showed mild dysmorphic features: low set ears with anterior rotation and broad forehead. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

Apgar scores were 9 and 10 after 1 and 5 min, respectively. The infant's birth weight was 2.670 kg (10th centile), length of 45 cm (25–50th centile), and head circumference was 32 cm (50th centile). In the neonatal period he was admitted to Newborn Intensive Care Unit because of Respiratory Distress Syndrome. Until the age of 12 months weight was between the 50th and 75th centile and height was on the 50th centile. His first words were at 12 months, he has behavioral problems, is very impulsive and hyperactive with sleeping difficulties. Since the age of 4-years he has also displayed mutism needing individual psychotherapy. At 5 years and 5 months his weight was 19.9 kg, height was 113.5 cm, and head circumference was 54 cm (all parameters on the 75th centile). He makes no visual contact, has a poor speech, and immature graphism. TROG was between the 50th and 75th centile (appropriate for 5 years). The patient exhibited mild dysmorphic features including low set ears with anterior rotation and broad forehead (Fig. 1B,C). Neurological examination was unremarkable. At 5 years and 10 months weight and height remained on the 50th centile, his development was measured by using the Ruth Griffiths Mental Development Scales, revealing age-appropriate results. At 6 years and 7 months his weight was 22.5 kg (50th centile) and height 119.5 cm (50th centile). At this time he had already revealed learning difficulties and ADHD. Like his sister he was placed on methylphenidate at 0.7 mg/kg/day, which greatly reduced his aggressivity, the attention-deficit and improved his learning ability.

MATERIALS AND METHODS

Cytogenetic Analysis

Chromosomal analysis was performed on metaphases obtained from 72 h PHA stimulated peripheral blood lymphocyte cultures according to standard procedures [Benn and Tantrarahi, 2001]. Analysis of GTG-banded chromosomes was done at a resolution of 700 bands per haploid genome, according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2009 [Shaffer et al., 2009].

Conventional cytogenetic analysis was carried out for Patient 1, Patient 2, their parents, and the maternal grandmother.

Array-CGH

High-resolution whole genome analysis was performed using Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180 K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), an oligonucleotide microarray containing approximately 180,000 sixty-mer probes with a 17 kb average probe spacing, as previously described [Ferreira et al., 2012]. Briefly, genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes and DNA concentration and purity were measured. Genomic DNA of normal controls was obtained from Promega (Madison, WI). Labeling was performed using Agilent Genomic DNA enzymatic labeling kit (Agilent Technologies) and clean-up of labeled genomic DNA was performed using Amicon ultra 0.5 ml centrifugal filters according to manufacturers' instructions (Millipore, Billerica, MA). The slide was scanned on an Agilent scanner and processed with Feature Extraction software (v10.7). Results were analyzed using Agilent Genomic Workbench

(v6.0) with the following settings: ADM2 as aberration algorithm, threshold of 6.0, moving average 2 Mb.

Array-CGH was performed on the Patient 1, Patient 2, and their mother.

FISH Analysis

Confirmatory FISH was performed on metaphases obtained from 72 h PHA stimulated peripheral blood lymphocyte cultures, according to standard procedures, with selected BAC clones RP11-279G22 (4q13.2), RP11-121P15 (4q13.3), and painting probes (wcp4 and wcp21) as previously described [Liehr et al., 2002; Carreira et al., 2009], following detection of copy number changes observed by array-CGH analysis.

Analysis was carried out using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope (Zeiss; Jena, Germany) with MetaSystems (Isis) software (Altlusheim, Germany).

RESULTS

Standard GTG-banding analysis of Patient 1 revealed an addition of material within the long arm of one chromosome 21 that resembled an interstitial duplication of band 21q21 (Fig. 2A). The karyotype was interpreted as 46,XX,add(21)(q21). Patient 2 had a similar chromosome aberration, as did their mother. The father's and maternal grandmother's karyotypes were normal. The maternal grandfather had deceased.

Oligoarray-CGH analysis disclosed a 4q13.1–q13.3 duplication spanning about 8.6 Mb of genomic DNA and involving 50 genes from position 62,818,354 bp (clone A_16_p16701907) to 71,447,607 bp (clone A_16_P00996426). Proximal breakpoint is between 62,800,754 bp and 62,818,354 bp and the distal breakpoint between 71,447,607 bp and 71,464,035 bp (hg19; GRCh Build 37.1, February 2009) (Fig. 2B,D). The imbalance was observed in both of the patients and their mother.

Revisiting standard G-banding karyogram it is unlikely that there is duplication at 4q13, but it is almost certain that the duplicated segment 4q13.1–q13.3 is inserted at 21q21. The additional material on 21 turns out to be an interchromosomal IT (Fig. 2A). Confirmatory FISH was performed using specific whole chromosome painting probes and selected BACs within the region involved, RP11-279G22 localized at 4q13.2 (68,818,318 bp to 68,975,574 bp) and RP11-121P15 localized at 4q13.3 (71,380,674 bp to 71,381,247 bp) (Fig. 2C).

The final karyotype was revised to 46,XX,der(21)ins(21;4)(q21;q13.1q13.3)mat for Patient 1 and in a similar way for Patient 2.

DISCUSSION

In this study, an interchromosomal IT in two siblings, sharing learning disability, speech disorder, and ADHD, was identified. The IT results in a "pure" segmental trisomy 4q13.1–q13.3 disclosed by array-CGH and confirmed by FISH after a suspicion of an interstitial duplication at 21q21 by conventional cytogenetics. This imbalance was maternal in origin and although the mother was independent, she displayed some intellectual limitations and had a history of learning difficulties. Her family

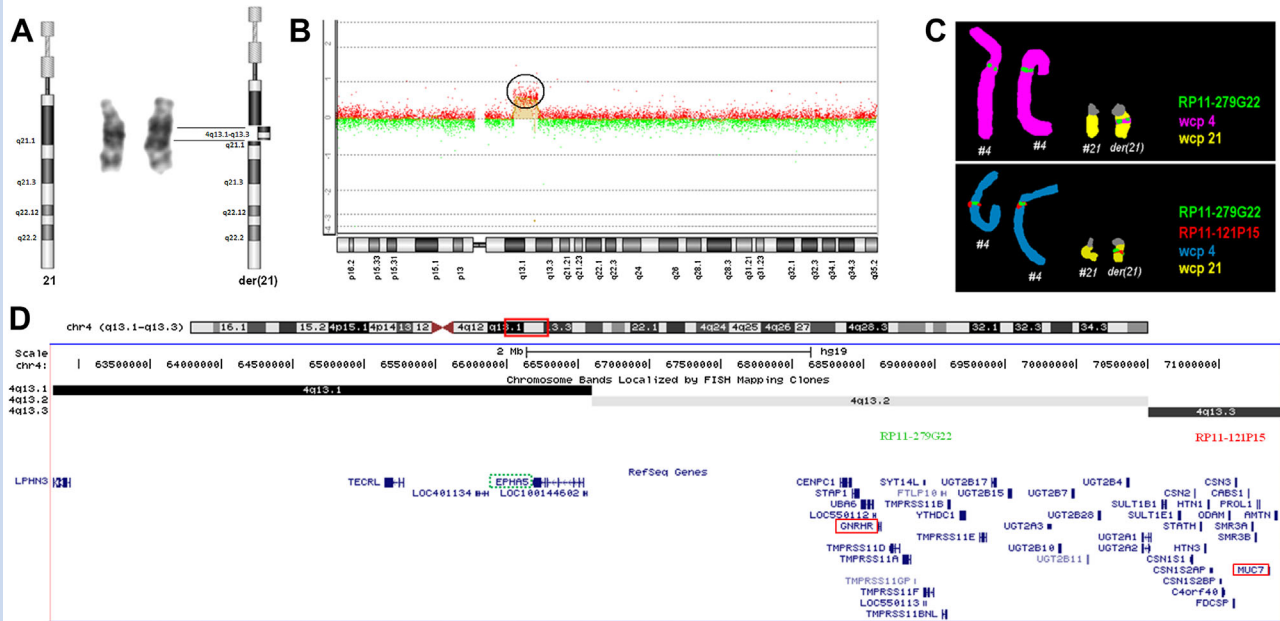


FIG. 2. Cytogenetic and array-CGH results for patient 1. **A:** Partial karyogram of chromosome 21 (G-banded) is shown, the derivative chromosome 21 is in the right with the ideogram showing the location of the insertion. **B:** Oligoarray-CGH profile for chromosome 4, with the patient DNA labeled in red (Cy5) and the control DNA labeled in green (Cy3). Log₂ ratios of zero represent equal fluorescence between both samples and the log₂ ratio of 0.58 corresponds to the copy number gain of the sample DNA—circled region. **C:** FISH results showing insertion of chromosome 4q13 material [probes RP11-279G22 in green and RP11-121P15 in red] into chromosome 21q21. **D:** Overview of the duplicated region 4q13.1–q13.3 showing: the RefSeq genes involved [genes in red full line rectangle are classified as OMIM disease genes, the gene in green dotted line rectangle encodes the EphA5 ephrin receptor] and the BAC clones used in FISH analysis [adapted from UCSC Genome Browser on February 2009 Assembly]. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

history was remarkable, with cognitive impairment in aunts and uncles in the paternal side.

There are few clinical reports regarding “pure” duplications of the proximal region of 4q overlapping band 4q13 [Mattei et al., 1979; Pescia et al., 1982; Zollino et al., 1995; Shashi et al., 1999; Bonnet et al., 2006]. To the best of our knowledge this is the first report of a duplication restricted to band 4q13. Other reports involve more proximal [Mattei et al., 1979; Pescia et al., 1982; Shashi et al., 1999; Bonnet et al., 2006] or more distal segments [Zollino et al., 1995] of this region. Mattei et al. [1979] and Shashi et al. [1999] described similar imbalances involving duplications of 4q12–q13. In the former, the proband carried an IT of 4q into chromosome 18 and the latter report it involves a direct duplication. Both patients displayed similar phenotypes with psychomotor retardation, microcephaly, and bilateral epicanthal folds [Mattei et al., 1979; Shashi et al., 1999]. In the present report, our patients and their mother do not exhibit microcephaly. Pescia et al. [1982] reported a patient with intellectual disability and minor anomalies that carried a mosaic with one cell line with a deletion of the segment 4q12→q13 and a second cell line with an intrachromosomal insertion of the same segment, resulting in partial monosomy/trisomy.

Zollino et al. [1995] described a 15-year-old girl carrying a de novo duplication 4q13.1–q22.2, with moderate intellectual disabili-

ty, minor physical anomalies, but exhibiting destructive behavior. Bonnet et al. [2006] reported a patient with a more severe phenotype, involving a mosaic supernumerary ring chromosome with a larger duplication of the proximal bands 4q10–q13, which is the only report with a more detailed characterization of the imbalance using array-CGH and FISH. Unfortunately, this is the only report where a detailed definition at the molecular level is provided.

The duplicated region 4q13.1–q13.3 observed in our patients and their mother involves 50 RefSeq genes (UCSC Browser, hg19), including 30 known protein coding genes that are listed in OMIM. Out of these, *GNRHR* (OMIM #138850) and *MUC7* (OMIM #158375) (Fig. 2D) are classified as OMIM disease genes. *GNRHR* encodes the receptor for type 1 gonadotropin-releasing hormone (GNRH), mutations that could result in partial or complete loss of function of the GNRH are associated with hypogonadotropic hypogonadism (MIM#146110) or fertile eunuch syndrome (MIM#228300). *MUC7* encodes a small salivary mucin, that is expressed in the bronchial tree as well as in the salivary glands, Kirkbride et al. [2001] suggests a protective role in the respiratory function of one of the most common alleles of *MUC7* against asthma [Kirkbride et al., 2001]. Of the remaining 28 genes, three are serine proteases (*TMPRSS11D*, *TMPRSS11A*, and *TMPRSS11E*) which may play some biological role in the host defence system, *STAP1* codes for a docking protein acting downstream of TEC

involved in adaptive immunity. *CENPC1* encodes a protein that belongs to a family that plays a central role in assembly of kinetochore proteins, mitotic progression, and chromosome segregation. Other protein coding genes in this region are: ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6 (*UBA6*), synaptogamin 14-like protein (*SYT14L*), the cluster of the *UGT2B* genes family (*UGT2B17*, *UGT2B15*, *UGT2B10*, *UGT2B7*, *UGT2B11*, *UGT2B28*, and *UGT2B4*) that are of major importance in androgen catabolism, and a UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (*UGT2A1*) involved in olfaction. There are also, two members of the sulfotransferase family (*SULT1B1* and *SULT1E1*) involved in the biotransformation of neurotransmitters and steroid hormones, three members of the casein gene family (*CSN1S1*, *CSN2*, and *CSN3*), four genes encode salivary proteins (*HTN1*, *HTN3*, *STATH*, and *SMR3B*), a member of the proline-rich protein family (*PROL1*) with a protective function at the eye surface. The amelotin (*AMTN*) gene encodes a cell adhesion protein involved in the maturation of tooth enamel, and the follicular dendritic cell secreted peptide (*FDCSP*) is involved in immune response (protein information in: <http://www.uniprot.org>). Finally, the *EPHA5* gene (OMIM #600004) encodes for a member of the EPH sub-family of receptor protein kinases, the Ephrin type-A receptor 5. It is involved in the neurogenesis and almost exclusively expressed in the nervous system (cortical neurons, cerebellar Purkinje cells and pyramidal neurons within the cortex, and hippocampus), it is not uniformly distributed in brain and is continually expressed in adulthood [Olivieri and Miescher, 1999].

EphA5 receptor plays a key role in development, and its expression is robust in many limbic structures, such as the hippocampus, amygdala, and hypothalamus [Gao et al., 1999; Yue et al., 2002]. Cooper et al. [2009] demonstrate that EphA5 and its ligand ephrin-A5 interact to promote axon termination of the midbrain dopaminergic neurons in the striatum and will probably modulate axon-target interactions in the developing dopaminergic system [Cooper et al., 2009]. EphA5 receptors are not only involved in embryonic development of the brain but also in synaptic remodeling and plasticity thought to underlie learning and memory [Bliss and Collingridge, 1993]. Gerlai et al. [1999] experimental results suggest that tubulin a component of the cytoskeleton, is underexpressed in response to EphA5 receptor activation in the adult mouse hippocampus. These findings are compatible with the known arresting effects of ephrin-A ligands on axonal and dendritic growth during CNS development [Winslow et al., 1995; Meima et al., 1997; Frisé et al., 1998]. There is however no clear evidence that over-expression of this gene could have physiopathological consequences, but when we analyze its function we cannot ignore its possible involvement in the pattern of ADHD and learning difficulties on this family.

Although *EPHA5* gene is reported in the Database of Genomic Variants as being involved in CNVs without pathological relevance in a few controls, one cannot disregard its involvement in the phenotype. In the present report, the probands' mother was initially reported as normal, but further evaluation showed her to have learning difficulties.

The resultant phenotype in this family could be determined by the gene content of the imbalance but we cannot ignore the possible involvement of the disruption of genes localized at the insertion site

on the der(21), that could have an additive contribution. This could eventually, in future, be ascertained through sequencing of the region.

ADHD is among the most heritable of neuropsychiatric disorders, thus genetic factors must play a significant role in the development and course of this disorder. Different candidate genes for ADHD have been published; most of them involved in the dopaminergic neurotransmission system. Additional candidate genes, related to neurotransmission and neuronal plasticity, have been studied less intensively. However, genome-wide association studies are a relatively new tool that enables the identification of new ADHD genes in a hypothesis-free manner. Although these latter studies could be improved and need to be replicated they are starting to implicate processes like cell division, adhesion, neuronal migration, and neuronal plasticity, as potentially important in the etiology of ADHD [Banaschewski et al., 2010].

Although familial clustering does not necessarily reflect genetic influences, the presence of this behavioral disorder in the two siblings reinforces the hypothesis that the region involved could include genes underlying ADHD [Smalley et al., 2001], probably the *EPHA5* gene could be a candidate, however other genes within the region 4q13.1–q13.3 involved or even genes disrupted at the insertion site on der(21) with abnormal expression could also be important in determining the phenotype.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the family for their willing participation in this report.

REFERENCES

- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D. 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: An overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19:237–257.
- Benn PA, Tantrarahi U. 2001. Chromosome staining and banding techniques. In: Rooney DE, editor. *Human cytogenetics: Constitutional analysis, a practical approach*, 3rd edition. Washington, DC: Oxford University Press, pp 99–127.
- Bliss TVP, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: Longterm potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:34–39.
- Bonnet C, Zix C, Grégoire MJ, Brochet K, Duc M, Rousselet F, Philippe C, Jonveaux P. 2006. Characterization of mosaic supernumerary ring chromosomes by array-CGH: Segmental aneusomy for proximal 4q in a child with tall stature and obesity. *Am J Med Genet Part A* 140A:233–237.
- Carreira IM, Melo JB, Rodrigues C, Backx L, Vermeesch J, Weise A, Kosyakova N, Oliveira G, Matoso E. 2009. Molecular cytogenetic characterisation of a mosaic add(12)(p13.3) with an inv dup(3)(q26.31→qter) detected in an autistic boy. *Mol Cytogenet* 2:16.
- Cooper MA, Kobayashi K, Zhou R. 2009. Ephrin-A5 regulates the formation of the ascending midbrain dopaminergic pathways. *Dev Neurobiol* 69:36–46.
- Ferreira SI, Matoso E, Venâncio M, Saraiva J, Melo JB, Carreira IM. 2012. Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille syndrome region. *Mol Cytogenet* 5:25.

- Frisén J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DDM, Barbacid M. 1998. Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* 20:235–243.
- Gao PP, Yue Y, Cerretti DP, Dreyfus C, Zhou R. 1999. Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4073–4077.
- Gerlai R, Shinsky N, Shih A, Williams P, Winer J, Armanini M, Cairns B, Winslow J, Gao W, Phillips HS. 1999. Regulation of learning by EphA receptors: A protein targeting study. *J Neurosci* 19:9538–9549.
- Kang S-HL, Shaw C, Ou Z, Eng PA, Cooper ML, Pursley AN, Sahoo T, Bacino CA, Chinault AC, Stankiewicz P, Patel A, Lupski JR, Cheung SW. 2010. Insertional translocation detected using FISH confirmation of array-comparative genomic hybridization (aCGH) results. *Am J Med Genet Part A* 152A:1111–1126.
- Kirkbride HJ, Bolscher JG, Nazmi K, Vinall LE, Nash MW, Moss FM, Mitchell DM, Swallow DM. 2001. Genetic polymorphism of MU C7: Allele frequencies and association with asthma. *Eur J Hum Genet* 9:347–354.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. 2002. Microdissection based high resolution multicolour banding for all 24 chromosomes. *Int J Mol Med* 9:335–339.
- Mattei MG, Mattei JF, Bernard R, Giraud F. 1979. Partial trisomy 4 resulting from a complex maternal rearrangement of chromosomes 2, 4, and 18 with interstitial translocation. *Hum Genet* 51:55–61.
- Meima L, Kljavin IJ, Shih A, Winslow JW, Caras IW. 1997. AL-1-induced growth cone collapse of rat cortical neurons is correlated with REK7 expression and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur J Neurosci* 9:177–188.
- Olivieri G, Miescher GC. 1999. Immunohistochemical localization of EphA5 in the adult human central nervous system. *J Histochem Cytochem* 47:855–861.
- Pescia G, Tonella A, Jotterand-Bellomo M. 1982. Monosomy/trisomy 4q12 to q13 mosaicism in a retarded and dysmorphic girl. *Ann Genet* 25:110–112.
- Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. 2009. An international system for human cytogenetic nomenclature. AG, Basel: Karger.
- Shashi V, Berry MN, Santos C, Pettenati MJ. 1999. Partial duplication of 4q12q13 leads to a mild phenotype. *Am J Med Genet* 86:51–53.
- Smalley SL, McCracken J, McGough J. 2001. Refining the ADHD phenotype using affected sibling pair families. *Am J Med Genet* 105:31–33.
- Van Hemel JO, Eussen HJ. 2000. Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet* 107:415–432.
- Winslow JW, Moran P, Valverde J, Shih A, Yuan JQ, Wong SC, Tsai SP, Goddard A, Henzel WJ, Hefti F, Beck KD, Caras IW. 1995. Cloning of AL-1, a ligand for an eph-related tyrosine kinase receptor involved in axon bundle formation. *Neuron* 14:973–981.
- Yue Y, Chen ZY, Gale NW, Blair-Flynn J, Hu TJ, Yue X, Cooper M, Crockett DP, Yancopoulos GD, Tessarollo L, Zhou R. 2002. Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10777–10782.
- Zollino M, Zampino G, Torrioli G, Pomponi MG, Neri G. 1995. Further contribution to the description of phenotypes associated with partial 4q duplication. *Am J Med Genet* 57:69–73.

Artigo 2

Cryptic 7q36.2q36.3 deletion causes multiple congenital eye anomalies and craniofacial dysmorphism

Beleza-Meireles A*, **Matoso E***, Ramos L, Melo JB, Carreira IM, Silva ED, Saraiva JM

*Shared first authorship

American Journal of Medical Genetics Part A (2013) [doi: 10.1002/ajmg.a.35713](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35713)

Cryptic 7q36.2q36.3 Deletion Causes Multiple Congenital Eye Anomalies and Craniofacial Dysmorphism

Ana Beleza-Meireles,^{1,2*†} Eunice Matoso,^{3†} Lina Ramos,¹ Joana B. Melo,^{3,4} Isabel M. Carreira,^{3,4} Eduardo D. Silva,^{5,6} and Jorge M. Saraiva^{1,7}

¹Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Departamento Pediátrico, Serviço de Genética Médica, Coimbra, Portugal

²Manchester University, Genetic Medicine, St Mary's Hospital, Coimbra, Portugal

³Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Departamento de Citogenética e Genómica, Coimbra, Portugal

⁴Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Coimbra, Portugal

⁵Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Serviço de Oftalmologia, Coimbra, Portugal

⁶Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, IBILI, Coimbra, Portugal

⁷Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Departamento Pediátrico, Coimbra, Portugal

Manuscript Received: 21 February 2012; Manuscript Accepted: 16 September 2012

A patient with a de novo cryptic 7q36.2q36.3 deletion presented with multiple congenital eye abnormalities, short stature and craniofacial dysmorphism, in the absence of intellectual disability. This report further delineates the 7q36 microdeletion syndrome. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: cryptic deletion; 7q36; microdeletion; *SHH* gene; dysmorphism

How to Cite this Article:

Beleza-Meireles A, Matoso E, Ramos L, Melo JB, Carreira IM, Silva ED, Saraiva JM. 2013. Cryptic 7q36.2q36.3 deletion causes multiple congenital eye anomalies and craniofacial dysmorphism.

Am J Med Genet Part A 161A:589–593.

INTRODUCTION

With the increasing availability of array comparative genomic hybridization (array-CGH), copy number variations have been found enriched among children with developmental delay with and without congenital anomalies [Miller et al., 2010; Cooper et al., 2011]. Due to the complexity of embryological development and its vulnerability to dosage imbalances, it is not surprising that cryptic genomic rearrangements are important causes of congenital abnormalities.

The vertebrate eye is an example of a complex organ, comprising highly specialized tissues (cornea, lens and retina) of different embryological origin. The timely action of transcription factors, such as *SHH* (Sonic Hedgehog) and *PAX6* (Paired Box 6), their inductive signals and the gradients generated between them ensure the correct development of the different ocular structures. Studies of model organisms [Gongal et al., 2011] have shown that disturbances in the dosage and fine balance between developmental toolkit genes, regulators of development, lead to multiple congenital eye defects [Graw, 2010; Slavotinek, 2011].

We describe a de novo cryptic interstitial chromosomal 7q36.2q36.3 deletion underlying multiple malformations that comprise eye abnormalities, short stature, craniofacial dysmorphism

and agenesis of both central maxillary incisors in a boy with normal psychomotor development.

CLINICAL REPORT

Our patient was born at 39 weeks gestational to healthy, young, nonconsanguineous parents, with no relevant family history, with birth weight of 2900 g (9th–25th centile) and length of 45 cm (<2nd centile), respectively. His occipito-frontal circumference (OFC) was 32.5 cm (2nd–9th centile). The growth parameters were compared to the WHO Child Growth Standards (www.who.int/childgrowth/en). Two hours after birth he was admitted at the neonatal intensive care unit due to respiratory distress secondary to tracheomalacia. Furthermore, he was noted to

[†]Shared first authorship.

*Correspondence to:

Ana Beleza-Meireles, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Departamento Pediátrico, Serviço de Genética Médica, Coimbra, Portugal. E-mail: ana.beleza@chc.min-saude.pt

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 7 February 2013

DOI 10.1002/ajmg.a.35713

have nasal septum deviation and bilateral vertical talus, which later required surgery. Significant ocular malformations were observed, including severe left microphthalmia with microcornea and hypoplastic optic disc (an ocular prosthesis was later adapted over the eye remnant). The right eye was moderately microphthalmic showing microcornea and an inferior chorioretinal coloboma not affecting the macula. An initial cytogenetics analysis by standard G-banding was reported as normal. He was discharged after 1 month with resolution of the respiratory distress.

During his first 6 months of life, all growth parameters fell off in the growth curves, stabilizing at age 24 months between the 2nd and the 9th centiles for weight and between the 0.4th and 2nd centiles for height and OFC. He had no feeding difficulties and presented an otherwise good general condition. Routine laboratory tests ruled out common causes of failure to thrive, such as gastro-intestinal disorders, cystic fibrosis, celiac disease, kidney problems, endocrine abnormalities or chronic infection.

He developed horizontal nystagmus at age 3 months, and a right partial rhegmatogenous retinal detachment was diagnosed. He underwent pars plana vitrectomy, with external circular indentation and internal tamponade. At age 1 year, a head CT scan confirmed a right microphthalmic eye with posterior subluxated lens and dysplastic optic nerve, as well as the right inferior nasal chorioretinal coloboma and a completely attached retina. The left eye presented severe microphthalmia (axial length less than 10 mm)

and a hypoplastic optic nerve. No intraorbital cystic structures were identified.

His nystagmus became less apparent, although he still uses an abnormal head position to improve visual acuity. At present, his best corrected visual acuity is 20/100 (with $-13.00 + 3.00 \times 50$ -myopic astigmatism). In his right eye, he presents a 9 mm microcornea, 360° hypoplastic and heterochromic iris and a transparent lens. Fundus examination confirmed a right colobomatous dysplastic optic disc, several peripapillary coloboma-like areas and vitreoretinal degeneration (Fig. 1a). Nerve fiber layer OCT (Spectralis) analysis of the right disc confirmed normal thickness for the nasal, superior, and temporal quadrants, while the inferior quadrant was outside normal limits (80 micra, $P < 0.01$).

He was referred to the Medical Genetics department at age 13 years by his ophthalmologist. He presented a stature of 137 cm and weight of 28.8 kg, both between the 0.4th and the 2nd centiles, which were significantly below the target centile range, based on the mid-parental height. His OFC was 49 cm (< 0.4 th centile). His short stature was proportionate. Facial dysmorphic features were observed and included a long, thin face, bitemporal narrowing, midface hypoplasia, depressed nasal bridge, and long nasal ridge, smooth, short philtrum, and thin vermilion of the upper lip (Fig. 1b,c). Other phenotypical characteristics included tapered fingers, proximal implantation of thumbs and short fifth finger (Fig. 1d), pes planus, high palate and absence of the two

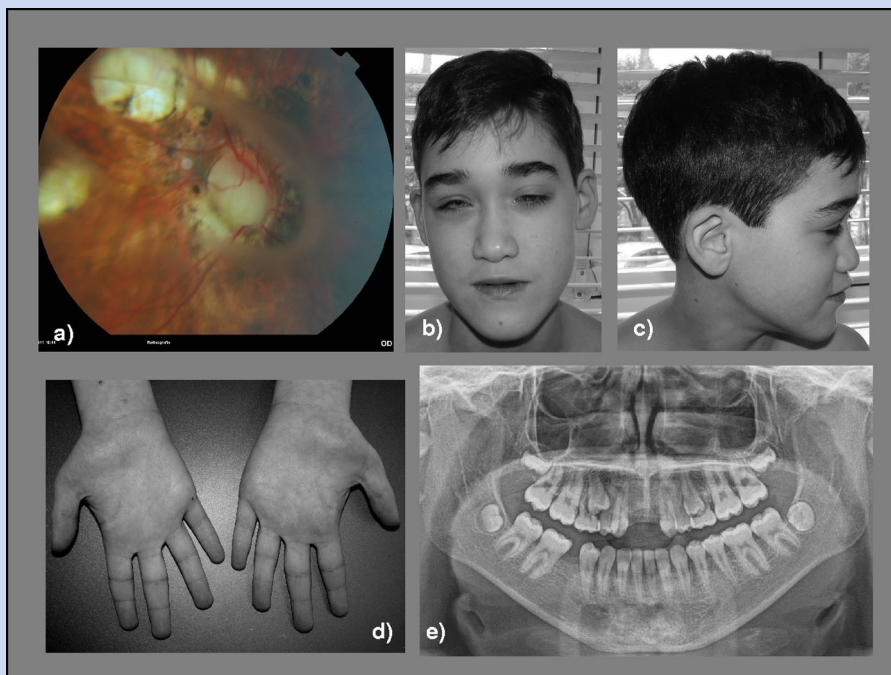


FIG. 1. a: Ophthalmological examination showing pale optic disc coloboma, several chorioretinal lacunae [coloboma-like lesions] in the superotemporal quadrant and temporal macula, heterogeneity of the RPE with peripapillary atrophy and hyperpigmentation. A falciform vitreous veil partially distorts the fundus image. The retina was attached 360°. b,c: The patient presents a long face, depressed nasal bridge, long nasal ridge, thin vermilion of the upper lip and absence of the two maxillary central incisors. d: Tapering fingers and short fifth finger could be observed. e: Orthopantomogram [Dental Panoramic Radiograph], showing a panoramic scanning dental X-ray of the upper and lower jaw and evidencing agenesis of the two central maxillary incisors. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/ajmga>]

central maxillary incisors (Fig. 1e). Brain MRI scan, skeletal survey (including bone age), heart, abdominal and renal/pelvic ultrasound were normal.

He presents no learning disabilities. Psychomotor development was evaluated using the Wechsler Intelligence Scale for Children, 3rd ed. (WISC-III). His global level of cognitive functioning (IQ) was at the 50th centile for his chronological age, when compensated for his visual impairment.

METHODS AND RESULTS

Cytogenetic and Molecular Studies

High resolution cytogenetic analysis suggested a small cryptic terminal deletion at 7q36. In order to further study the putative rearrangement, MLPA subtelomeric screening (P036, P070—MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) was performed and had a normal result. In order to confirm or rule out an interchromosomal rearrangement, FISH (Fluorescence in situ Hybridization) was applied using subtelomere specific probes (ToTelVysion, Abbott Molecular, IL), which showed again a normal result. Oligoarray-CGH analysis using Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180 K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) revealed a deletion spanning about 2.9 Mb of genomic

DNA between 153,206,357 and 156,133,135 bp (hg19; GRCh Build 37.1, February 2009) [Kent et al., 2002] (Fig. 2). His parents do not carry this deletion, and therefore we concluded that this was a *de novo* rearrangement.

The final karyotype of the proband was 46,XY,del(7)(q36.1~q36.3).arr 7q36.2q36.3(153,206,357–156,133,135)x1dn.

Analysis of the Deletion

The deletion encompasses 11 RefSeq genes, seven are listed in OMIM (*HIR5A*, *INSIG1*, *DPP6*, *CNPY1*, *PAXIP1*, *EN2*, *SHH*). In silico analysis indicates that the last four genes listed are involved in development. Larger 7q36.3-qter deletions have been described in the literature [Frints et al., 1998; Horn et al., 2004; Ginocchio et al., 2008]. Most of these patients presented significant psychomotor development delay, failure to thrive, microcephaly, holoprosencephaly spectrum disorders and associated brain malformations. Most had additional major malformations (Table I).

The Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>) reports copy number variants (including deletions) involving *PAXIP1*, *CNPY1*, and *EN2*, but not *SHH*. A deletion with similar breakpoints has not yet been described in the Database

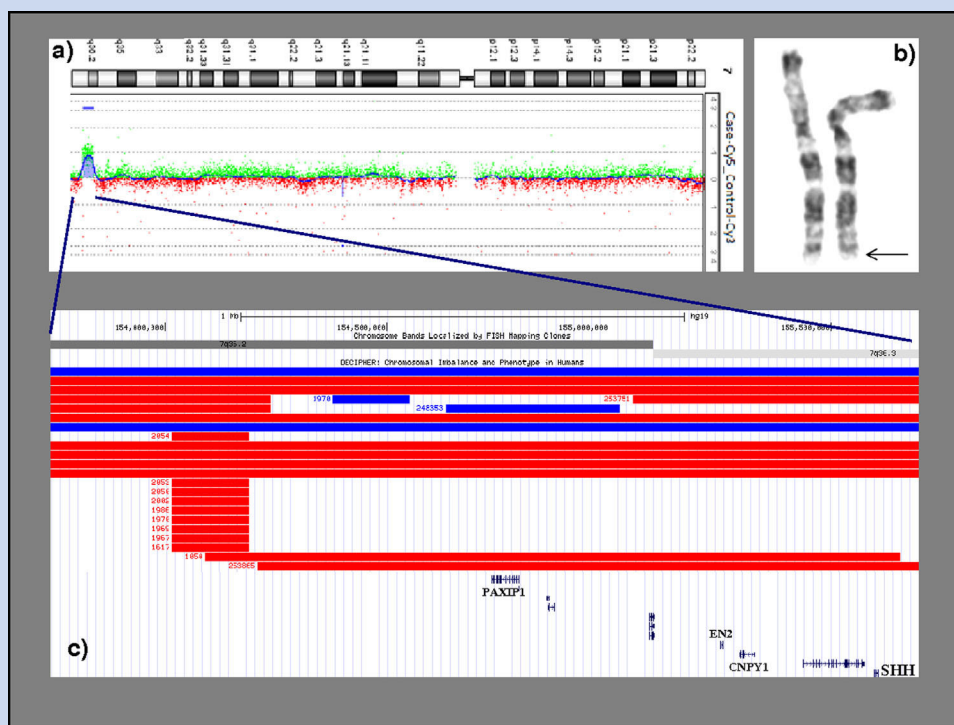


FIG. 2. a: Oligoarray-CGH ratio profiles for chromosome 7 showing a *de novo* deletion at 7q36.2–q36.3 between the nucleotide positions 153,206,357–156,133,135. b: Partial G-banded karyogram of pair 7, the arrow indicates the region with the cryptic deletion. c: Image showing a detail of the deleted 7q36.2–q36.3 genomic fragment, indicating, as red horizontal bars patients which have been described with partially overlapping deletions, as well as duplications in blue. Most of the reported deletions are significantly larger than our patient's deletion. [UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 [GRCh37/hg19] Assembly]. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/ajmga>]

TABLE I. Comparison of Some Cases Reported in the Literature Presenting Submicroscopic Chromosomal Rearrangements Involving 7q36

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8
Failure to thrive/short stature	—	—	+	+	+	+	+	+
Microcephaly	+	+	+	+	+	+	+	+
Midface hypoplasia	+	+	+	+	+	—	—	+
Depressed nasal bridge			+	+	—	—	—	+
Maxillary central incisor	+	+	—	—	+	—	—	—
Other dental anomalies	—	—	—	—	—	+ ^d	+ ^f	+ ⁱ
Choanal narrowing	—	—	—	—	—	—	—	—
Feeding problems	—	—	+	+	—	+	+	—
Currarino syndrome spectrum	+	+	—	+	—	—	—	—
Hypoplasia/agenesis of the corpus callosum	—	—	+	—	+	—	+	—
Other brain anomaly	—	—	—	—	^b	—	^g	—
Ophthalmological anomalies	—	—	^a	—	^c	^e	^h	+ ^j
Psychomotor development delay	+	+	+	+	+	+	+	—
	Masuno et al. [1990]	Masuno et al. [1990]	Frints et al. [1998]	Horn et al. [2004]	Horn et al. [2004]	Horn et al. [2004]	Horn et al. [2004]	Our patient

(+) Present; (—) not present or not described.

^aNystagmus, small but normal optic discs.

^bHypoplasia of the pituitary gland.

^cStrabismus convergens and ptosis.

^dAbsence of primary and permanent incisors in the lower and upper jaw.

^eCongenital cataracts, bilateral colobomas of the choroid and bilateral ptosis.

^fUnevenly spaced teeth.

^gDilated lateral ventricles.

^hBilateral sensorineural hearing loss.

ⁱAbsent medial upper incisors.

^jMicrophthalmia, microcornea, hypoplastic optic disc (further description in the text).

of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER, <https://decipher.sanger.ac.uk/>). Most patients reported in DECIPHER present larger deletions or duplications and these have a more severe phenotype. However, a few patients are reported with partially overlapping deletions of similar lengths (Fig. 2c), particularly patients 253865 and 1050: The first is reported to have intellectual disability/developmental delay. The latter has a smaller deletion including *SHH*, and presents choanal stenosis, iris coloboma, microphthalmia, plagiocephaly and short stature of prenatal onset; thus, there are some similarities with our patient's phenotype.

DISCUSSION

We report on a cryptic de novo cryptic deletion at 7q36.2q36.3 in a male with multiple congenital abnormalities, particularly defects in eye development. The report of overlapping deletions in other patients supports the pathogenic role of submicroscopic chromosomal rearrangements involving 7q36 [Frints et al., 1998; Horn et al., 2004; Ginocchio et al., 2008]. Our patient's presentation appears partially congruent with that of another patient with a partially overlapping deletion; particularly ocular anomalies associated with *SHH* loss-of-function mutations and holoprosencephaly [Pineda-Alvarez et al., 2011]. Furthermore, he lacks both maxillary central incisors, an unusual finding which further delineates the 7q36 deletion syndrome.

This rearrangement affects several genes involved in early development, particularly *SHH*, *EN2*, *CNPY1*, and *PAXIP1*, which are

highly conserved genes. The dose dependent gradients between these molecules are important in early morphogenesis. Therefore, it would not be surprising that malformations can arise if these events are disturbed, for instance, by a cryptic chromosomal deletion.

The fact that CNVs affecting *PAXIP1*, *EN2*, and *CNPY1* have been reported indicates that haploinsufficiency for these genes is probably not pathogenic. In contrast, no CNVs affecting *SHH* have been documented, which is understandable given its well established role in human development and disease [Frints et al., 1998; Horn et al., 2004; Gongal et al., 2011; Pineda-Alvarez et al., 2011; Slavotinek, 2011], *SHH* deletion appears to cause most of the phenotype in our patient.

SHH plays a key role in regulating vertebrate organogenesis, such as in the growth of digits on limbs and patterning of the central nervous system. It is known that defects in *SHH*, or components of the *SHH* signaling cascade, cause holoprosencephaly spectrum disorders, with a continuum of brain, growth and craniofacial anomalies. A broad range of ocular abnormalities has been reported as part of the holoprosencephaly spectrum, which includes midline anomalies, ranging from cyclopia to hypotelorism, chorioretinal and iris coloboma, microphthalmia and high refractive errors [Pineda-Alvarez et al., 2011]. The importance of sonic hedgehog signaling in eye development is well established, particularly in the separation of the single eye field [Graw, 2010; Pottin et al., 2011; Slavotinek, 2011]. In addition, it is required for normal retinal morphogenesis, retinal ganglion cell axon pathfinding and tectal targeting in the developing visual system. Its signaling is also

required for initial target recognition at the optic tectum [Gordon et al., 2010].

CONCLUSION

We describe a de novo cryptic deletion at 7q36.2q36.3, causing multiple congenital anomalies, further delineating the 7q36 deletion syndrome. Our report illustrates how the application of array-based comparative genomic hybridization for genetic testing of individuals with unexplained inborn errors of development can provide a window through which we can better understand normal morphogenesis at the molecular level.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patient and his parents. This study makes use of data generated by the DECIPHER Consortium.

REFERENCES

- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V, Abdel-Hamid H, Bader P, McCracken E, Niyazov D, Leppig K, Thiess H, Hummel M, Alexander N, Gorski J, Kussmann J, Shashi V, Johnson K, Rehder C, Ballif BC, Shaffer LG, Eichler EE. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 43:838–846.
- Frints SG, Schoenmakers EF, Smeets E, Petit P, Fryns JP. 1998. De novo 7q36 deletion: Breakpoint analysis and types of holoprosencephaly. *Am J Med Genet* 75:153–158.
- Ginocchio VM, De Brasi D, Genesio R, Ciccone R, Gimelli S, Fimiani F, de Berardinis T, Nitsch L, Banfi S, Magli A, Della Casa R. 2008. Sonic Hedgehog deletion and distal trisomy 3p in a patient with microphthalmia and microcephaly, lacking cerebral anomalies typical of holoprosencephaly. *Eur J Med Genet* 51:658–665.
- Gongal PA, French CR, Waskiewicz AJ. 2011. Aberrant forebrain signaling during early development underlies the generation of holoprosencephaly and coloboma. *Biochim Biophys Acta* 1812:390–401.
- Gordon L, Mansh M, Kinsman H, Morris AR. 2010. *Xenopus* sonic hedgehog guides retinal axons along the optic tract. *Dev Dyn* 239:2921–2932.
- Graw J. 2010. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 90:343–386.
- Horn D, Tönnies H, Neitzel H, Wahl D, Hinkel GK, von Moers A, Bartsch O. 2004. Minimal clinical expression of the holoprosencephaly spectrum and of Currarino syndrome due to different cytogenetic rearrangements deleting the Sonic Hedgehog gene and the HLXB9 gene at 7q36.3. *Am J Med Genet Part A* 128A:85–92.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. 2002. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12:996–1006.
- Masuno M, Fukushima Y, Sugio Y, Ikeda M, Kuroki Y. 1990. Two unrelated cases of single maxillary central incisor with 7q terminal deletion. *J Human Genet* 35:311–317.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biasecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. 2010. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86:749–764.
- Pineda-Alvarez DE, Solomon BD, Roessler E, Balog JZ, Hadley DW, Zein WM, Hadsall CK, Brooks BP, Muenke M. 2011. A broad range of ophthalmologic anomalies is part of the holoprosencephaly spectrum. *Am J Med Genet Part A* 155A:2713–2720.
- Pottin K, Hinaux H, Rétaux S. 2011. Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 138:2467–2476.
- Slavotinek AM. 2011. Eye development genes and known syndromes. *Mol Genet Metab* 104:448–456.

Artigo 3

Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille syndrome region

Ferreira SI, **Matoso E**, Venâncio M, Saraiva J, Melo JB, Carreira IM

Molecular Cytogenetics (2012) [doi:10.1186/1755-8166-5-25](https://doi.org/10.1186/1755-8166-5-25)

CASE REPORT

Open Access

Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille syndrome region

Susana Isabel Ferreira¹, Eunice Matoso^{1,3}, Margarida Venâncio², Jorge Saraiva², Joana B Melo^{1,3} and Isabel Marques Carreira^{1,3*}

Abstract

Background: Standard cytogenetic analysis has revealed to date more than 30 reported cases presenting interstitial deletions involving region 2q31-q32, but with poorly defined breakpoints. After the postulation of 2q31.2q32.3 deletion as a clinically recognizable disorder, more patients were reported with a critical region proposed and candidate genes pointed out.

Results: We report two female patients with *de novo* chromosome 2 cytogenetically visible deletions, one of them with an additional *de novo* deletion in chromosome 20p12.2p12.3. Patient I presents a 16.8 Mb deletion in 2q31.2q32.3 while patient II presents a smaller deletion of 7 Mb in 2q32.1q32.3, entirely contained within patient I deleted region, and a second 4 Mb deletion in Alagille syndrome region. Patient I clearly manifests symptoms associated with the 2q31.2q32.3 deletion syndrome, like the muscular phenotype and behavioral problems, while patient II phenotype is compatible with the 20p12 deletion since she manifests problems at the cardiac level, without significant dysmorphisms and an apparently normal psychomotor development.

Conclusions: Whereas Alagille syndrome is a well characterized condition mainly caused by haploinsufficiency of *JAG1* gene, with manifestations that can range from slight clinical findings to major symptoms in different domains, the 2q31.2q32.3 deletion syndrome is still being delineated. The occurrence of both imbalances in reported patient II would be expected to cause a more severe phenotype compared to the individual phenotype associated with each imbalance, which is not the case, since there are no manifestations due to the 2q32 deletion. This, together with the fact that patient I deleted region overlaps previously reported cases and patient II deletion is outside this common region, reinforces the existence of a critical region in 2q31.3q32.1, between 181 to 185 Mb, responsible for the clinical phenotype.

Keywords: 2q31.2q32.3 deletion, Critical region, Alagille syndrome

Background

Standard cytogenetic analysis has revealed to date more than 30 reported cases presenting interstitial deletions involving region 2q31-q32, but with poorly defined breakpoints [1]. After the reports of Van Buggenhout *et al.* [2]

and Mencarelli *et al.* [3], Prontera *et al.* [4] was the first to postulate 2q31.2q32.3 deletion as a clinically recognizable disorder. Rifai *et al.* [1] and Cocchella *et al.* [5] reported two additional patients, with the last one refining a critical region for the syndrome and pointing out candidate genes to explain the phenotype. The common clinical features include pre- and postnatal growth retardation, severe mental retardation, distinct facial dysmorphisms, thin and sparse hair, micrognathia, cleft or high palate, relative macroglossia, dacryocystitis (inflammation and infection

* Correspondence: i_marques@hotmail.com

¹Laboratório de Citogenética e Genómica - Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

³CIMAGO – Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal
Full list of author information is available at the end of the article

of the tear sac), persistent feeding difficulties, inguinal hernia and broad-based gait [1].

An already established condition is Alagille syndrome (AGS - OMIM 118450), a multi-system, dominantly inherited developmental disorder [6]. AGS maps to 20p12 and is mainly caused by haploinsufficiency of the Jagged-1 gene (*JAG1*- OMIM 601920), due to mutations in 70% of the cases and to deletions in 3-7% of the patients [6]. The clinical manifestations of the syndrome are highly variable, ranging from slight clinical findings to major symptoms in 5 domains: cardiac, skeletal, ocular, facial and liver [6].

We report two different female patients with chromosome 2 deletions, both *de novo*. Patient I presents a 16.8 Mb deletion in 2q31.2q32.3 while patient II presents a smaller deletion of 7 Mb in 2q32.1q32.3, entirely contained within patient I deleted region. Besides this deletion patient II also presents a *de novo* 4 Mb deletion in 20p12.2p12.3 Alagille syndrome region. Patient I manifests symptoms clearly associated with the 2q31.2q32.3 deletion syndrome, while patient II manifestations are exclusively associated with AGS. As the region deleted exclusively in patient I, and normal in patient II, overlaps the previously reported deletions [3-5], we intent to contribute to the refinement of the critical region responsible for the 2q31.2q32.3 deletion syndrome.

Clinical report

Patient I

Girl with 8 years and 9 months old, the second female child of healthy unrelated parents with an unremarkable family history. The pregnancy was uneventful, without any signs of intrauterine growth restriction and the birth was normal at 36 weeks gestation. Birth weight was 2470 g (50th centile), birth length 44 cm (10th centile) and birth head circumference 32.5 cm (50th centile). At the age of 8 years her height was 124.5 cm (25th centile), her weight 25.3 kg (50th centile) and head circumference 52.5 cm (75th centile). In the first year of life she had recurrent episodes of dacryocystitis and feeding problems, but nowadays she has uncontrollable eating habits which her parents cope with successfully. She has behavioral problems, with some aggressively and an unpredictable humor, but has an active speech. According to the Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC), she has mild mental retardation with a full scale IQ score of 69, verbal IQ score of 73 and performance IQ score of 75. Distinguishing features include thick and coarse hair, dry skin, brachycephaly with a large but narrow forehead, deep set eyes and midface hypoplasia. The palate is high and narrow, similarly to her mother and other familiars. She has bilateral tapering fingers, sandal gap and limb muscle hypertrophy with difficulties in motor coordination and fine motor skills.

Patient II

Three year-old girl, the third child of a healthy unrelated couple, with an unremarkable family history. She was born at 36 weeks of gestation, but at 34 weeks was identified an oligohydramnios. Cytogenetic prenatal diagnosis due to advanced maternal age was performed in another laboratory and revealed a normal karyotype. At delivery her birth weight was 2164 g (between the 25th and the 75th percentile), birth length 43 cm (3rd percentile) and birth occipitofrontal circumference (OFC) 30 cm (below the 5th percentile). Her Apgar score (9 at the first minute and 10 at the fifth minute) was normal. In the neonatal period she was admitted in a neonatal intensive care unit for 20 days due to a urinary tract infection. Complementary diagnostic exams revealed a congenital heart disease characterized by a subaortic ventricular septal defect, pulmonary stenosis and a patent *ductus arteriosus*. The renal ultrasound made the diagnosis of a vesicoureteral reflux. Clinical examination at 19 months revealed no significant dysmorphisms with an apparently normal psychomotor development. Her standing height (77.5 cm, 10th percentile) and OFC (46 cm, 25th percentile) were normal, but her weight was below the 5th percentile (9.040 g).

Standard cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes was performed on both patients revealing imbalances on chromosome 2 that were further characterized by oligoarray-CGH.

Results

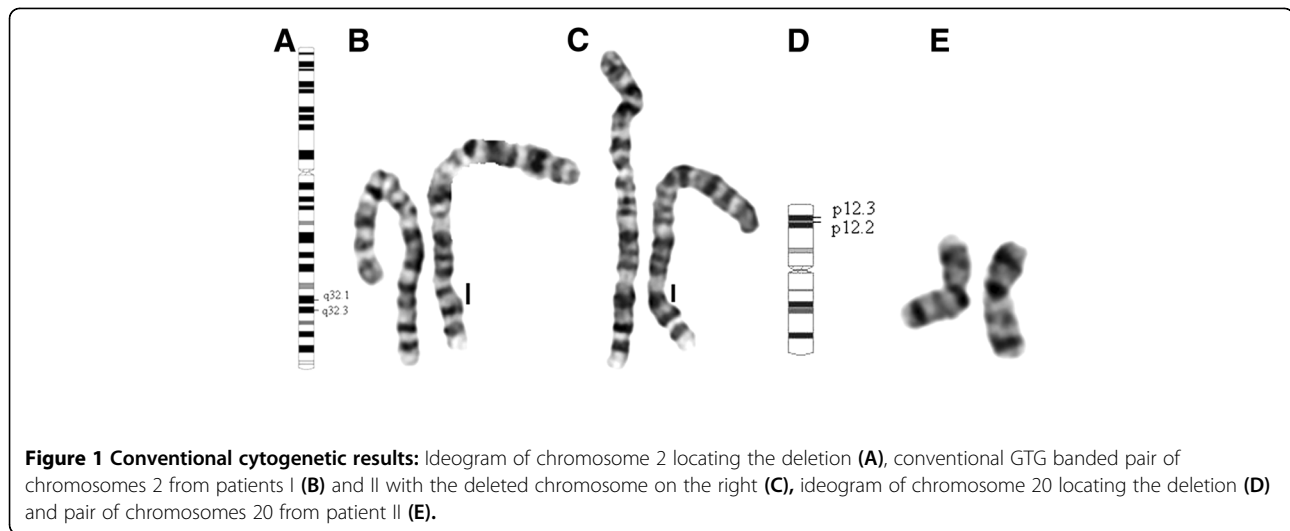
Chromosomal analysis of G-banded metaphases from probands and their progenitors showed both patients to have *de novo* (paternity and maternity confirmed) interstitial deletions in chromosome 2 between bands 2q32.1q32.3 (Figure 1A-C). Karyotypes of both girls were

46,XX,del(2)(q32.1 ~ q32.3)dn.

Oligoarray-CGH analysis confirmed both deletions spanning in patient I about 16.8 Mb of genomic DNA and in patient II 7 Mb (Figure 2A-C). In patient I the deletion involves 72 genes from position 178,121,127 bp (clone A_16_P00537150) to 194,943,948 bp (clone A_16_P36015481), with the proximal breakpoint between 178,112,041 bp and 178,112,127 bp and the distal breakpoint between 194,943,948 bp and 194,976,996 bp (mapped according to GRCh37, hg 19) (Figure 2B, D). Patient I final karyotype was:

46,XX,del(2)(q32.1 ~ q32.3).arr 2q31.2q32.3(178,121,127-194,943,948)x1 dn.

In patient II the deletion involves 37 genes from position 186,138,564 bp (clone A_16_P15961767) to 193,143,843 bp (clone A_18_P13572014) with the proximal breakpoint



between 186,075,664 bp and 186,138,564 bp and the distal breakpoint between 193,143,843 bp and 193,194,619 bp (mapped according to GRCh37, hg 19) (Figure 2C, E). Oligoarray-CGH analysis also disclosed an unexpected 20p12.2p12.3 deletion in patient II spanning about 4 Mb and involving 13 genes from position 7,993,915 bp (clone A_16_P21064860) to position 11,937,684 bp (clone A_16_P03485400). The distal breakpoint is between 7,982,406 bp and 7,993,915 bp and the proximal breakpoint between 11,937,684 bp and 11,982,565 bp (mapped according to GRCh37, hg 19) (Figure 2F-H). Revisiting standard G-banded metaphases it is not possible to detect the 20p12.2p12.3 deletion with certainty, since it is within a cytogenetic difficult region (Figure 1D-E). MLPA SALSA P297-B1 for microdeletion syndromes (MRC-Holland) contains two probes for gene *PAK7*, included in the 20p deletion. It allowed us to confirm the proband's deletion and to conclude it is *de novo* (paternity and maternity confirmed). Patient II final karyotype was:

46,XX,del(2)(q32.1~q32.3).arr 2q32.1q32.3(186,138,564-193,143,843)x1,20p12.3p12.2(7,993,915-11,937,684)x1 dn

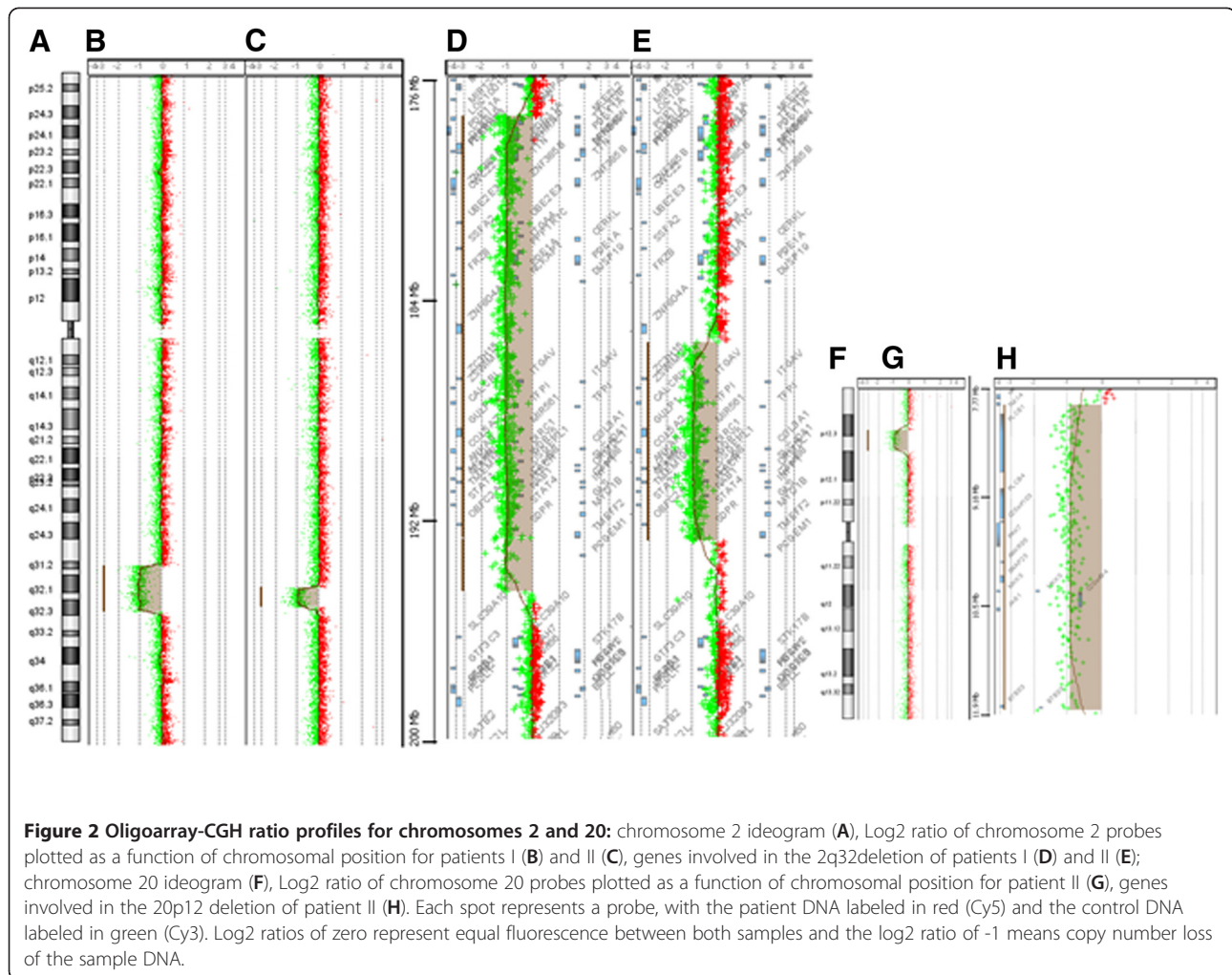
Discussion

Conventional cytogenetic evaluation of the reported patients revealed chromosome 2q32 deletions that were confirmed and refined by oligoarray-CGH. This molecular technique also revealed a 20p12 deletion in the Alagille syndrome region in patient II, enabling us to conclude that one of the reported patients presents two *de novo* deletions in two different chromosomes, both associated with described syndromes.

In patient I, chromosome 2 deleted region involves 72 genes, with 14 reported in OMIM Morbid Map, and in patient II it involves 37 genes, all in common with patient I. Of the 37 genes that are deleted in both patients,

6 are described in the OMIM Morbid Map (Figure 3). One of those genes is *MSTN* (myostatin - OMIM 601788) whose loss-of-function mutations are associated with muscle hypertrophy, the increase of the size of muscle cells [7]. While reported patient I presents a muscular phenotype and an inadequate strength to her age, patient II does not present such features. We cannot disregard the reduced age of patient II, that might justify the actual absence of manifestations related to *MSTN* deletion, but this is also in accordance with Prontera *et al.* [4] argument that the manifestation of a muscular phenotype can occur in patients with larger 2q31.2q32.3 deletions rather than in those with more distal deletions.

Considered as a possible candidate gene for the behavioral phenotype in patients with 2q32 deletions is *GLS* (glutaminase, phosphate-activated - OMIM 138280), that encodes the major enzyme yielding glutamate from glutamine, whose importance is derived from its probable implication in behavior disturbances in which glutamate acts as a neurotransmitter [8,9]. This gene is deleted in both patients, and while patient I presents behavioral problems, patient II has an apparently normal psychomotor development to date. Meanwhile, according to the haploinsufficiency scores defined by the study of Huang *et al.* [10], *GLS* has a score of 69%, making it a gene more likely to be haplosufficient. Considering this data and the absence of manifestations in reported patient II, the behavioral phenotype in patient I might be caused by the deletion of *ZNF804A* gene (zinc finger protein 804A - OMIM 612282), whose haploinsufficiency score is 32%. This score together with the described involvement of zinc finger genes in mental retardation make *ZNF804A* a candidate gene for cognitive and behavioral disturbances, consistently with previous findings involving other zinc-finger genes in mental retardation [11-16].



In patient I deleted region not concomitant with patient II, 8 other genes are described in OMIM Morbid Map, being the most relevant probably *FRZB* (frizzled-related protein - OMIM 605083) and *CERKL* (ceramide kinase-like - OMIM 608381) (Figure 3). *FRZB* gene codes for a protein that might play a role in skeletal morphogenesis [17] and thus can be a candidate gene for the craniofacial and hand/foot abnormalities described in patients with this deletion, since they commonly present tapering fingers at the hands and sandal gap at the feet [3-5] as in reported patient I. Haploinsufficiency of *CERKL* in patient I might justify her cognitive impairment when compared to patient II, since it codes for ceramide kinases that convert ceramide into ceramide-1-phosphate, both key mediators of cellular apoptosis and survival [18]. One gene also deleted only in patient I, *ITGA4* (integrin alpha-4 - OMIM 192975), has been reported to be associated with autism in two different studies [19,20]. Cocchella *et al.* [5] postulated it to be a candidate gene for the behavioral manifestations and for the speech disorders observed in patients with 2q31.2q32.3

deletion, and the patient reported by Manolakos *et al.* [21], whose deletion includes *ITGA4*, also presents a speech limited to simple vocalization with lack of meaning. However, although our reported patient I presents behavioral problems she has an active speech, so we consider that absence of speech should be excluded of the core phenotype of 2q31.2q32.3 deletion as proposed by Cocchella *et al.* [5].

Concerning patient II, the cryptic imbalance detected by oligoarray-CGH at 20p12 is compatible with her clinical manifestations. Of the 13 genes deleted, 3 are described in OMIM Morbid Map, *MKKS* (McKusick-Kaufman syndrome - OMIM 604896), *PLCB1* (phospholipase C, beta 1 - OMIM 607120) and *JAG1* genes. *MKKS* and *PLCB1* genes are associated with McKusick-Kaufman syndrome (OMIM 236700) and Early Infantile Epileptic Encephalopathy-12 (OMIM 613722), respectively, both autosomal recessive disorders.

As already mentioned, *JAG1* gene haploinsufficiency is responsible for Alagille syndrome, whose clinical manifestations are highly variable [6]. Of the five clinical criteria

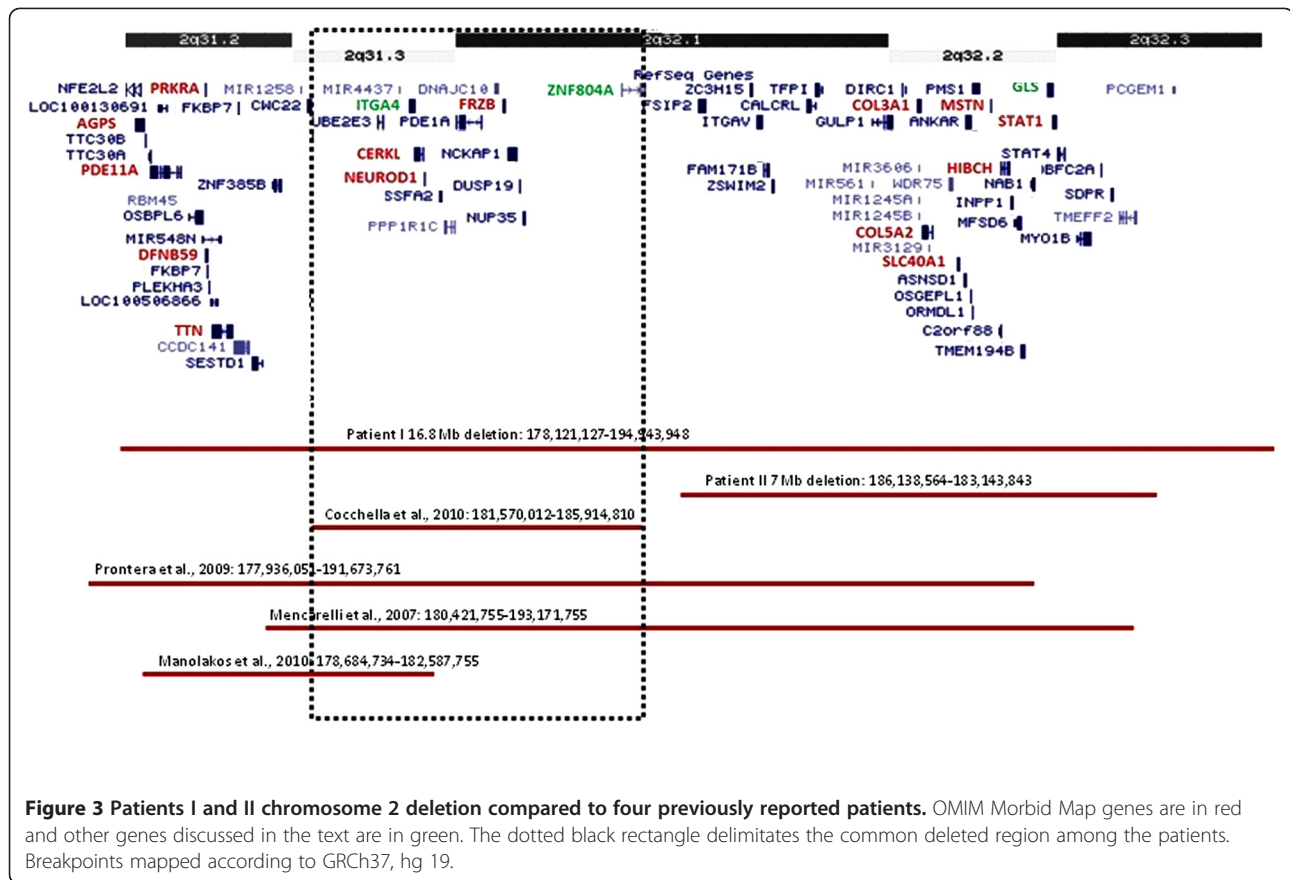


Figure 3 Patients I and II chromosome 2 deletion compared to four previously reported patients. OMIM Morbid Map genes are in red and other genes discussed in the text are in green. The dotted black rectangle delimitates the common deleted region among the patients. Breakpoints mapped according to GRCh37, hg 19.

for the diagnosis of AGS, patient II presents only manifestations at the cardiac level. This case might be one of those cases with low penetrance and expressivity [22] or the absence of additional clinical manifestations might be due to the reduced age of the proband. A challenge is put upon the clinical geneticist to do the follow-up of the child development, in order to establish a definitive phenotype and a correlation with the two reported chromosomal imbalances. The occurrence of both abnormalities would be expected to cause a more severe phenotype compared to the individual phenotype associated with each imbalance, which is not the case. We cannot rule incomplete penetrance of this imbalance. Taking into consideration that reported patient II does not present clinical features usually reported in 2q31.2q32.3 deletion syndrome, we can suggest that the critical region associated with the phenotype is outside patient II deleted region. As patient I manifests phenotypic features common to the other reported patients in the literature and their deletions overlap a common region, our results support Cocchella *et al.* [5] suggestion that the main phenotype is probably caused by the involvement of a small segment between 2q31.2q32.3. Furthermore we suggest that the critical region should involve bands 2q31.3q32.1 between 181 to 185 Mb, containing *CERKL*, *FRZB*, *ZNF804A* and *ITGA4* genes discussed

above (Figure 3). We did not consider the distal breakpoint of the patient reported by Manolakos *et al.* [21] since her phenotype is restricted to mental retardation and limited speech, probably related to the involvement of genes like *CERKL* and *ITGA4*. *FRZB* gene is normal in this patient, which is consistent with the absence of craniofacial and hand/foot abnormalities features that are common to patients with deletions involving this gene.

Establishing a syndrome with defined clinical characteristics is still difficult, due to the reported diversity of manifestations and phenotypes severity. Report of more cases fully characterized at a clinical and molecular level will be of major importance to definitely define the critical region of 2q31.2q32.3 deletion syndrome and to establish the core phenotype.

Patient II illustrates that multiple chromosome abnormalities in the same patient might be, to date, underestimated, because without oligoarray-CGH analysis and typical clinical manifestations of Alagille syndrome, the 20p12 deletion would not be identified and the proband's phenotype would only be attributed to the 2q32 deletion. Array-CGH is a valuable and cost effective tool to detect cryptic genomic imbalances, to further characterize cytogenetically detected alterations and to accurately estimate the frequency of patients with multiple chromosome imbalances.

Methods

Conventional cytogenetic analysis

Conventional GTG banding, done according to standard protocols, was performed on peripheral blood lymphocytes of both probands and their progenitors [23]. Karyotypes were established according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2009 [24].

Array-CGH

Precise determination of the breakpoints in the probands chromosomal imbalances was performed using Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180 K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), an oligonucleotide microarray containing approximately 180 000 60-mer probes with a 17 Kb average probe spacing. Genomic DNA of both patients was extracted from peripheral blood lymphocytes using Jetquick blood and cell culture DNA Midi Spin kit (Genomed, Löhne, Germany). Genomic DNA of a normal female control was obtained from Promega (Madison, WI, USA). Labeling was performed using Agilent Genomic DNA enzymatic labeling kit (Agilent) according to the manufacturers' instructions. After hybridization, the oligoarray-CGH slide was scanned on an Agilent scanner, processed with Feature Extraction software (v10.7) and results were analyzed using Agilent Genomic Workbench (v6.0) with the following settings: ADM2 as aberration algorithm, threshold of 6.0, moving average 2 Mb.

MLPA was used to confirm oligoarray-CGH result for chromosome 20 [25] in patient II with commercially available SALSA P297-B1 for Microdeletion syndromes (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) and was performed according to the manufacturers' instructions.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

SIF - carried out array-CGH and MLPA analysis and drafted the manuscript. EM - carried out cytogenetic analyses and provided valuable support for the manuscript drafting. MV - participated in the clinical evaluation and provided valuable support for the manuscript drafting. JS - participated in the clinical evaluation and provided valuable support for the manuscript drafting. JBM - participated in the design of the study, in array-CGH analysis and critically revised the manuscript. IMC - conceived the study, participated in its design and coordination and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Consent

Written informed consent was obtained from the patients progenitors. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Author details

¹Laboratório de Citogenética e Genómica - Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. ²Serviço de Genética Médica, Hospital Pediátrico Carmona da Mota, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra and Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. ³CIMAGO - Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal.

Received: 12 March 2012 Accepted: 17 April 2012
Published: 2 May 2012

References

1. Rifai L, Port-Lis M, Tabet AC, Bailleul-Forestier I, Benzacken B, Drunat S, Kuzbari S, Passemard S, Verloes A, Aboura A: **Ectodermal dysplasia-like syndrome with mental retardation due to contiguous gene deletion: further clinical and molecular delineation of del(2q32) syndrome.** *Am J Med Genet A* 2010, **152A**:111-117.
2. Van Buggenhout G, Van Ravenswaaij-Arts C, Maas NMC, Thoelen R, Vogels A, Smeets D, Salden I, Matthijs G, Fryns JP, Vermeesch JR: **The del(2)(q32.2q33) deletion syndrome defined by clinical and molecular characterization of four patients.** *Eur J Med Genet* 2005, **48**:276-289.
3. Mencarelli MA, Caselli R, Pescucci C, Hayek G, Zappella M, Renieri A, Mari F: **Clinical and molecular characterization of a patient with a 2q31.2-32.3 deletion identified by array-CGH.** *Am J Med Genet A* 2007, **143A**:858-865.
4. Prontera P, Bernardini L, Stangoni G, Capalbo A, Rogaia D, Ardisia C, Novelli A, Dallapiccola B, Donti E: **2q31.2q32.3 Deletion syndrome: report of an adult patient.** *Am J Med Genet A* 2009, **149A**:706-712.
5. Cocchella A, Malacarne M, Forzano F, Marciano C, Pierluigi M, Perroni L, Faravelli F, Di Maria F: **The Refinement of the Critical Region for the 2q31.2q32.3 Deletion Syndrome Indicates Candidate Genes for Mental Retardation and Speech Impairment.** *Am J Med Genet B* 2010, **153B**:1342-1346.
6. Spinner NB, Colliton RP, Crosnier C, Krantz ID, Hadchouel M, Meunier-Rotival M: **Jagged1 Mutations in Alagille Syndrome.** *Hum Mutat* 2001, **17**:18-33.
7. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ: **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.** *Nat* 1997, **387**:83-90.
8. Prusiner SB: **Disorders of glutamate metabolism and neurological dysfunction.** *Annu Rev Med* 1981, **32**:521-542.
9. Sahai S: **Glutaminase in human platelets.** *Clin Chim Acta* 1983, **127**:197-203.
10. Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME: **Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome.** *PLoS Genet* 2010, **6**:e1001154.
11. Lossi AM, Laugier-Anfossi F, Depetris D, Gecz J, Gedeon A, Kooy F, Schwartz C, Mattei MG, Croquette MF, Villard L: **Abnormal expression of the KLF8 (ZNF741) gene in a female patient with an X;autosome translocation t (X;21)(p11.2;q22.3) and non-syndromic mental retardation.** *J Med Genet* 2002, **39**:113-117.
12. Shoichet SA, Hoffmann K, Menzel C, Trautmann U, Moser B, Hoeltzenbein M, Echenne B, Partington M, van Bokhoven H, Moraine C, Fryns J, Chelly J, Rott H, Ropers H, Kalscheuer VM: **Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: Identification of a new candidate for X-linked mental retardation.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:1341-1354.
13. Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Banning MJG, Kalscheuer VM, Chelly J, Moraine C, Ropers H, Fryns J, Janssen IM, Sistermans EA, Nillesen WN, de Vries LBA, Hamel BCJ, van Bokhoven H: **Zinc finger 81 (ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation.** *J Med Genet* 2004, **41**:394-399.
14. Lugtenberg D, Yntema HG, Banning MJ, Oudakker AR, Firth HV, Willatt L, Raynaud M, Kleefstra T, Fryns J, Ropers H, Chelly J, Moraine C, Géczy J, van Rieuwijk J, Nabuurs TE, de Vries BBA, Hamel BCJ, de Brouwer APM, van Bokhoven H: **ZNF674: A new kruppel-associated box-containing zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation.** *Am J Hum Genet* 2006, **78**:265-278.
15. Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, et al: **A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation.** *Nat Genet* 2009, **41**:535-543.
16. Willemsen MH, Fernandez BA, Bacino CA, Gerkes E, de Brouwer APM, Pfundt R, Sikkema-Raddatz B, Scherer SW, Marshall CR, Potocki L, van Bokhoven H, Kleefstra Y: **Identification of ANKRD11 and ZNF778 as candidate genes for autism and variable cognitive impairment in the novel 16q24.3 microdeletion syndrome.** *Eur J Hum Genet* 2010, **18**:429-435.
17. Hoang B, Moos M Jr, Vukicevici S, Luyten FP: **Primary Structure and Tissue Distribution of FRZB, a Novel Protein Related to Drosophila Frizzled, Suggest a Role in Skeletal Morphogenesis.** *J Biol Chem* 1996, **271**:26131-26137.
18. Tuson M, Marfany G, González-Duarte R: **Mutation of CERKL, a Novel Human Ceramide Kinase Gene, Causes Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa (RP26).** *Am J Hum Genet* 2004, **74**:128-138.
19. Gallagher L, Becker K, Kearney G, Dunlop A, Stallings R, Green A, Fitzgerald M, Gill M: **Brief report: a case of autism associated with del(2)(q32.1q32.2) or (q32.2q32.3).** *J Autism Dev Disord* 2003, **33**:105-108.

20. Correia C, Coutinho AM, Almeida J, Lontro R, Lobo C, Miguel TS, Martins M, Gallagher L, Conroy J, Gill M, Oliveira G, Vicente AM: **Association of the alpha4 integrin subunit gene (ITGA4) with autism.** *Am J Med Genet B* 2009, **150B**:1147–1151.
21. Manolakos E, Vetro A, Kefalas K, Rapti S, Louizou E, Garas A, Kitsos G, Vasileiadis L, Tsoplou P, Eleftheriades M, Peitsidis P, Orru S, Liehr T, Petersen MB, Thomaidis L: **The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay.** *Mol Cytogenet* 2010, **3**:22.
22. Krantz ID, Rand EB, Genin A, Hunt P, Jones M, Louis AA, Graham JM Jr, Bhatt S, Piccoli DA, Spinner NB: **Deletions of 20p12 in Alagille Syndrome: Frequency and Molecular Characterization.** *Am J Med Genet* 1997, **70**:80–86.
23. Rooney DE, Czepulkowski BH: *Human Cytogenetics: A Practical Approach.* New York: Oxford University Press; 1992.
24. Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009 - Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature.* S. Karger AG; Basel, Switzerland 2009.
25. Hills A, Ahn JW, Donaghue C, Thomas H, Mann K, Ogilvie CM: **MLPA for confirmation of array CGH results and determination of inheritance.** *Mol Cytogenet* 2010, **3**:19.

doi:10.1186/1755-8166-5-25

Cite this article as: Ferreira *et al*: Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille syndrome region. *Molecular Cytogenetics* 2012 **5**:25.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Artigo 4

Molecular cytogenetic characterisation of a mosaic add(12)(p13.3) with an inv dup(3)(q26.31→qter) detected in an autistic boy

Carreira IM, Melo JB, Rodrigues C, Backx L, Vermeesch J, Weise A, Kosyakova N, Oliveira G, **Matoso E**

Molecular Cytogenetics (2009) [doi: 10.1186/1755-8166-2-16](https://doi.org/10.1186/1755-8166-2-16)

Research

Open Access

Molecular cytogenetic characterisation of a mosaic add(12)(p13.3) with an inv dup(3)(q26.31 → qter) detected in an autistic boy

Isabel M Carreira*¹, Joana B Melo¹, Carlos Rodrigues¹, Liesbeth Backx², Joris Vermeesch², Anja Weise³, Nadezda Kosyakova³, Guiomar Oliveira⁴ and Eunice Matoso¹

Address: ¹Laboratório de Citogenética, Instituto de Biologia Médica e Centro de Neurociências e Biologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal, ²Center for Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, University Hospital Leuven, Belgium, ³Jena University Hospital, Institute of Human Genetics and Anthropology, Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany and ⁴Unidade Neurodesenvolvimento e Autismo, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar de Coimbra, Portugal

Email: Isabel M Carreira* - i_marques@hotmail.com; Joana B Melo - jbmelo@cnc.cj.uc.pt; Carlos Rodrigues - rodriguescd@gmail.com; Liesbeth Backx - liesbeth.backx@med.kuleuven.be; Joris Vermeesch - joris.vermeesch@uz.kuleuven.ac.be; Anja Weise - aweise@mti.uni-jena.de; Nadezda Kosyakova - kosna@mti.uni-jena.de; Guiomar Oliveira - guiomar@chc.min-saude.pt; Eunice Matoso - eunicematoso@gmail.com

* Corresponding author

Published: 4 August 2009

Received: 18 May 2009

Molecular Cytogenetics 2009, 2:16 doi:10.1186/1755-8166-2-16

Accepted: 4 August 2009

This article is available from: <http://www.molecularcytogenetics.org/content/2/1/16>

© 2009 Carreira et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Inverted duplications (inv dup) of a terminal chromosome region are a particular subset of rearrangements that often results in partial tetrasomy or partial trisomy when accompanied by a deleted chromosome. Associated mosaicism could be the consequence of a post-zygotic event or could result from the correction of a trisomic conception. Tetrasomies of distal segments of the chromosome 3q are rare genetic events and their phenotypic manifestations are diverse. To our knowledge, there are only 12 cases reported with partial 3q tetrasomy. Generally, individuals with this genomic imbalance present mild to severe developmental delay, facial dysmorphisms and skin pigmentary disorders.

Results: We present the results of the molecular cytogenetic characterization of an unbalanced mosaic karyotype consisting of mos 46,XY,add(12)(p13.3) [56]/46,XY [44] in a previously described 11 years old autistic boy, re-evaluated at adult age. The employment of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and multicolor banding (MCB) techniques identified the extra material on 12p to be derived from chromosome 3, defining the additional material on 12p as an inv dup(3)(qter → q26.3::q26.3 → qter). Subsequently, array-based comparative genomic hybridization (aCGH) confirmed the breakpoint at 3q26.31, defining the extra material with a length of 24.92 Mb to be between 174.37 and 199.29 Mb.

Conclusion: This is the thirteenth reported case of inversion-duplication 3q, being the first one described as an inv dup translocated onto a non-homologous chromosome. The mosaic terminal inv dup(3q) observed could be the result of two proposed alternative mechanisms. The most striking feature of this case is the autistic behavior of the proband, a characteristic not shared by any other patient with tetrasomy for 3q26.31 → 3qter. The present work further illustrates the advantages of the use of an integrative cytogenetic strategy, composed both by conventional and molecular techniques, on providing powerful information for an accurate diagnosis. This report also highlights a chromosome region potentially involved in autistic disorders.

Background

According to the orientation of the duplicated segment, duplications may be classified either as tandem or inverted, being the last usually associated with deletion of the distal region of the duplicated chromosome [1]. The best studied cases of inverted duplications (inv dup) are the inv dup(8p) [2,3] and bisatellited inv dup(15) [4], which are usually non-mosaic. In contrast, mosaic inverted duplications are derived from different post-zygotic mechanisms for which various possible origins have been proposed [5-7]. There is also a particular subset of inv dup in which the duplication ends terminally on the chromosome and which are named terminal inv dup [8,9].

Tetrasomy of distal 3q segments is associated with adverse phenotypic manifestations, ranging from mild developmental delay to deep facial dysmorphisms, resembling patients with the dup(3q) and Brachmann-de Lange syndromes. Accordingly, some of the patients with 3q tetrasomy show hirsutism, synophrys, broad nasal root, anteverted nares, thin upper lip with downturned mouth corners, craniosynostosis, urinary tract anomalies, micrognathia, cleft palate and malformed ears, characteristics also seen in patients with the dup(3q) syndrome [10]. Brachmann-de Lange syndrome (BDLS) has overlapping features with dup(3q) syndrome, but with apparently normal chromosomes [11,12].

In this study we characterize by molecular cytogenetics a case of an autistic child previously reported by our group, with a mosaic partial tetrasomy of a distal chromosome 3q segment translocated to the short arm of the chromosome 12 [13]. To our knowledge, this is the first report of a mosaic terminal inv dup(3q) captured in an intact 12p subtelomere. Using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and array-based comparative genomic hybridization (aCGH) we have better characterized the extra material of chromosome 3 as qter → q26.31::q26.31 → qter. Furthermore, the mechanism of formation for this rearrangement is discussed.

Case presentation

The male child was the first born of non-consanguineous healthy parents and was delivered at term after an uneventful pregnancy. His birth weight was 2850 g (<5th centile) and there were no major neonatal problems, except for the club foot surgically corrected. However, a general developmental delay was noted soon after birth and fever convulsions were observed between the age of 9 and 24 months old.

As a consequence of suspicions of a pervasive developmental disorder of autistic type, at the age of 3, the proband was referred to a child psychiatrist, who directed

him to an autism unit. At 11 years old, his height was between the 25th and 50th centile, weight was on the 90th centile and head circumference was on the 50th centile. Some minor dysmorphic features were also observed, such as low set and slightly enlarged ears, high and arched palate and round face. No skin pigmentation disorders were observed. He was submitted to a multidisciplinary neurodevelopmental assessment and showed an adaptive behavior at the 30 month age level and a nonverbal IQ of 61, corresponding to a mild delay, a diagnosis of autism was based on Autism diagnostic interview-revised and the Statistical Mental Disorder IV edition criteria [13-15]. At adult age the proband maintain a clinic of autism and has an adaptative behaviour evaluated with Vineland Adaptive behaviour scales – survey form with a standard score of 30 for communication domain, 59 for daily living skills domain and 63 for socialization domain [16].

Results

Conventional cytogenetic analysis

The GTG banded chromosome analysis on peripheral blood lymphocytes of the proband showed a normal cell line 46,XY in 44% of the metaphases studied. In the other 56% of cells, an unbalanced karyotype with additional material on the terminal end of the short arm of chromosome 12 was identified as 46,XY,add(12)(p13.3) (Fig. 1). The banding pattern suggested that if any portion of chromo-

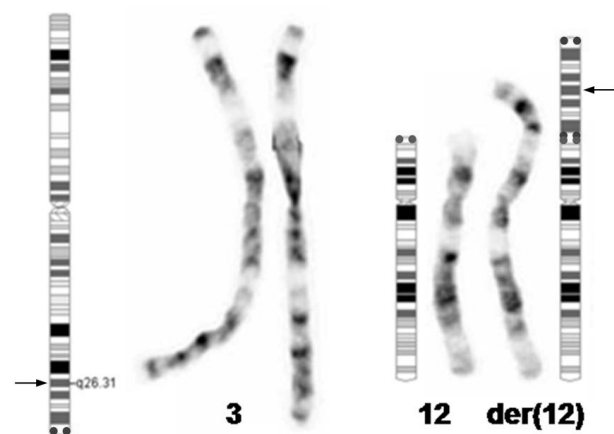


Figure 1

Partial GTG-banded karyogram and ideograms.

GTG-banded normal chromosome 3 homologous (left) and normal chromosome 12 plus the der(12) (right) are shown. Ideograms of the normal chromosome 3, 12 and of the der(12) with the inv dup(3)(q26.31qter) segment translocated on 12pter are represented. The localization of subtelomeric probes 3qter (red) and 12pter (green) are signed in the ideograms. The breakpoint of 3q26.31 is represented by an arrow (→).

mosome 12 could be lost, it would be a very small region of the tip of 12p. The additional material on chromosome 12 could not be easily matched to a specific region of either chromosome 12 or any other chromosome.

Skin fibroblast cultures of the proband confirmed the mosaic, with the abnormal cell line in only 14% of the 50 metaphases studied. As expected, the karyotypes of both parents were normal.

Molecular cytogenetic Studies

FISH and MCB analysis

In order to identify the extra material on the der(12), FISH was performed using the whole chromosome paint (wcp) M-multiprobe system (Cytocell), with specific libraries for all chromosomes. The wcp12 did not paint the entire 12p, showing that the extra material was not derived from chromosome 12 (data not shown). Also, the wcp12 did not paint any portion of any other chromosome ruling out a reciprocal translocation. When wcp3 was used, both chromosomes 3 were fully painted and an additional signal was present on one of the 12p-arms (data not shown). On the re-evaluation of the case partial chromosome paint (pcp) 3q was used showing that the additional material was derived from the long arm of chromosome 3 (Fig. 2A). The combined results of G-banding and FISH indicated that only the distal part of 3q could be involved in the rearrangement, suggesting a partial trisomy of 3q25? → qter.

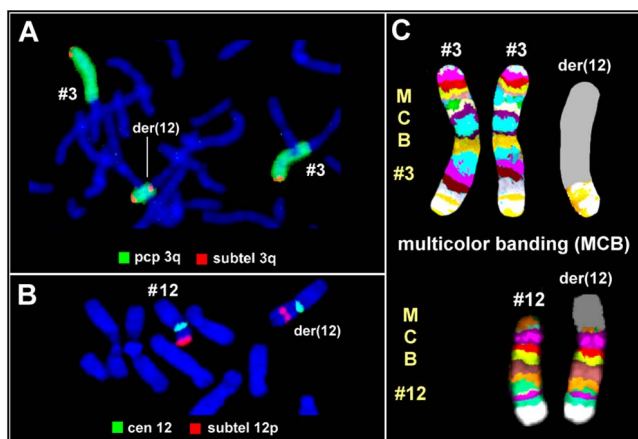


Figure 2
FISH analysis and multicolour banding pattern. A) Partial chromosome 3q paint (pcp 3q-green) of normal chromosomes 3 and of der(12), merged with 3q subtelomeric probe that hybridized at both ends of the additional segment (red). **B)** Hybridization of the subtelomeric probe 12p on the normal and the derivative chromosome 12. **C)** Multicolor banding analysis using specific probe sets for chromosomes 3 and 12. The resultant pattern proved that the additional material on der(12) resulted from an inverted duplication of the terminal portion of 3q.

Further FISH analysis was performed using specific probes for the subtelomeric regions of chromosome 3 (D3S4559, D3S4560; Vysis) which showed that the subtelomeric regions of both chromosomes 3 were intact, and that the 3q subtelomeric probe hybridised at both ends of the extra segment, suggesting an inverted duplication of the terminal 3q (Fig. 2A). To identify a possible loss or cryptic translocation of the 12p subtelomere, the subtelomeric probe for 12pter (GenBank U57865, Vysis) was used. It hybridized as expected in the normal chromosome 12 and an hybridization signal was also seen in the der(12), at the junction point of the additional material (Fig. 2B). The G-banding was revisited, taking into account the FISH findings (Fig. 1), and the additional material on 12p was interpreted as an inverted duplicated segment $inv\ dup(3)(qter \rightarrow q26.3::q26.3 \rightarrow qter)$ being the patient tetrasomic for the region $3q26.3 \rightarrow 3qter$.

To confirm this result described previously by us [13], multicolor banding (MCB) analysis was performed using a chromosome 3 specific probe set [17]. It was proved that the additional material on 12 resulted from an inverted duplication of the terminal portion of 3q ($qter \rightarrow q26.3::q26.3 \rightarrow qter$) (Fig. 2C). Altogether these results led to the final karyotype: $mos\ 46,XY,add12(p13.3).ish\ inv\ dup(3)(qter \rightarrow q26.3::q26.3 \rightarrow qter)(wcp3+,pcp3q+,D3S4560++)\ [56]/46,XY\ [44]$.

aCGH Analysis

The BAC-based aCGH performed in DNA extracted from peripheral blood of the proband revealed an amplification from 174.37 Mb (3q26.31) to 199.29 Mb (3qter), and absence of a deletion on chromosome 12 (Fig. 3). These observations were important to characterize the extension of the extra material derived from chromosome 3 and to exclude a possible deletion in 12pter.

Discussion

In this work we have characterized by molecular cytogenetics a tetrasomy of a 3qter fragment. The carrier presents minor facial dysmorphisms and general developmental delay associated with an autistic disorder. His karyotype was initially established from peripheral blood lymphocytes as $mos\ 46,XY,add(12)(p13.3)\ [56]/46,XY\ [44]\ [13]$. The use of MCB and aCGH techniques allowed the characterization of the extra material as being derived from chromosome 3, involving an $inv\ dup(3)(qter \rightarrow q26.3::q26.3 \rightarrow qter)$ and with a length of 24.92 Mb.

Inverted duplications are a kind of genetic lesions that can appear either as mosaic, or non-mosaic, depending on the time that they are formed [18]. There are different well established mechanisms proposed for the origin of terminal $inv\ dup$. The present case, however, does not adjust entirely with the usual mechanisms proposed for terminal

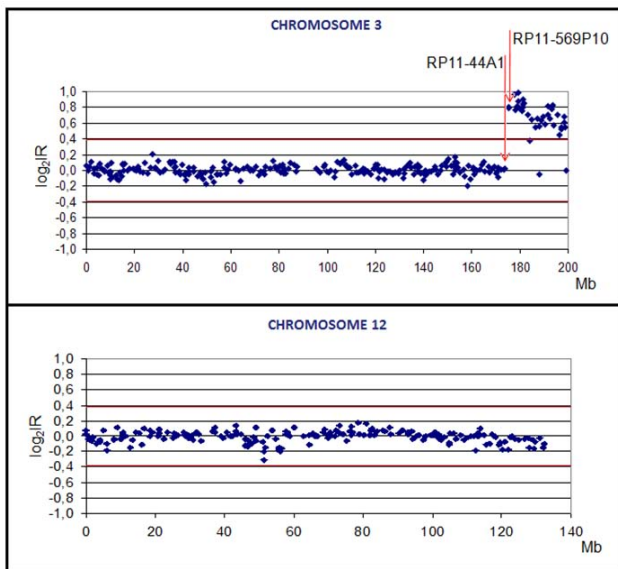


Figure 3
Result of the array CGH analysis for chromosomes 3 and 12. The Y-axis represents the \log_2 of the intensity ratios (\log_2IR) of the combined dye swap experiments of patient/control DNA. In the X-axis the distance of the BAC clones from the p telomeres is indicated (Mb). The red lines are the thresholds ($4 \times S.D.$) for clone deletion (-0.39) or clone amplification ($+0.39$). The first clone with amplification is RPI I-569P10 (starting at 174.37 Mb) and the flanking clone is RPI I-44A1 (ending at 173.86 Mb).

inv dup that would imply a concomitant deletion or a distal extra marker chromosome stabilized by neocentromerization. We propose three alternative mechanisms (Fig. 4A–C), two of them could have in common a first step in gametogenesis with a double-strand break event at 3q, repaired by fusion of the two sister chromatids (U-type exchange) and giving rise to an acentric inv dup (Fig. 4A–B). One possible mechanism for the subsequent step would be the healing by telomere capture from a non-homologous chromosome 12. A non-disjunction of the 12 homologous at meiosis I, led to the formation of a gamete that after fertilization originated a trisomic zygote, which included the der(12). In the first mitotic division, in an attempt of cell rescue, two cell lines would have been generated, by losing either the der(12) or the normal 12 chromosome. A consequence of the heterodisomy generated by the segregation error at meiosis I could be a chromosome 12 uniparental disomy [19]. The other alternative mechanism (Fig. 4C) would be the generation of a terminal acentric inv dup either as a result of a post-zygotic mitotic division, which would necessarily lead to mosaicism, or at meiosis. In this case, the post-zygotic stabilization delay of the acentric inv dup, associated with the telomere capture from a non-homologous chromosome 12, could explain the mosaicism [7,20,21].

Vanneste and colleagues have described that post-zygotic chromosome instability is highly frequent in cleavage-stage embryos, leading to segmental chromosomal imbalances and mosaicism, probably a common cause of constitutional chromosomal disorders. In this study, fifty-five percent of embryos carried terminal segmental imbalances, that were the result of DNA double-stranded breaks possibly followed by non-disjunction of the acentric fragment [22]. This study reinforces the theory that mosaic inv dup formation is a post-zygotic event.

There are only twelve reported cases in the literature of inv dup associated with tetrasomy for distal chromosome 3q [10,23-33]. Of all documented cases, our proband is the only one in which the tetrasomy is not an intrachromosomal triplication [32,33] or a supernumerary marker chromosome [10,23-31].

The chromosome region of the present rearrangement has been reported to be involved in both the BDLs (q26.3-q27) and the dup(3q) syndromes (with q26.3 being the critical region) [34-37]. Nonetheless, besides the mental retardation, the low set ears, the arched palate, our patient does not have any of the other 23 physical features compiled for those syndromes by Faas and colleagues [34].

Taking into account the twelve cases previously reported and the present one, it becomes evident that the phenotypes associated with tetrasomy of distal 3q segments are heterogeneous [10,23-33]. As a consequence, we failed to establish any genotype-phenotype correlation once neither the region involved nor the degree of the mosaicism could be correlated with a consistent pattern. Nevertheless, the presence of skin pigmentary disorders is a particular feature that connects the majority of the cases reported [23,25,27-32]. Indeed, hyperpigmentation is present in 8 of the reported patients, with a pattern concordant with lines of Blaschko in 5 patients. Correlating these cases, Gimelli and colleagues proposed the presence of a gene involved in skin pigmentation defects located at 3q27.1-qter region [30]. However, hypopigmentation and hyperpigmentation following the Blaschko's lines are relatively common in individuals with chromosomal mosaicism. In the present case, although involving the 3q27.1-qter region, there are no skin pigmentary alterations.

The autistic behavior observed in our patient, and not reported in any other case with distal 3q tetrasomy, is an interesting feature. According to the results of a genome-wide screen performed by Auranen and colleagues, there is evidence for a major susceptibility locus on chromosome 3q25-q27 for the autism-spectrum disorders [38]. Accordingly, a study of the same group revealed the existence of an allelic association on chromosome 3q25-q27 in families with autism spectrum disorders originating

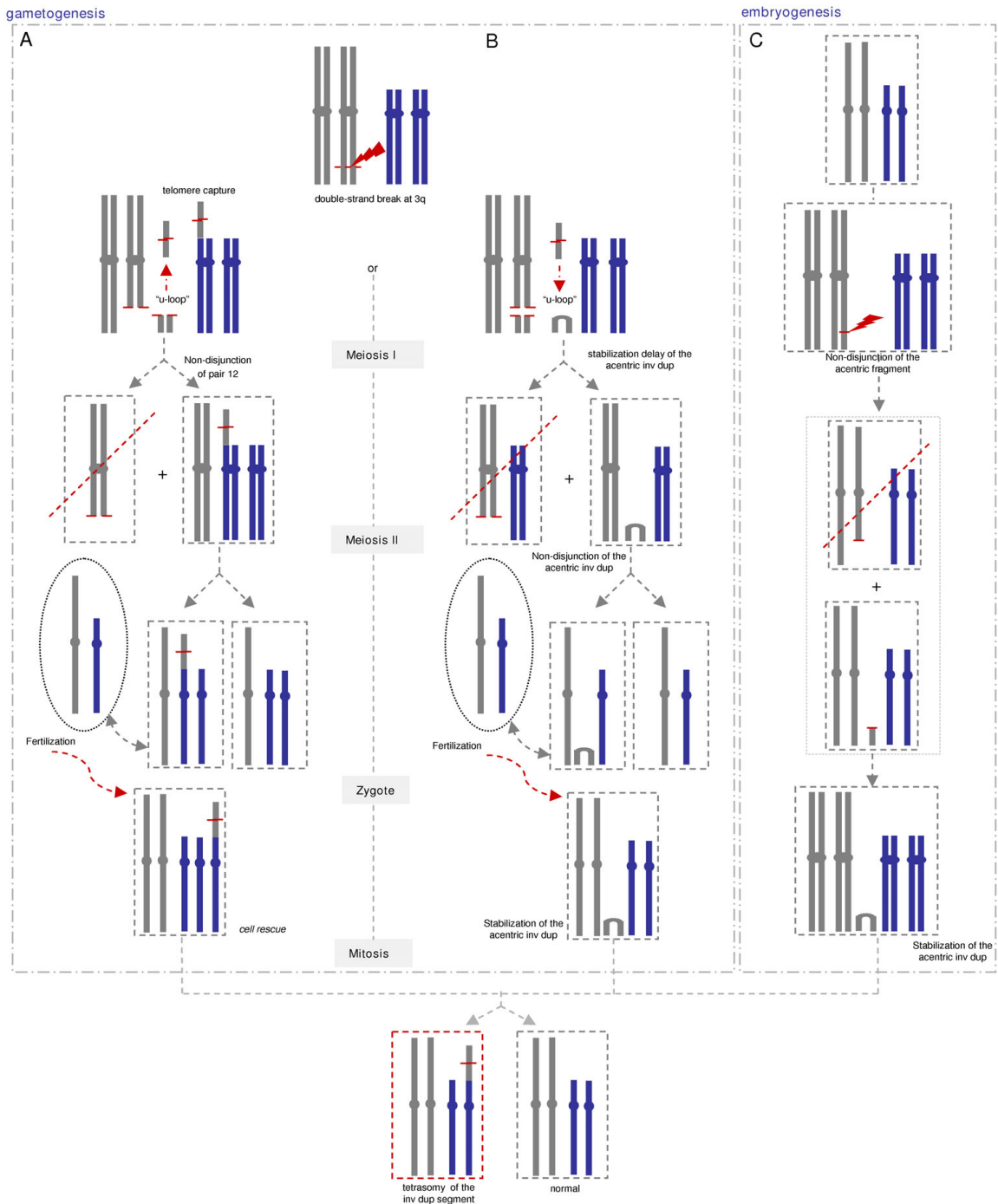


Figure 4
Schematic representation showing the three mechanisms proposed for the formation and stabilization of the terminal inv dup 3q. A-B) Two possible mechanisms having in common a first step in gametogenesis with a double-strand break event at 3q, repaired by fusion of the two sister chromatids (U-loop) and giving rise to an acentric inv dup; **A)** Subsequent step would be the telomere capture from chromosome 12, a non-disjunction of the 12 homologous at meiosis I, leading to a gamete that after fertilization originated a trisomic zygote, that by *cell rescue* generated two cell lines; **B)** Other alternative mechanism would be the post-zygotic stabilization delay of the acentric inv dup; **C)** The third possibility is the generation of a terminal acentric inv dup as a result of a post-zygotic event at embryogenesis, which would necessarily lead to mosaicism.

from a sub-isolate of Finland [38,39]. Since no other reported patient with 3qter tetrasomy demonstrated autistic behavior, we could be facing a random occurrence. However, it would be interesting to evaluate children with autistic behavior for micro-rearrangements in this region of chromosome 3.

To the best of our knowledge, this is the first study describing a mosaic interchromosomal inverted duplication of a 3qter segment captured in a non-homologous intact subtelomere (12pter). Also new is the fact that the proband presents an autistic behavior, not observed in any other patients with the same genomic imbalance. The concomitant employment of aCGH and multicolor FISH techniques contributed to the understanding of this unusual rearrangement.

Methods

Cytogenetic and FISH studies

Cytogenetic analysis was carried out on GTG-banded chromosomes (650 bands per haploid genome) prepared from peripheral blood lymphocytes and fibroblast cultures according to the standard protocols [40].

FISH studies were performed on metaphase spreads according to the standard procedures. M-multiprobe system (Cytocell Ltd, Adderbury, UK) was used to paint all chromosomes. For chromosome 3 individual wcp with a chromosome 3-specific library (Vysis Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) was used as well as specific subtelomeric probes for chromosomes 3 and 12 (Vysis). The derivative chromosome 12 was also studied by MCB applying the probe sets for chromosome 3 and 12, as described by Liehr and colleagues [17]. FISH results were analyzed using a Nikon Eclipse fluorescence microscope (Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp, The Netherlands) coupled with a Cytovision system (Applied Imaging International Ltd, Newcastle upon Tyne, UK). MCB was analysed using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope (Zeiss; Jena, Germany) with MetaSystems (Isis) software (Altlussheim, Germany).

BAC aCGH

BAC aCGH was performed for all genome screening using a 1 Mb clone set. Control and patients' DNA were labelled with Cy5 and Cy3 dCTP's (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey) using a random prime labelling system (Bioprime DNA Labelling System, Invitrogen, Carlsbad, CA) according to established protocols [41]. Scanning of the array was performed at 532 nm and 635 nm using a GenePix4000B scanner (Axon Instruments) and images were analyzed with the GenePix Pro 6.0 software. Correction of spot intensities for the local background followed previously described protocols [42].

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IMC, drafted the manuscript and coordinated the study.

JBM, performed the array-CGH analysis and has been involved in the drafting of the manuscript.

CR, provided valuable support.

AW and NK, carried out the application of multicolor banding.

LB and JRV, were involved in array-CGH analysis.

GO, provided the clinical data and biological samples.

EM, performed the cytogenetic studies as well as FISH experiments and has been involved in the drafting of the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We wish to thank the patient and his family for their participation. Supported in parts by the Erwin-Riesch Stiftung.

References

1. Van Dyke DL, Miller MJ, Weiss L: **The origin of inverted tandem duplications, and phenotypic effects of tandem duplication of the X chromosome long arm.** *Am J Med Genet* 1983, **15**:441-450.
2. Floridia G, Piantanida M, Minelli A, et al.: **The same molecular mechanism at the maternal meiosis I produces mono and dicentric 8p duplications.** *Am J Hum Genet* 1996, **58**:785-796.
3. Giglio S, Broman KW, Matsumoto N, et al.: **Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements.** *Am J Hum Genet* 2001, **68**:874-883.
4. Leana-Cox J, Jenkins L, Palmer CG, Plattner R, Sheppard L, Flejter WL, Zackowski J, Tsien F, Schwartz S: **Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes, using probes specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome region: clinical implications.** *Am J Hum Genet* 1994, **54**:748-756.
5. Kotzot D, Martinez MJ, Bagci G, Basaran S, Baumer A, Binkert F, Brecevic L, Castellani C, Chrzanosowska K, Dutly F, Gutkowska A, Karaüzüm SB, Krajewska-Walasek M, Luleci G, Miny P, Riegel M, Schuffenhauer S, Seidel H, Schinzel A: **Parental origin and mechanisms of formation of cytogenetically recognizable de novo direct and inverted duplications.** *J Med Genet* 2000, **37**:281-286.
6. Pramparo T, Giglio S, Gregato G, de Gregori M, Patricelli MG, Ciccone R, Scappaticci S, Mannino G, Lombardi C, Pirolo B, Giorda R, Rocchi M, Zuffardi O: **Inverted duplications: how many of them are mosaic?** *Eur J Hum Genet* 2004, **12**:713-717.
7. Chabchoub E, Rodriguez L, Galán E, Mansilla E, Martínez-Fernández ML, Martínez-Frías ML, Fryns JP, Vermeesch JR: **Molecular characterisation of a mosaicism with a complex chromosome rearrangement: evidence for coincident chromosome healing by telomere capture and neo-telomere formation.** *J Med Genet* 2007, **44**:250-256.
8. Hoo JJ, Chao M, Szego K, Rauer M, Echiverri SC, Harris C: **Four new cases of inverted terminal duplication: a modified hypothesis of mechanism of origin.** *Am J Med Genet* 1995, **58**:299-304.

9. Cotter PD, Kaffe S, Li L, Gershin IF, Hirschhorn K: **Loss of subtelomeric sequence associated with a terminal inversion duplication of the short arm of chromosome 4.** *Am J Med Genet* 2001, **102**:76-80 [<http://www3.interscience.wiley.com/journal/84504012/abstract>].
10. Izumi K, Yamashita Y, Aramaki M, Kosaki R, Hosokai N, Takahashi T, Kosaki K: **Neocentromere marker chromosome of distal 3q mimicking dup(3q) syndrome phenotype.** *Am J Med Genet* 2008, **146A**:1967-1971.
11. Opitz JM: **The Brachmann – de Lange Syndrome.** *Am J Med Genet* 1985, **22**:89-102.
12. Opitz JM: **The Brachmann – de Lange Syndrome, a continuing enigma.** *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994, **148**:1206-68.
13. Oliveira G, Matoso E, Vicente A, Ribeiro P, Marques C, Ataíde A, Miguel T, Saraiva J, Carreira I: **Partial tetrasomy of chromosome 3q and mosaicism in a child with autism.** *J Aut Dev Disord* 2003, **33**:177-185.
14. Lord C, Rutter M, LeCouteur A: **Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders.** *J Autism Dev Disord* 1994, **24**:659-685.
15. American Psychiatric Association: **Diagnostic and statistical manual of mental disorders.** Washington, D.C 4th edition. 1994.
16. Sparrow SS, Cicchetti DV: **Diagnostic uses of the Vineland Adaptive Behavior Scales.** *Journal of Pediatric Psychology* 1985, **10**:215-225.
17. Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U: **Microdissection based high resolution multicolour banding for all 24 chromosomes.** *Int J Mol Med* 2002, **9**:335-339.
18. Daniel A, St Heaps L, Sylvester D, Diaz S, Peters G: **Two mosaic terminal inverted duplications arising post-zygotically: Evidence for possible formation of neo-telomeres.** *Cell Chromosome* 2008, **7**:1.
19. Kotzot D: **Complex and segmental uniparental disomy updated.** *Journal of Medical Genetics* 2008, **45**:545-556.
20. Depinet TW, Zackowski JL, Earnshaw WC, Kaffe S, Sekhon GS, Stallard R, Sullivan BA, Vance GH, Van Dyke DL, Willard HF, Zinn AB, Schwartz S: **Characterization of neo-centromeres in marker chromosomes lacking detectable alpha-satellite DNA.** *Hum Mol Genet* 1997, **6**:1195-1204.
21. Voullaire L, Saffery R, Earle E, Irvine DV, Slater H, Dale S, du Sart D, Fleming T, Choo KH: **Mosaic inv dup(8p) marker chromosome with stable neocentromere suggests neocentromerization is a post-zygotic event.** *Am J Med Genet* 2001, **102**:86-94 [<http://www3.interscience.wiley.com/journal/84504001/abstract>].
22. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, Fryns JP, Verbeke G, D'Hooghe T, Moreau Y, Vermeesch JR: **Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos.** *Nat Med* 2009, **15**:77-83.
23. Portnoi MF, Boutchnei S, Bouscarat F, Morlier G, Nizard S, Dersarkissian H, Crickx B, Nouchy M, Taillemite JL, Belaich S: **Skin pigmentary anomalies and mosaicism for an acentric marker chromosome originating from 3q.** *J Med Genet* 1999, **36**:246-250.
24. Cockwell A, Gibbons B, Moore I, Crolla JA: **An anaphoid supernumerary marker chromosome derived from chromosome 3 ascertained in a fetus with multiple malformations.** *J Med Genet* 2000, **37**:807-809.
25. Teshima T, Bawle M, Weksberg R, Shuman C, Van Dyke DL, Schwartz S: **Anaphoid 3qter markers.** *Am J Med Genet* 2000, **94**:113-119 [<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/73001349/PDFSTART>].
26. Barbi G, Spaich C, Adolph S, Kehrler-Sawatzki H: **Anaphoid de novo marker chromosome inv dup(3)(q28qter) with neocentromere in a dysmorphic and developmentally retarded girl.** *J Med Genet* 2003, **40**:e27.
27. Yu J, Qi Z, Thompson K, Modaff P, Wells W, Meisner L, Pauli R: **Characterization of a rare neocentric marker chromosome using chromosome microdissection.** *54th annual meeting of the American Society of Human Genetics* 2004:192.
28. Sullivan CM, Mountford ST, Emmerson JM, Ellis RJ, Turbull C, Waters KS: **A mosaic karyotype with an additional inv dup(3)(qter-q26.2::q26.2-qter), containing a neocentromere, detected in a skin biopsy from a girl with skeletal abnormalities, abnormal skin pigmentation and developmental delay.** *J Med Genet* 2005, **42**(Suppl 1):S71.
29. Liehr T: **Small supernumerary marker chromosome (sSMC).** [<http://www.med.uni-jena.de/fish/sSMC/03.htm>].
30. Gimelli G, Giorda R, Beri S, Gimelli S, Zuffardi O: **A large anaphoid invdup(3)(q22.3qter) marker chromosome characterized by array-CGH in a child with malformations, mental retardation, ambiguous genitalia and Blaschko's lines.** *Eur J Med Genet* 2007, **50**:264-273.
31. Murthy SK, Malhotra AK, Jacob PS, Naveed S, Al-Rowaished EE, Mani S, Padariyakam S, Pramathan R, Nath R, Al-Ali MT, Al-Gazali L: **Anaphoid supernumerary marker chromosome characterized by aCGH and FISH as inv dup(3)(q25.33qter) de novo in a child with dysmorphic features and streaky pigmentation: case report.** *Mol Cytogenet* 2008, **1**:19.
32. Kroisel PM, Petek E, Wagner K: **Skin pigmentary anomalies in a mosaic form of partial tetrasomy 3q.** *J Med Genet* 2000, **37**:723-725.
33. Öunap K, Ilus T, Bartsch O: **A girl with inverted triplication of chromosome 3q25.3 → q29 and multiple congenital anomalies consistent with 3q duplication syndrome.** *Am J Med Genet* 2005, **134A**:434-438.
34. Faas BH, De Vries BB, Van Es-Van Gaal J, Merckx G, Draaisma JM, Smeets DF: **A new case of dup(3q) syndrome due to a pure duplication of 3qter.** *Clin Genet* 2002, **62**:315-320.
35. McKusick VA: **On line Mendelian inheritance in man (OMIM).** *The Johns Hopkins Univ Press* 1995.
36. Ireland M, English C, Cross I, Lindsay S, Strachan T: **Partial trisomy 3q and the mild Cornelia de Lange syndrome phenotype.** *J Med Genet* 1995, **32**:837-838.
37. Falek A, Schmidt R, Jervis G: **Familial de Lange Syndrome with chromosomal abnormalities.** *Pediatrics* 1996, **37**:92-101.
38. Auranen M, Vanhala R, Varilo T, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Sinsheimer JS, Peltonen L, Järvelä I: **A Genomewide Screen for Autism-Spectrum Disorders: Evidence for a Major Susceptibility Locus on Chromosome 3q25–27.** *Am J Hum Genet* 2002, **71**:777-790.
39. Auranen M, Varilo T, Alen R, Vanhala R, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Peltonen L, Järvelä I: **Evidence for allelic association on chromosome 3q25–27 in families with autism spectrum disorders originating from a subs isolate of Finland.** *Mol Psychiatry* 2003, **8**:879-884.
40. Rooney DE, Czepulkowski BH: **Human Cytogenetics: A Practical Approach.** New York: Oxford University Press; 1992.
41. Backx L, Ceulemans B, Vermeesch JR, Devriendt K, Esch HV: **Early myoclonic encephalopathy caused by a disruption of the neuroregulin-1 receptor ErbB4.** *Eur J Hum Genet* 2009, **17**:378-382.
42. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G, Van Vooren S, Dutta B, Maas N, Vermeulen S, Menten B, Speleman F, De Moor B, Van Hummelen P, MGRNen P, Fryns JP, Devriendt K: **Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis.** *J Histochem Cytochem* 2005, **53**:413-422.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Artigo 5

Inv21p12q22del21q22 and intellectual disability

Oliveira R, Dória S, Madureira C, Lima V, Almeida C, Pinho MJ, Ramalho C, **Matoso E**, Barros A, Carreira IM, Moura CP

Gene (2013) [doi: 10.1016/j.gene.2012.12.045](https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.045)



Short Communication

Inv21p12q22del21q22 and intellectual disability

Renata Oliveira ^{a,*}, Sofia Dória ^a, Carmen Madureira ^a, Vera Lima ^a, Carolina Almeida ^a, Maria J. Pinho ^a, Carla Ramalho ^b, Eunice Matoso ^{c,d}, Alberto Barros ^a, Isabel M. Carreira ^{c,d}, Carla P. Moura ^a

^a Dept. of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto/Hospital São João, Portugal

^b Dept. of Obstetrics/Gynecology, Hospital São João, Porto, Portugal

^c Laboratory of Cytogenetics and Genomics, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal

^d Laboratory of Cytogenetics, Pediatric Hospital Carmona da Mota, Coimbra, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 2 December 2012

Available online 20 December 2012

Keywords:

Chromosome 21

Pericentric inversion

Intellectual disability

ArrayCGH

ABSTRACT

Chromosomal rearrangements are common in humans. Pericentric inversions are among the most frequent aberrations (1–2%). Most inversions are balanced and do not cause problems in carriers unless one of the breakpoints disrupts important functional genes, has near submicroscopic copy number variants or hosts “cryptic” complex chromosomal rearrangements. Pericentric inversions can lead to imbalance in offspring. Less than 3% of Down syndrome patients have duplication as a result of parental pericentric inversion of chromosome 21. We report a family with an apparently balanced pericentric inversion of chromosome 21. The proband, a 23-year-old female was referred for prenatal diagnosis at 16 weeks gestation because of increased nuchal translucency. She has a familial history of Down’s syndrome and moderate intellectual disability, a personal history of four spontaneous abortions and learning difficulties. Peripheral blood and amniotic fluid samples were collected to perform proband’s and fetus’ cytogenetic analyses. Additionally, another six family members were evaluated and cytogenetic analysis was performed. Complementary FISH and MLPA studies were carried out. An apparent balanced chromosome 21 pericentric inversion was observed in four family members, two revealed a recombinant chromosome 21 with partial trisomy, and one a full trisomy 21 with an inverted chromosome 21. Array CGH analysis was performed in the mother and the brother’s proband. MLPA and aCGH studies identified a deletion of about 1.7 Mb on the long arm of inverted chromosome 21q22.11. We believe the cause of the intellectual disability/learning difficulties observed in the members with the inversion is related to this deletion. The recombinant chromosome 21 has a partial trisomy including the DSCR with no deletion. The risk for carriers of having a child with multiple malformations/intellectual disability is about 30% depending on whether and how this rearrangement interferes with meiosis.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chromosomal rearrangements are common in humans and pericentric inversions (PI) are among the most frequent aberrations (frequency of about 1–2%; Kaiser, 1984). The relation between intellectual disability (ID) and apparently balanced chromosomal rearrangements has been postulated for more than forty years (Funderburk et al., 1977). Most inversions are balanced and do not cause phenotype in carriers unless: one or both of the breakpoints disrupts an important functional gene; one breakpoint includes or is near submicroscopic copy number variants (CNVs); it hosts

“cryptic” complex chromosomal rearrangements; or there is an unidentified genetic or environmental factor (Gijsbers et al., 2010). It has been demonstrated that subtle chromosomal abnormalities are common in individuals with ID. Also, unbalanced derivatives segregate with cognitive impairment and, if there is more than one affected offspring with concordant phenotypes, it probably indicates the same unbalanced rearrangement (Knight et al., 1999).

Like other chromosomal rearrangements, PI can lead to imbalance in offspring. During meiosis of a pericentric inverted chromosome there is a risk for recombinants with partial duplication accompanied by partial deletion—a duplication of the region outside the inverted segment of one arm with a deletion of the terminal segment on the other arm. Therefore in a zygote with a partial trisomy or monosomy recombinant chromosomes, distal to the breakpoints, can occur. Down syndrome (DS) patients with a trisomy of the distal segment of chromosome 21 as a result of a parental PI of chromosome 21 are rare (Ruhi et al., 2001). As far as we know, only 14 cases of DS with recombinant chromosome 21 from parental pericentric inversion (mostly maternal) were reported so far (Fraisie et al., 1986; Gray et

Abbreviations: Array CGH, array comparative genomic hybridization; CNVs, copy number variants; DS, Down syndrome; FISH, fluorescence in situ hybridization; ID, intellectual disability; MLPA, multiplex-ligation probe amplification; OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man; PI, pericentric inversion.

* Corresponding author. Tel.: +351 239 480 638, fax: +351 239 717 216.

E-mail address: renata.ro@chc.min-saude.pt (R. Oliveira).

¹ The author’s permanent address: Dept. of Medical Genetics, Pediatric Hospital Carmona da Mota. Postal address: Av. Afonso Romão, 3000-602 Coimbra, Portugal.

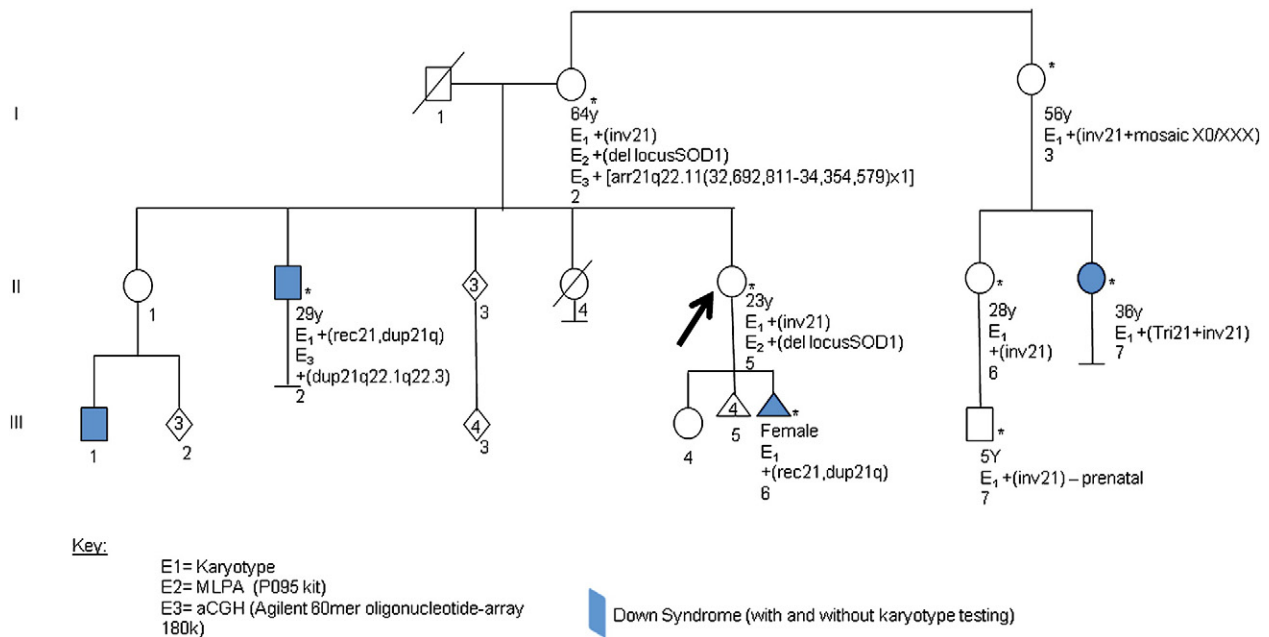


Fig. 1. Family pedigree—pedigree was drawn according to Bennett et al. (1995). In blue the members with clinical Down Syndrome with and without identified trisomy 21 (complete or partial); * members examined personally; E1—karyotype performed, both prenatal and peripheral blood; E2—MLPA studies, kit P095, done in the proband and proband's mother; E3—array Comparative Genomic Hybridization performed in patient I2 and II2.

- I2—46,XX,inv(21)(p12q22.1)
- I3—45,X,inv(21)(p12q22.1)[6]/47,XXX,inv(21)(p12q22.1)[1]/46,XX,inv(21)(p12q22.1)[51]
- II2—46,XY,rec(21)dup(21q)inv(21)(p12q22.1)mat
- II5 (proband)—46,XX,inv(21)(p12q22.1)mat
- II6—46,XX,inv(21)(p12q22.1)mat
- II7—47,XX,+21,inv(21)(p12q22.1)mat
- III6 (proband fetus)—46,XX,rec(21)dup(21q)inv(21)(p12q22.1)mat
- III7—46,XY,inv(21)(p12q22.1)mat.

al., 1962; Lazzaro et al., 2001; Leonard et al., 1986; Miyazaki et al., 1987; Ruhi et al., 2001; Tardy et al., 1997).

In this paper, a family with moderate to severe intellectual disability, with some presenting different chromosome imbalances is described. There are members with an apparent balanced pericentric inversion involving chromosome 21 with an extra submicroscopic interstitial deletion (1.7 Mb), one member with DS with a recombinant chromosome 21 (with distal duplication of 21q without the interstitial deletion) and another DS patient with full trisomy 21 of which one chromosome is the inverted one.

2. Clinical report

The proband, a 23-year-old Caucasian female, was referred for amniotic fluid sampling at 16 weeks gestation because of increased nuchal translucency (at 12 weeks). She has a personal history of learning difficulties and four spontaneous miscarriages and a familial history of DS and moderate ID.

Additionally to the proband and the fetus, six family members were studied (pedigree, Fig. 1): the mother, the brother (with clinical DS) and a maternal aunt with her two daughters (one of which was also with clinical DS)² and granddaughter.

The proband has been a healthy individual. She and her mother share very similar dysmorphic features (Fig. 2) like brachycephaly with normal head circumference (occipitofrontal circumference), low anterior hairline with widow's peak, flat face, slight bifrontal

narrowing, bilateral epicanthal fold, depressed nasal bridge with bulbous nose, apparent long ears with prominent superior crus of antihelix and large lobe, and short neck. The proband also presents thick and everted vermillion of the upper lip. Their hands are broad with apparent brachydactyly. They both have moderate intellectual disability³ but functional for daily life activities. A severe social problem is present and this family live from social support.

A karyotype of peripheral blood lymphocytes and from amniotic fluid cells was performed on GTL-banded preparations in all mentioned family members. FISH studies were carried out according to standard methods, using LSI and subtelomeric 21 probes (D21S259, D21S341, D21S342 and TelVysion 21q, Abbott®).

The cytogenetic analysis in the fetus' proband revealed the presence of a 46,XX,rec(21)dup(21q)inv(21)(p12q22.1) karyotype, and a proband 46,XX,inv(21)(p12q22.1) karyotype. Her mother's and brother's karyotypes are, respectively: 46,XX,inv(21)(p12q22.1) and 46,XY,rec(21)dup(21q)inv(21)(p12q22.1)mat.

Considering both, karyotype and FISH results, the proband has a maternal inherited apparently balanced PI of chromosome 21. Her fetus presents the derivative chromosome, an unbalanced recombinant chromosome 21, resulting in a partial trisomy 21. The karyotype with this recombinant chromosome is similar to the one present in her brother's karyotype. The proband decided to continue the pregnancy in question that terminated in fetal death at 20 weeks of gestation.

Furthermore, we have a familial apparently balanced PI, as we could relate this same inverted chromosome to and reach other family members previously studied in our department.

² The aunt and the cousins had been previously studied (four years before) and then connected to this family. One of the cousins was investigated, at the time with a pregnancy in course, after her sisters' karyotype has revealed a full trisomy 21 with PI in one chromosome 21.

³ There was not possible to perform a formal cognitive evaluation neither to the proband nor to her mother, because they abandon follow-up.



Fig. 2. The proband and her mother. Dysmorphic features: frontal hairline with widow's peak, flat face, slight bifrontal narrowing, depressed nasal bridge with bulbous nose, apparent long ears with prominent superior crus of antihelix and large lobe, and short neck. Their hands are broad with apparent brachydactyly. The proband also presents thick and everted vermillion of the upper lip.

In accordance to pedigree (Fig. 1), the karyotypes of the other family members found are shown:

- I3–45,X,inv(21)(p12q22.1)[6]/47,XXX,inv(21)(p12q22.1)[1]/46,XX,inv(21)(p12q22.1)[51]
- II6–46,XX,inv(21)(p12q22.1)mat
- II7–47,XX,+21,inv(21)(p12q22.1)mat
- III7–46,XY,inv(21)(p12q22.1)mat

Through conventional karyotype and FISH studies we were unable to define whether the inverted chromosome 21 was balanced or unbalanced. In order to detect possible cryptic imbalances in the breakpoints of this PI that could justify the ID observed in the proband and her mother (as well as in the cousin and aunt), a Multiplex-Ligation Probe Amplification (MLPA) study was performed in the proband, her mother and brother and an array-Comparative Genomic Hybridization (aCGH) analysis, using Agilent® 60mer oligonucleotide-array 180 k, was performed in the DNA of the proband's mother and brother.

Informed consent was obtained from the individuals involved.

3. Results

The MLPA analysis revealed a deletion between 21q11.2 and 21q22.3, concerning *SOD1* locus, in the proband and her mother (image not shown). The same deletion was not present in the brother with DS.

A deletion of about 1.7 Mb on the long arm of chromosome 21q22.11 was found on the arrayCGH [arr 21q22.11(23,692,811–34,454,579)×1] of the proband's mother (Fig. 3). It includes 19 genes, two of which were reported in the OMIM Genetic Morbid Map (OMIM ID: *SOD1*, 147450; *MRAP*, 609196).

The proband's brother, which was shown to have a recombinant chromosome 21, is a carrier of a partial trisomy of chromosome 21q22.1q22.3, involving the Down Syndrome Critical Region (DSCR), without the deletion observed in the mother [arr 21q22.1q22.3(34,466,182–48,090,317)×3] (Fig. 4).

From the family history we can assume that the inverted chromosome 21 co-segregates with the deletion, so it is in the same derivative.

4. Discussion and conclusion

High-resolution array platforms allow for detection of CNVs in carriers of apparently balanced chromosome abnormalities. The apparently balanced PI of chromosome 21 present in this family was found to have a submicroscopic rearrangement [1.7 Mb deletion] near one of the breakpoints of the inversion. This deletion might contribute to the moderate ID observed in the proband, her mother and

in the other carrier family members, as well as for the phenotypic facial characteristics they share. A formal cognitive assessment could have been of great interest to better characterize the mental impairment observed in these patients. Unfortunately, it was not possible as the proband and her mother abandoned follow-up. Given their consistent refusal plus the social situation and limited ability to comprehend the implication of these results, it has been difficult to reestablish contact.

The presence of mental illness has long been related with some chromosome 21 abnormalities, and history of psychiatric disorders like bipolar disorder, with learning disability were associated to deletions of the short arm of chromosome 21 (El-Badramany et al., 1989).

The phenotypic and molecular analysis of patients with partial monosomy 21 has been reported before (Chettouh et al., 1995; Roberson et al., 2011; Valero et al., 1999), but none, as far as we know, were associated to a chromosome pericentric inversion. The majority of these partial monosomies is *de novo* and reported on cytogenetic level, and only a few are submicroscopic deletions.

Partial chromosome 21 monosomy is rare in human disease with variable clinical appearances due to different genomic content

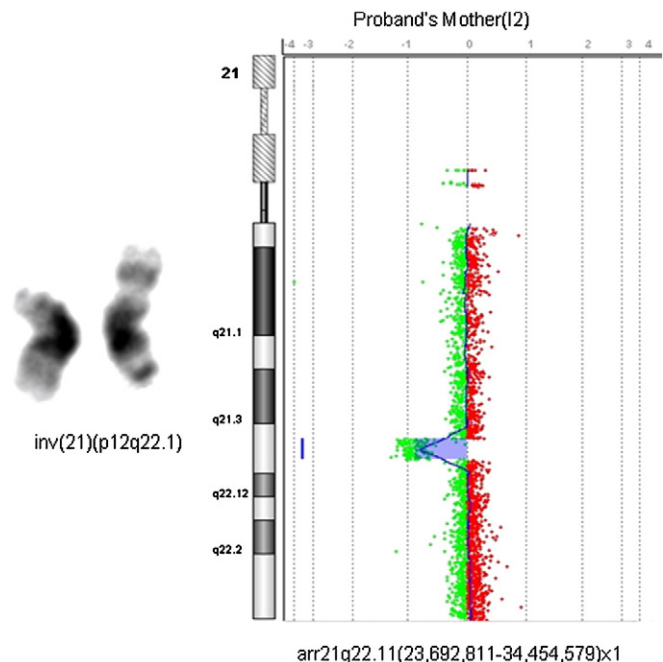


Fig. 3. Inverted chromosome 21 [inv(21)(p12q22.1) on the right, plus arrayCGH result of I2 (the mother) showing 1.7 Mb deletion [arr 21q22.11(23,692,811–34,454,579)×1].

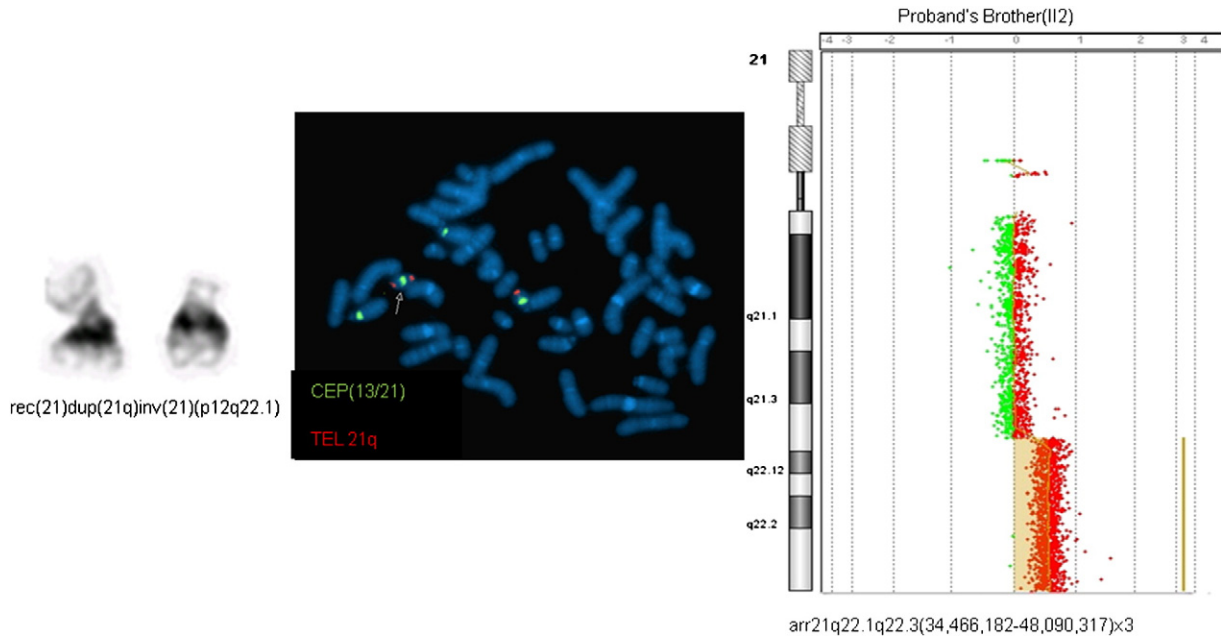


Fig. 4. Recombinant chromosome 21 [rec(21)dup(21q)inv(21)(p12q22.1) on the left, plus the image from FISH analysis confirming duplication of 21q (arrow), and arrayCGH result revealing duplication of II2 [arr 21q22.1q22.3(34,466,182–48,090,317)×3].

resulting in phenotypes including intellectual disability, brain dysgenesis, extensive dysmorphic features (microcephaly, short neck, epicanthic folds, flat nasal bridge, low set/malformed ears, highly arched palate, and transverse palmar crease), heart and/or renal defects (Migdalska et al., 2012; Roberson et al., 2011).

The deleted region of chromosome 21(q22.11) here reported, has been referred as mapping genetically between *APP-SOD1* genes, being a critical region responsible for most 21 monosomy associated traits (Valero et al., 1999). Also, other genes involved (*SYNJ1*, *OLIG 1/2*) code for glutamate receptors, interferes in synaptic transmission and in oligodendrocyte function, and together are responsible in the central nervous system for the formation and functioning of a large number of neuronal circuits. These might also contribute to the pathogenesis of intellectual disability when in haploinsufficiency (Chettouh et al., 1995). As in other similar abnormalities, differences in the genomic content of the deletion and the region spanning from *APP* to *SOD1*

would account for the phenotypic variability observed (Valero et al., 1999). The deleted region 21(q22.11) found in the family reported here includes two genes which are part of the OMIM Genetic Morbid Map (OMIM ID: *SOD1*, 147450; *MRAP*, 609196). In haploinsufficiency those genes probably are not responsible for the phenotype alone; instead it could be explained by the global interaction of other genes involved in neurotransmission, splicing and transcription of mRNA. To understand the genotype–phenotype correlation would be important to elucidate the consequence of this and other particular heterozygous deletions.

From the three family members with Down syndrome, two of them were studied: one has a regular pattern of trisomy 21 (including the inverted deleted chromosome) and the other (the proband's brother) has a recombinant chromosome 21 with a partial trisomy of DSCR without the interstitial deletion. The same recombinant form was found in the prenatal karyotype, whose gestation spontaneously terminated. Pairing in meiosis constitutes the main problem in

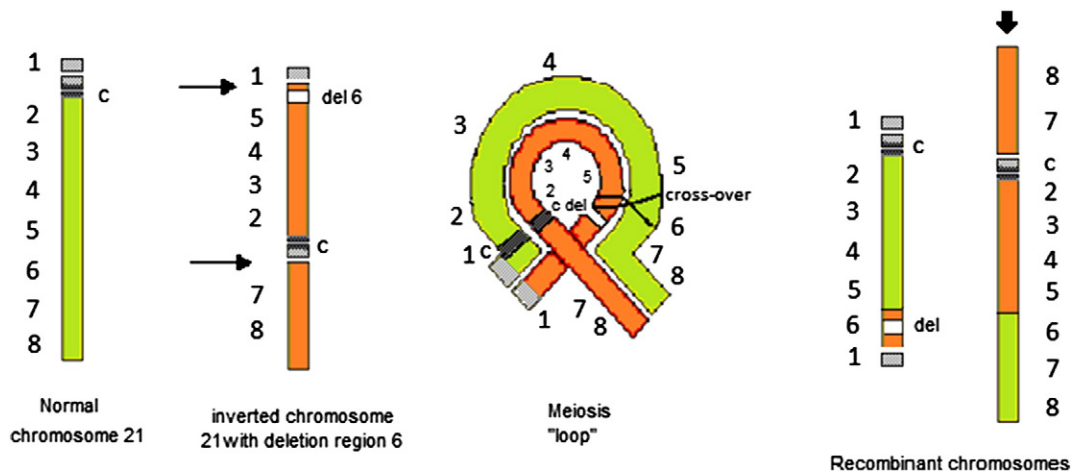


Fig. 5. Hypothetical meiosis result. The representation of the inversion 21p12q22.1 with breakpoints between 1–2 and 6–7 (arrows) with a deletion of region number 6; The meiotic loop has a crossing over representation between regions number 5 and 6; the full arrow (right end) points at the probable derivative occurring in patient II2, where region 6 is present, not including the deletion observed in the mother (identified by MLPA and, more precisely defined by aCGH studies).

inversion heterozygosis, because crossover events (during the pachytene stage of meiosis I) within the inversion segment can lead to two monocentric recombinants with reciprocal duplications/deficiencies in the gametes, ending up in a risk of inheriting such an imbalance when conception occurs. The recombinant possibilities from a crossing over within the loop during meiosis are shown in Fig. 5, where a likely condition occurring in our recombinant patient (the brother–II2) is pointed out, overcoming the deletion observed in his mother and sister (the proband), as identified by MLPA and more precisely, by aCGH studies. Thus, the deleted region in the mother (pedigree I2), represented in our meiosis scheme by number 6, is balanced in the brother (pedigree II2).

In conclusion, variability in biological mechanisms and phenotypes is a big challenge for genetic counseling and for laboratory pre-natal diagnosis as the risk for carriers of a pericentric inversion for miscarriages, infertility and/or chromosomally unbalanced offspring is high. As for the present familial pericentric inversion, the risk of having a child with multiple malformations/intellectual disability is about 30% (risk estimated via hc-forum.net, Human Genetic Forum®) depending on whether and how this rearrangement interferes with meiosis. To our knowledge, our family is the first reported to have a submicroscopic interstitial deletion of chromosome 21 associated to a pericentric inversion of it, with a probable causative phenotype of moderate intellectual disability and dysmorphic features.

Disclosure statement

None of the authors has any conflict of interest to disclose. There was no financial funding for this report.

References

- Kaiser, P., 1984. Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum. Genet.* 68 (1), 1–47.
- Funderburk, et al., 1977. Mental retardation associated with “balanced” chromosome rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.* 29, 136–141.
- Gijsbers, A.C.J., et al., 2010. Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. *Eur. J. Med. Genet.* 53, 227–233.
- Knight, S., et al., 1999. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* 354, 1676–1681.
- Ruhi, H., et al., 2001. A Down syndrome case with a karyotype of 46, XY, rec(21) dup(21q)inv(21)(p11q22) derived from paternal pericentric inversion of chromosome 21. *Clin. Genet.* 59, 368–370.
- Lazzaro, S.J., et al., 2001. Recombinant Down syndrome: a case report and literature review. *Clin. Genet.* 59, 128–130.
- Gray, J.E., et al., 1962. Pericentric inversion of chromosome 21. A possible further cytogenetic mechanism in mongolism. *Lancet* 1, 21–23.
- Fraisse, J., et al., 1986. Six cases of partial duplication-deficiency 21 syndrome: 21(dupq22-del23) due to maternal pericentric inversion: inv(21)(p12;q22). A family study. *Ann. Genet.* 29, 177–180.
- Leonard, C., et al., 1986. Two Down's syndrome patients with rec(21), dupq, inv(21)(p11;q2109) from a familial pericentric inversion. *Ann. Genet.* 29, 181–183.
- Miyazaki, K., et al., 1987. A boy with Down's syndrome having recombinant chromosome 21 but no SOD1 excess. *Clin. Genet.* 32, 383–387.
- Tardy, E.P., et al., 1997. Prenatal exclusion of segmental trisomy in familial chromosome 21 pericentric inversion by fluorescence in situ hybridization. *Prenat. Diagn.* 17, 871–873.
- Bennett, Robin L., et al., 1995. Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 745–752.
- El-Badramany, M.H., et al., 1989. Familial manic-depressive illness with deleted short arm of chromosome 21: coincidental or causal? *Br. J. Psychiatry* 155, 856–857.
- Chettouh, Z., et al., 1995. Molecular mapping of 21 features associated with partial monosomy 21: involvement of the APP-SOD1 region. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 62–71.
- Roberson, E., et al., 2011. Genomic analysis of partial 21q monosomies with variable phenotypes. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 235–238.
- Valero, R., et al., 1999. Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* 36, 694–699.
- Migdalska, A.M., et al., 2012. Modeling partial monosomy for human chromosome 21q11.2-q21.1 reveals haploinsufficient genes influencing behavior and fat deposition. *PLoS One* 7 (1), e29681.

3.2 CNVs patogénicas submicroscópicas

CNVs em regiões de síndromes estabelecidas na base de dados OMIM

Em 11 pacientes observaram-se CNVs que correspondem a síndromes já estabelecidas na base de dados OMIM (Tabela II). Em 10 destes pacientes as CNVs correspondem a síndromes de genes contíguos de microdeleção ou microduplicação. Apenas na síndrome de microdeleção 15q11.2 (MIM#615656) se verificou transmissão paterna (M959/10) ou materna (M35/11), em dois probandos (M989/10, M250/11) não foi possível estudar pelo menos um dos progenitores e em todos os outros as CNVs ocorreram *de novo*. Um dos pacientes (SM62/11) revelou uma CNV associada à síndrome de Greig (MIM#175700).

Síndrome de duplicação 1q21.1 (MIM#612475) (chr1: 145.0-146.4 Mb, NCBI36)

A síndrome de microduplicação 1q21.1 já descrita (Cap. 1, pag. 34), foi observada numa paciente (M802/11) com DI e perturbação do comportamento. Trata-se de uma duplicação *de novo* numa extensão mínima de 3.2 Mb, incluindo 25 genes descritos na base OMIM. A sua expressão fenotípica é sobreponível embora, como é característico desta síndrome, com expressão variável e penetrância incompleta, sendo que algumas características nomeadamente a macrocefalia, nem sempre estão presentes.

A região 1q21.1 é estruturalmente complexa e apresenta quatro pontos de quebra recorrentes possíveis (BP1, BP2, BP3, BP4) mediados por duplicações segmentais [Mefford *et al.*, 2008], sendo flanqueada por uma região proximal que inclui a região TAR (*Thrombocytopenia-Absent Radius*), associada à síndrome TAR (MIM#274000) de transmissão autossómica recessiva, e outra região mais distal (BP3, BP4) associada ao DI e microcefalia/macrocefalia, onde se localiza o gene *HYDIN2* proposto como candidato responsável pelo tamanho do crânio. As CNVs mais distais foram categorizadas em classe 1 e 2, sendo as maiores e que abrangem o BP4 denominadas de classe 2 [Rosenfeld *et al.*, 2012], onde se inclui a da paciente aqui descrita (BP2-BP4).

Síndrome de Wolf- Hirschhorn (MIM#194190)

A Síndrome de Wolf- Hirschhorn (WHS) está associada a deleções em hemizigotia na região cromossômica 4p16.3. É uma síndrome de genes contíguos cuja gravidade do quadro fenotípico, de malformações e DI, está muito associada à extensão da deleção que muitas vezes é visível ao nível citogenético. A sua região crítica engloba uma extensão de 200 Kb a uma distância de cerca de 1.9 MB do telómero e englobando duas regiões críticas (CR) propostas WHSCR1 e WHSCR2 [Wright *et al.*, 1997; Zollino *et al.*, 2003]. No probando (M256/11) a deleção envolve uma extensão de 1.6 Mb, com 21 genes descritos na OMIM, incluindo o *WHSC1* cuja haploinsuficiência é essencial para a sua patogénese assim como o *NELFA* (ou *WHSC2*) existindo no entanto outros genes associados que contribuem tanto para a gravidade como para algumas características mais típicas da síndrome [Zollino *et al.*, 2003]. No paciente descrito as características mais relevantes são a microcefalia de início pré-natal e o atraso global do desenvolvimento.

Síndrome de Greig (MIM# 175700)

A paciente SM62/11 apresentou uma deleção *de novo* numa extensão de 4.9 Mb na região 7(p12.3p14.1), com suspeita prévia pela citogenética convencional, dos 36 genes envolvidos e descritos na base OMIM o gene *GLI3* (#165240) é o mais relevante para o quadro fenotípico. A Síndrome de *Greig cephalopolysyndactyly* está associada a mutações em heterozigotia assim como deleções com expressão fenotípica grave. Nesta paciente o quadro é perfeitamente sobreponível com macrocefalia relativa, polidactilia nas mãos e sindactilia nos pés, dismorfismos e um quociente de desenvolvimento (QD) global moderado.

Síndrome de duplicação 7q11.23 (MIM#609757)

A microduplicação 7q11.23, observada em dois pacientes (SM668/10, M989/10), é uma CNV recorrente e sobreponível à região crítica da Síndrome de Williams-Beuren. Trata-se de uma síndrome que se caracteriza por distúrbios do desenvolvimento a diferentes níveis e com manifestações variáveis, englobando anomalias craniofaciais ligeiras e o atraso na linguagem comum a ambos os pacientes reportados. O DI e a PEA também podem estar presentes com graus de gravidade variáveis [Van der Aa *et al.*,

2009], em ambos os probandos está presente o DI mas um deles (M668/10) apresenta PHDA, enquanto o outro (M989/10) apresenta perturbações a nível neurológico com epilepsia e ataxia.

Síndrome de deleção 15q11.2 (MIM#615656)

A síndrome de microdeleção 15q11.2 caracteriza-se por envolver microdeleções numa região de 300 a 500 kb, entre os pontos de quebra BP1 e BP2 da região crítica das síndromes de Prader-Willi e Angelman [Burnside *et al.*, 2011], inclui quatro genes que não sofrem *imprinting* [*TUBGCP5*, *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1*], apresenta penetrância reduzida e expressão variável, podendo ser herdada de progenitores com um quadro ligeiro ou mesmo considerado “normal”. Esta CNV está muito associada a uma maior susceptibilidade a problemas do neurodesenvolvimento incluindo ADPM, atraso na linguagem, PEA, PHDA e mesmo epilepsia. Nos três pacientes reportados o ADPM é ligeiro ou mesmo *borderline*, com manifestações ao nível da linguagem e a PHDA, observam-se também dismorfismos ligeiros e variáveis. Em dois pacientes a microdeleção tem origem familiar (materna ou paterna), no outro paciente não foi possível estabelecer a sua origem porque não se obteve amostra de um dos progenitores.

Síndrome de deleção 17p13.1 (MIM#613776)

Esta síndrome engloba uma região crítica mínima de 180 Kb em 17p13.1 que inclui 18 genes. Entre as características fenotípicas mais consistentes destaca-se o DI severo a profundo, a linguagem pobre ou mesmo ausente e o atraso no crescimento mais acentuado ao nível do perímetro cefálico [Krepischi-Santos *et al.*, 2009]. Outras características mais variáveis poderão estar relacionadas com os diferentes genes envolvidos em cada deleção, uma vez que apresentam pontos de quebra muito variáveis que incluem segmentos de 287 kb a 4.4 Mb. No paciente descrito a deleção envolve um segmento de cerca de 309 Kb que inclui a região crítica, dos 24 genes descritos na OMIM, o *KCTD11*, o *DLG4*, o *GPS2* e o *GABARAP* estão envolvidos no neurodesenvolvimento podendo constituir importantes candidatos envolvidos no DI [Krepischi-Santos *et al.*, 2009]. Verificou-se também a hipotonia à semelhança de outros pacientes já reportados [Schwarzbraun *et al.*, 2009] mas apenas presente nos

primeiros meses de vida, o perímetro cefálico no percentil 25 inferior à estatura e peso no percentil 50, à semelhança do descrito noutros pacientes [Krepischi-Santos *et al.*, 2009].

Síndrome de Potocki-Lupski (MIM#610883)

A síndrome de Potocki-Lupski ou de duplicação 17p11.2 está associada à mesma região da síndrome de microdeleção Smith-Magenis evidenciando características fenotípicas sobreponíveis. Caracteriza-se por várias manifestações ao nível do neurodesenvolvimento, com hipotonia, atraso do crescimento, DI, PEA e MC [Shchelochkov *et al.*, 2010]. A maioria das duplicações abrangem 3.7 Mb, as CNVs dos dois pacientes reportados variam entre 3.4 Mb (M194/11) e 4.9 Mb (M97/11), embora ambos evidenciem ADPM, o probando da CNV mais extensa apresenta adicionalmente má progressão ponderal mas com macrocefalia relativa.

Tabela II – Pacientes com CNVs em regiões de síndromes estabelecidas - base de dados OMIM.

ID	Desequilíbrio	Cromossoma (região)	Início (bp)	Fim (bp)	Tamanho (bp)	Herança	Síndrome (S.)	Descrição Clínica [F] sexo feminino; [M] sexo masculino
CNVs patogênicas em regiões de microdeleção/microduplicação								
M802/11	duplicação	1q21.1q21.2	144,526,927	147,824,207	3,297,281	<i>de novo</i>	S. de duplicação 1q21.1 (MIM# <u>612475</u>)	[F] Défice intelectual (QI global 52), perturbação geral do comportamento, anorexia, dismorfismos faciais.
M256/11	deleção	4p16.3	737,721	2,416,211	1,678,491	<i>de novo</i>	S. Wolf- Hirschhorn (MIM# <u>194190</u>)	[M] ADPM, microcefalia pré-natal, baixa estatura e peso, dismorfismos ligeiros.
SM62/11	deleção ?(7)(p13)	7p12.3p14.1	41,487,720	46,443,484	4,955,765	<i>de novo</i>	S. de Greig <i>cephalopolysyndactyly</i> (MIM# <u>175700</u>)	[F] QD global (44) moderado, macrocefalia relativa, dismorfismos faciais; polidactilia pré axial das mãos, sindactilia nos pés (1º, 2º, 3º dedos); ventriculomegalia bilateral pré-natal.
M668/10	duplicação	7q11.23	72,726,578	74,139,390	1,412,813	<i>de novo</i>		[M] ADPM, QI global de 58, atraso grave na linguagem, dismorfismos ligeiros e inespecíficos, PHDA.
M989/10	duplicação	7q11.23	72,726,578	74,139,390	1,412,813	?	S. de duplicação 7q11.23 (MIM# <u>609757</u>)	[M] ADPM grave, linguagem incompreensível, alterações do comportamento, epilepsia frontal, motricidade fina alterada, ataxia da marcha.
M959/10	deleção	15q11.2	22,765,628	23,179,948	414,321	paterna	S. de deleção 15q11.2 (MIM# <u>615656</u>)	[F] ADPM ligeiro/ <i>borderline</i> (WISC III=73), mais relevante ao nível da linguagem, PHDA, dentinogênese imperfeita, implantação baixa do cabelo, lábio superior fino. Ambos os progenitores com DA.
M35/11	deleção	15q11.2	22,765,628	23,085,096	319,469	materna		[M] QI <i>borderline</i> , hiperactividade marcada, dificuldades na articulação das

Tabela II (continuação)

										S. de deleção 15q11.2 (MIM#615656)	palavras (presente na mãe), mas com boa compreensão, microcefalia pós-natal, plagiocefalia, <i>epicanthus</i> bilateral, fendas palpebrais estreitas; anomalias das mãos semelhantes à mãe, polegares curtos de implantação proximal, clinodactilia dos 5ºs dedos.
M250/11	deleção	15q11.2	22,765,628	23,179,948	414,321	?				S. de deleção 17p13.1 (MIM#613776)	[M] QD global de 81 (escala de <i>Griffiths</i>), audição/linguagem 70 e realização 93; baixa estatura; IGF1 (<i>insulin-like growth factor 1</i>) baixa; PHDA; face alongada, estreitamento biparietal, boca pequena.
M28/11	deleção	17p13.1	7,098,464	7,407,913	309,450	<i>de novo</i>				S. de deleção 17p13.1 (MIM#613776)	[M] Hipotonia apenas nos 1ºs meses de vida, cardiopatia, displasia congênita da anca; ADPM grave, plagiocefalia, peso e estatura no percentil 50, OFC no percentil 25.
M97/11	duplicação	17p11.2	16,170,236	21,070,382	4,900,147	<i>de novo</i>				S. de Potocki Lupski (MIM#610883)	[M] ADPM, má progressão ponderal, macrocefalia relativa.
M194/11	duplicação	17p11.2	16,782,546	20,219,464	3,436,919	<i>de novo</i>				S. de Potocki Lupski (MIM#610883)	[F] ADPM, ausência de linguagem.

DA dificuldades de aprendizagem; herança (?) desconhecida, sem estudo de pelo menos um dos progenitores; ID identificação do paciente

CNVs com conteúdo genómico de patogenicidade comprovada

Em 11 pacientes identificaram-se CNVs de conteúdo genómico com significado clínico comprovado (Tabela III), pelo que se descrevem os dados fundamentais da sua avaliação, comparando com outros casos já reportados. Em três destes pacientes observou-se uma segunda CNV mas de SCI. Para este grupo de pacientes apresenta-se o resultado do array pela nomenclatura internacional [ISCN, 2013].

Deleção 1p34.3 [arr 1p34.3(34,881,601-37,692,515)x1dn]

A paciente (M153/11) apresenta uma deleção no braço curto do cromossoma 1(p34.3) numa extensão de 2.8 Mb. Esta CNV envolve 35 genes RefSeq [UCSC Genome Browser on Human, Feb. 2009 (GRCh37/hg19)] com 26 descritos na base OMIM. Destes, quatro genes estão associados a patologia com mutações em heterozigotia: os genes *GJB4* e *GJB3* (ambos codificam para conexinas), o *COL8A2* (colagénio VIII) e o *CSF3R* (glicoproteína produzida pelos macrófagos). Avaliando a sua expressão e patologias associadas, apenas a haploinsuficiência do gene *GJB3* tem uma expressão inequívoca no fenótipo da paciente que apresenta surdez neurosensorial (MIM#612644). O gene *COL8A2* está associado a uma patologia da córnea (MIM#609140), mas a paciente apesar de ter manifestações ao nível oftalmológico não evidencia até à data sinais dessa patologia. Existem dois pacientes na base DECIPHER com CNVs sobreponíveis, incluídas nas posições nucleotídicas do probando, num deles (#256601) apenas está referido DI e no outro (#276509) DI e atraso na linguagem (também com hipotonia e outras manifestações craniofaciais). Recentemente, num caso publicado muito semelhante evidenciando ADPM grave com particular relevância ao nível da linguagem e motricidade fina, o autor propõe a haploinsuficiência do gene *GRIK3*, que codifica para um receptor do glutamato, como provável responsável pelos distúrbios do neurodesenvolvimento [Takenouchi *et al.*, 2014].

Deleção 4p16.3 [arr 4p16.3(927,780-1,214,915)x1pat]

Paciente descrito em artigo submetido para publicação [3.2.1].

Deleção 5q34 [arr 5q34(160,074,099-164,679,625)x1]

A paciente M317/11 é portadora de uma deleção no braço longo do cromossoma 5, numa extensão de 4.6 Mb, incluindo 13 genes RefSeq [UCSC Genome Browser on Human, Feb. 2009 (GRCh37/hg19)], dos quais 7 estão descritos na OMIM. Na DGV não estão reportadas CNVs sobreponíveis e frequentes. Quatro dos genes envolvidos codificam para sub-unidades dos receptores GABA, em que os genes *GABRA1* e *GABRG2* estão associados (mutações em heterozigotia) a epilepsia (MIM#615744,#611277), sendo este distúrbio neurológico evidente na paciente. Na sua história familiar destaca-se a co-sanguinidade dos progenitores ambos com DI, um irmão com um quadro clínico semelhante mas mais grave, mas uma irmã sem manifestações. No entanto, não foi possível estudar mais nenhum elemento da família. Na base DECIPHER está descrita uma paciente (#289761) com uma CNV menor mas sobreponível aos genes *GABRA6* e *GABRA1*, apresentando DI e convulsões. Na literatura não está reportado até à data outro caso semelhante, no entanto a extensão e conteúdo genómico associados ao quadro fenotípico, embora possam existir factores genéticos co-adjuvantes face à co-sanguinidade, são fortes indicadores da sua patogenicidade.

Deleção e duplicação 8p23.1

[arr 8p23.1(7,786,649-10,112,430)x1,8p23.1(10,249,016-11,906,266)x3]

A paciente SM826/10 apresenta duas CNVs diferentes na mesma região cromossómica, a deleção envolve 7 genes descritos na base OMIM e a duplicação 13 genes (Fig. 12). Nesta região estão descritas duas síndromes recíprocas de microdeleção e microduplicação 8p23.1 na base DECIPHER (Cr8:8,100,055-11,764,629). A síndrome de duplicação foi estabelecida posteriormente sendo uma identidade clínica distinta da deleção, com expressão variável [Barber *et al.*, 2008]. A duplicação poderá ser a CNV mais relevante no quadro fenotípico, embora de menor extensão, tem um conteúdo génico superior e engloba os genes *SOX7* e *GATA4*, estes genes codificam para factores de transcrição mais correlacionados com a patogenicidade desta região, embora no caso de uma duplicação não se consiga estabelecer uma causalidade directa com o fenótipo. No entanto, as duas CNVs abrangem cerca de 3.9 Mb incluindo toda a região definida para as síndromes, com

apenas um intervalo de cerca de 136 kb que inclui o gene *MSRA* (MIM#601250), tanto a deleção como a duplicação terão a sua influência no quadro fenotípico, embora seja difícil pela clínica estabelecer uma correlação clara. O quadro clínico da paciente com DI ligeiro e alguns dismorfismos, sem MC de maior relevo, leva-nos a estabelecer uma maior concordância com a duplicação, que apresenta uma expressão mais ligeira e variável [Barber *et al.*, 2008].

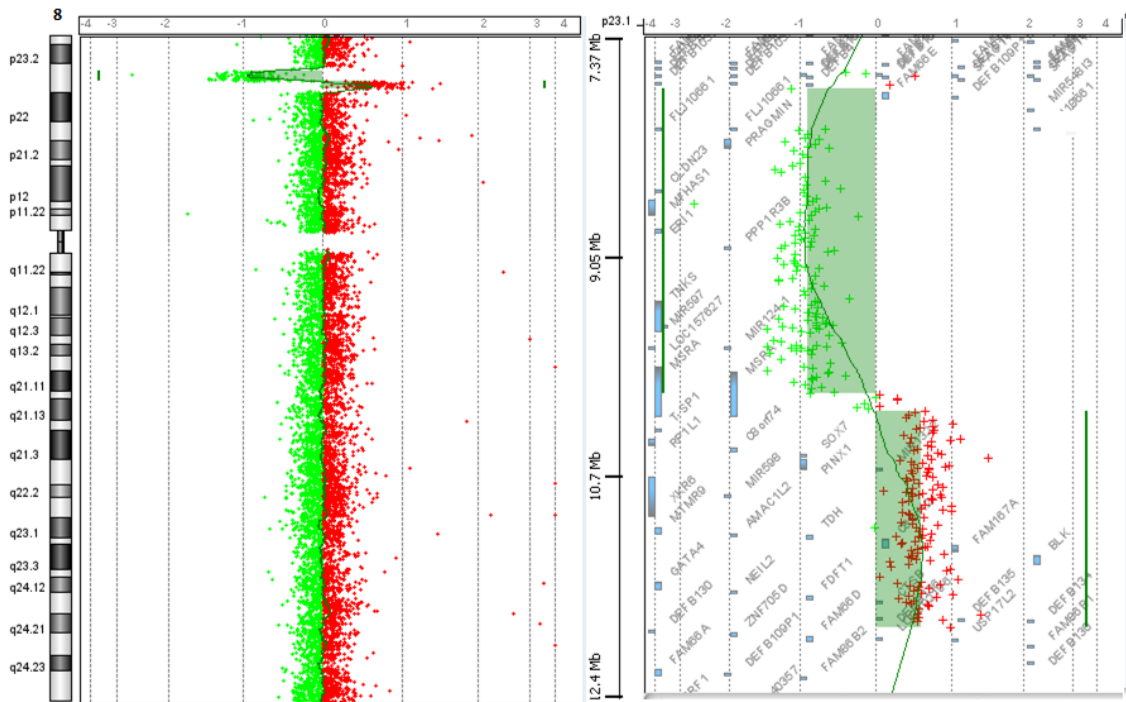


Figura 12 – Perfil do cromossoma 8 da análise por oligo array-CGH, do paciente SM826/10. À direita evidencia-se a região 8p23.1 que abrange as duas CNVs envolvidas, a verde estão representadas as sondas com valores de logaritmo compatível com deleção (-1) e a vermelho as sondas com valores de logaritmo compatível com duplicação (0,58).

Deleção 9p24.3p24.2 [arr 9p24.3p24.2(1243178-4595541)x1dn]

A CNV observada na paciente M269/11, envolve um segmento intersticial de 3.3 Mb no braço curto do cromossoma 9, com 11 genes RefSeq, 7 descritos na base OMIM. O gene *SMARC2* está reportado em associação à Síndrome de Nicolaides-Baraitser (MIM#601358) em casos isolados de mutações em heterozigotia, mas o fenótipo do probando não evidencia características sobreponíveis. O gene *VLDLR* está associado a DI (MIM#224050) mas devido a mutações em homozigotia. Esta CNV é sobreponível à síndrome de deleção 9p (MIM#15870), mas as deleções do braço curto do cromossoma 9 são muito variáveis na sua extensão e pontos de quebra. Existe um

grupo de deleções mais distais, que se estendem ao gene *DMTR1* (não incluído nesta CNV), associadas a um quadro de disgenesia gonadal [Calvari *et al.*, 2000; Ledig *et al.*, 2012], e um outro grupo de deleções que abrangem regiões mais proximais e que associam a região crítica a genes contidos em 9p22.3 [Swinkels *et al.*, 2008; Hauge *et al.*, 2008]. Contudo, tanto nos pacientes com as deleções mais distais como nos portadores de deleções mais proximais a CNV aqui descrita está muitas vezes incluída, apresentando características fenotípicas comuns como as dificuldades ao nível da linguagem, problemas do comportamento e DI moderado [Swinkels *et al.*, 2008].

Deleção 12q21.1q21.2

[arr Xq28(151,371,831-151,619,673)x2mat,12q21.1q21.2(74,906,055-77,770,027)x1]

A paciente M165/11 apresenta duas CNVs, uma classificada com SCI (descrita na Tabela III) e a outra patogénica. A deleção no braço longo do cromossoma 12, numa extensão de 2.8 Mb, envolve 14 genes descritos na OMIM, apenas o gene *BBS10* (#610148) está associado a uma patologia mas de transmissão autossómica recessiva. Recentemente foi reportada uma família (mãe e dois probandos) com uma deleção muito menor mas sobreponível que também inclui os genes *KCNC2* e *ATXN7L3*, com atraso do neurodesenvolvimento e ataxia cerebelar [Rajakulendran *et al.*, 2013]. Muito provavelmente esta CNV não só pelo sua extensão e conteúdo genómico como pelo fenótipo de DI sem dismorfismos, com as evidências da família reportada será causal. O contributo da outra CNV será de SCI.

Duplicação 15q13.3

[arr 2p12(75,640,544-78,943,678)x1,15q13.3(32,021,733-32,438,943)x3mat]

A paciente M1020/10 revelou duas CNVs com transmissão materna, uma deleção no cromossoma 2 de SCI e outra CNV em duplicação no cromossoma 15 classificada como patogénica. Esta duplicação envolve 417 kb, incluindo uma porção intragénica do *CHRNA7*, é sobreponível à S. de deleção 15q13.3 (MIM#612001), sendo atribuída a este gene a causalidade da síndrome e em particular da epilepsia, mas com penetrância incompleta. No caso das duplicações a patogenicidade reportada em pacientes é idêntica [Szafranski *et al.*, 2010], embora com uma penetrância ainda mais reduzida e existindo uma maior frequência desta CNV em portadores assintomáticos, como se verifica na DGV. No entanto, o ponto de quebra desta CNV é intragénico

podendo a sua expressão ser mais sobreponível aos casos de haploinsuficiência. Recentemente, foi reportado um grupo de 19 pacientes com deleções em heterozigotia confinadas ao gene *CHRNA7* e evidenciando o fenótipo característico da síndrome, a maioria herdadas de progenitores com fenótipo ligeiro ou ausente [Hoppman-Chaney *et al.*, 2013]. O paciente M1012/10 evidencia DI, PEA, PHDA e epilepsia. Os distúrbios do neurodesenvolvimento parecem estar muito relacionados com este gene, facto que é comprovado pelos vários casos já reportados.

Deleção 15q21.3q22.2 [arr 15q21.3q22.2(55,509,899-59,898,291)x1dn]

O paciente M904/10 revelou uma deleção de 4.3 Mb, incluindo 20 genes descritos na base OMIM. Dos genes associados a patologia, o *TCF12* (factor de transcrição envolvido na diferenciação neuronal) é responsável pela craniossinostose (CRS3 MIM#615314), em pacientes que também poderão evidenciar atraso do desenvolvimento e distúrbios do comportamento. Mutações em heterozigotia do gene *ADAM10* provocam uma patologia pigmentar (MIM#615537) com um padrão de transmissão autossómica dominante com elevada penetrância, o seu início pode estender-se entre a 1ª e a 2ª década de vida, até à data sem manifestações no probando. Existem poucos pacientes descritos com microdeleção nesta região, sendo o caso reportado mais semelhante o descrito por Le Tanno e colaboradores, em que é descrito défice intelectual com alterações craniofaciais resultantes da craniossinostose coronal, enquanto neste paciente é sagital [Le Tanno *et al.*, 2014].

Deleção 16p13.3

[arr 2q33.1(197,998,411-198,124,352)x1,16p13.3(6,628,137-6,735,665)x1mat]

O paciente M901/10 revelou uma CNV de SCI no cromossoma 2 e outra classificada como patogénica no braço curto do cromossoma 16. A deleção em 16p13.3 envolve uma porção intragénica do *RBFOX1* (exão 3), este gene codifica para um factor de *splicing* muito importante no neurodesenvolvimento e com uma forte associação a distúrbios do espectro do autismo, défice intelectual, epilepsia e outros distúrbios neuropsiquiátricos, mesmo no caso de mutações pontuais em regiões não codificantes, a sua expressão apresenta no entanto penetrância incompleta [Bill *et al.*, 2013]. O quadro clínico do paciente com encefalopatia epiléptica grave e sinais de

distúrbio na migração neuronal, está concordante com o reportado, assim como o facto da progenitora ser portadora sem revelar manifestações.

Duplicação 17p13.1 [arr 17p13.3(7,247,008-7,933,363)x3]

O paciente revelou uma duplicação de 686 kb no braço curto do cromossoma 17, que envolve 31 genes descritos na OMIM, sobrepõe-se à região mais proximal da S. de deleção 17p13.1 (MIM#613776), abrangendo ainda outros genes associados a patologia mas provavelmente sem relevância no caso de uma duplicação. As duplicações descritas nesta região apresentam pontos de quebra variáveis e não recíprocos à síndrome de deleção. Existem vários casos sobreponíveis (CNVs menores mas que incluem a maioria dos genes desta CNV) na DECIPHER (274634, 250301, 290411, 258312), todos com DI um deles com dedos em fuso, assim como na literatura existem casos com diferentes pontos quebra mas sobreponíveis [Belligni *et al.*, 2012; Coutton *et al.*, 2012; Kuroda *et al.*, 2014]. O paciente reportado por Belligni e colaboradores é o mais semelhante; este autor propõe os genes *EFNB3* (#602297), *FXR2* (#605339), *NLGN2* (#606479), envolvidos no neurodesenvolvimento, como possíveis candidatos envolvidos no DI [Belligni *et al.*, 2012]. Todos os pacientes apresentam DI, mas em dois deles é referida a obesidade [Belligni *et al.*, 2012; Kuroda *et al.*, 2014].

Triplicação 20p11.22p11.21 [arr 20p11.22p11.21(21,330,078-23,347,721)x4dn]

Paciente descrito em artigo submetido para publicação [3.2.1].

Tabela III – Pacientes com CNVs patogénicas que não correspondem a síndromes recorrentes já estabelecidas.

ID	Desequilíbrio	Cromossoma (região)	Início (bp)	Fim (bp)	Tamanho bp	Herança	Genes OMIM (Morbid Map)	Descrição clínica [F] sexo feminino; [M] sexo masculino
CNVs patogénicas - recentemente descritas e/ou incluindo genes associados a patologia concordante com o fenótipo								
M153/11	deleção	1p34.3	34,881,601	37,692,515	2,810,915	<i>de novo</i>	<i>GJB4</i> (#605425) <i>GJB3</i> (#603324) <i>COL8A2</i> (#120252) <i>CSF3R</i> (#138971) <i>GRIK3</i> (#138243)	[F] ADPM com défice da linguagem (início aos 6 anos), surdez neurosensorial, miopia e ambliopia.
M987/10	deleção	4p16.3	927,780	1,214,915	287,136	paterna	<i>DGKQ</i> (#601207), <i>SLC26A1</i> (# 610130) <i>IDUA</i> (# 252800) <i>FGFR1</i> (#605830) <i>RNF212</i> (#612041) <i>SPON2</i> (#605918) <i>CTBP1</i> (#602618)	[M] Défice cognitivo ligeiro, mais acentuado na linguagem expressiva; assimetria facial, retrognatia, filtro nasolabial curto, palato alto; disfunção temporomandibular, nariz proeminente e pavilhões auriculares grandes; válvula aorta bicúspide; estatura elevada. Pai com fenótipo mais ligeiro mas semelhante no <i>facies</i> , articulação da linguagem e altura, dificuldades de aprendizagem com história familiar.[Artigo 6]
M317/11	deleção	5q34	160,074,099	164,679,625	4,605,527	?	<i>GABRA1</i> (#137160) <i>GABRG2</i> (#137164) <i>HMMR</i> (#600936)	[F] Défice cognitivo grave, sem marcha e sem linguagem, epilepsia; um irmão ainda com fenótipo mais grave, irmã normal; pais primos em 1º grau, ambos com défice cognitivo.
SM826/10	deleção	8p23.1	7,786,649	10,112,430	2,325,782	<i>de novo</i>	Síndrome de deleção/duplicação 8p23.1 (DECIPHER)	[F] QD global de 69, hirsuta, pavilhões auriculares rodados posteriormente e grandes, sinofre, <i>telecanthus</i> , sulco nasolabial curto com filtro triangular, lábio superior fino, retrognatia; encurtamento dos 5ºs dedos das mãos; pés com halluces largos, sandalgap, clinodactilia dos 3º e 4º dedos; pectus excavatum ligeiro.
	duplicação		10,249,016	11,906,266	1,657,251		del [7] dup [13]	
M1269/11	deleção	9p24.3p24.2	1,243,178	4,595,541	3,352,364	<i>de novo</i>	<i>SMARCA2</i> (#600014) <i>VLDLR</i> (#192977) <i>KCNV2</i> (#607604) <i>GLIS3</i> (#610192) <i>SLC1A1</i> (#133550)	[F] Aos 7 anos a avaliação (WISC III) com resultados muito inferiores aos da faixa etária, dificuldades de linguagem desde os 3 anos, dificuldades de aprendizagem; PHDA; obesidade; pavilhões auriculares com sobre enrolamento das hélices, fendas palpebrais oblíquas para cima, irregularidades dentárias.

Tabela III (continuação)

M165/11	deleção	12q21.1q21.2	74,906,055	77,770,027	2,863,973	?	14	[M] ADPM moderado a grave, microcefalia, estatura e peso no percentil 50, sem distormorfismos. Sem história familiar relevante.
	duplicação	Xq28*	151,371,831	151,619,673	247,843	materna	<i>GABRA3</i> (#305660), <i>MIR105</i> (#300811, 300812)	
Cr. X: CNV embora sobreponível à S. de duplicação Xq28 (MIM#300815), é de tamanho muito inferior e não inclui os genes mais associados à sua patogenicidade. Esta CNV engloba o gene <i>GABRA3</i> e três microRNAs, face à herança materna e sendo o probando do sexo masculino é difícil concluir quanto à sua patogenicidade, classificando-se com SCI.								
M1012/10	duplicação	15q13.3	32,021,733	32,438,943	417,211	materna	<i>CHRNA7</i> (#118511) (exões 1-4)	[F] ADPM com défice cognitivo grave, primeiras palavras aos 6 anos; epilepsia, sem ataxia; alterações do comportamento, olhar vago, irritabilidade; incontinência do esfínter; PHDA, aos 9 anos cumpre parâmetros para o autismo, baixa estatura e obesidade.
	deleção	2p12 *	75,640,544	78,943,678	3,303,135	materna	<i>MRRPL19</i> (#611832); <i>GCFC2</i> (#189901); <i>LRRTM4</i> (#610870)	
Cr. 2: sem CNVs reportadas na DGV; esta deleção é sobreponível à S.de deleção 2p12-p11.2 (OMIM#613564), mas de tamanho muito inferior estando confinada a um região à qual não é atribuído grande significado clínico em hemizigotia [Barber <i>et al.</i>, 2005], um paciente reportado (#278782) na base DECIPHER com uma deleção intragénica do <i>LRRTM4</i> apresenta défice intelectual <i>borderline</i>, sendo a herança desconhecida. CNV de SCI.								
M904/10	deleção	15q21.3q22.2	55,509,899	59,898,291	4,388,393	de novo	<i>RAB27A</i> (#603868) <i>DYX1C1</i> (#608706) <i>TCF12</i> (#600480) <i>LIPC</i> (#151670) <i>ADAM10</i> (#602192) <i>MYO1E</i> (#601479)	[M] ADPM moderado, craniosinostose sagital; macrossómico, estatura e peso no percentil >95 e o perímetro cefálico no percentil 75.
	M901/10	deleção	16p13.3	6,628,137	6,735,665	107,529	materna	<i>RBFOX1</i> (#6051049)
deleção		2q33.1*	197,998,411	198,124,352	125,942	materna		
Cr. 2: CNV que apenas inclui um gene <i>ANKRD44</i> não descrito na OMIM, sem CNVs na DGV sobreponíveis, de SCI.								
M990/10	duplicação	17p13.1	7,247,008	7,933,363	686,356	?	<i>CHRNBI</i> (#100710) <i>MPDU1</i> (#604041) <i>TP53</i> (#191170) <i>WRAP53</i> (#612661) <i>GUCY2D</i> (#600179)	[M] ADPM moderado, obesidade do tronco, fendas palpebrais oblíquas para cima, dedos em fuso, mamilos invertidos, pele e fâneros secos.
	M895/10	triplicação	20p11.22p11.21	21,330,078	23,347,721	2,017,644	de novo	<i>PAX1</i> (#167411) <i>THBD</i> (#188040)

(*) CNV de SCI; Cr. Cromossoma; herança (?) desconhecida, sem estudo de pelo menos um dos progenitores; ID identificação do paciente.

3.2.1 Artigos em submissão

Artigo 6

Interstitial 287 kb deletion of 4p16.3 including *FGFR1* gene associated with an atypical phenotype

Matoso E, Ramos F, Ferrão J, Pires LM, Mascarenhas A, Melo JB, Carreira IM

European Journal of Human Genetics (submetido)

Interstitial 287 kb deletion of 4p16.3 including *FGFRL1* gene associated with an atypical phenotype

Eunice Matoso^{a,b,c}, Fabiana Ramos^b, José Ferrão^a, Luís M Pires^a, Alexandra Mascarenhas^a, Joana B Melo^{a,c}, Isabel M Carreira^{a,c*}

^a Laboratório de Citogenética e Genómica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

^b Medical Genetics Unit, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

^c CIMAGO – Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

* Corresponding author

Running title: Interstitial deletion of 4p16.3 including *FGFRL1*

Abstract

We report a male patient with developmental delay carrying an interstitial 4p16.3 deletion of 287 kb, disclosed by oligo array-CGH and inherited from his father with a similar but milder phenotype. This deletion is distal to the Wolf-Hirschhorn syndrome critical regions, but includes the *FGFRL1* gene proposed to be a plausible candidate for part of the craniofacial characteristics of Wolf-Hirschhorn syndrome patients. However the proband lack the typical facial appearance of the syndrome, but exhibits overgrowth, dysfunction of temporomandibular articulation and a bicuspid aortic valve. Given the pattern of expression of the *fibroblast growth factor receptor-like 1* and its involvement in bone and cartilage formation as well as in heart valve morphogenesis, we discuss the impact of its haploinsufficiency in the phenotype.

Keywords: 4p16.3 deletion; *FGFRL1* gene; developmental delay; bone and cartilage formation

Introduction

Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS; OMIM#194190) is a contiguous gene syndrome caused by deletion of the short arm of chromosome 4. There is a considerable variation in the phenotypic spectrum and a correlation between the size of the deletion and severity of the phenotype has been recognized.¹ Two Wolf-Hirschhorn critical regions, WHCR1 and WHCR2, have been identified within 4p16.3.^{2,3} Beyond this region, the loss of additional critical genes appears to be responsible for variable present features, the identification of patients with distal 4p deletions could help to identify for pathogenic genes that may be involved in components of the WHS phenotype.

Here we report a patient with a mild phenotype carrying an interstitial 287 kb deletion at 4p16.3, distal to the already described WHS critical regions, and encompassing *FGFRL1* gene proposed to be involved in the craniofacial characteristics. We discuss the involvement of this gene in the features displayed by the patient and compare with other patients reported with overlapping imbalances.

Materials and methods

Case report

The 11-years-old male proband is the first child of unrelated parents. He was born at 38 weeks of gestation after uneventful pregnancy. His weight was 3900 g (90th percentile), length of 51 cm (50th percentile), and occipitofrontal circumference (OFC) of 36 cm (75th percentile). Apgar scores were 9 and 10 at 1 and 5 minutes, respectively. He started to talk and walk independently at 2 years of age. It was noted to have difficulties in language skills, so he has been having language therapy since the age of 3. At 6 years he started to have pedo-psychiatric support. At the age of 11 years he was referred to genetics evaluation after diagnosis of bicuspid aortic valve in routine echocardiography. On physical examination, the patient showed overgrowth with a weight of 51,5 kg (95th percentile), height of 168 cm (>95th percentile), and OFC of 53,5 cm (50th-75th percentiles). Craniofacial findings included an asymmetric long face, with retrognathia, short philtrum (Fig. 1a), high palate with misaligned teeth,

dysfunction of temporomandibular articulation, long prominent nose and prominent ears (Fig. 1b). The hands have long fingers (Fig. 1c), the feet display bilateral sandal gap of the first toes with large halluces (Fig. 1d). Because of the developmental delay and overgrowth, homocysteine levels were investigated but showed a normal result. Electroencephalogram was normal, but MRI of the brain revealed a slight diminish of the frontal lobe mainly on the right side. Although in orthopedic examination he didn't reveal any remarkable alterations, he has a postural kyphosis with sloping shoulders (Fig. 1e) and asymmetric position of scapulas. He has a mild global cognitive impairment, but a more pronounced dysfunction in expressive language and articulation of speech. He is very similar to his father, although with a milder phenotype the father had strong learning difficulties at school, also with limitations in language articulation, he has a sister with remarkable delay and brothers and nephews with learning difficulties.

The proband has already normal investigation results of conventional cytogenetics analysis, fragile-X syndrome testing and subtelomeric screening.

Methods

High-resolution comparative genomic hybridization (array-CGH) analysis was performed using Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180 K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), an oligonucleotide microarray containing approximately 180,000 sixty-mer probes with a 17 kb average probe spacing, as described before.⁴ In order to confirm the array-CGH result, MLPA (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) using the set of probes P373, was performed according to the manufacturers' instructions. The study of the parents was done with the same MLPA probemix.

Results

The oligo array-CGH showed an interstitial deletion at 4p16.3 spanning about 287 kb of genomic DNA from position 927,780 bp (clone A_16_P16565674) to 1,214,915 bp (clone A_16_P00907084) flanked by probe A_16_P00906727 (920,051 bp) and probe A_18_P23419088 (1,228,462 bp) according to UCSC Genome Browser (hg19; GRChBuild 37.1, February 2009) (Fig. 2). The deleted segment contains 11 RefSeq

genes, 7 genes are described in the OMIM database: *DGKQ* (#601207) a diacylglycerol kinase, *SLC26A1* (# 610130) a sulfate anion transporter 1, *IDUA* (# 252800) a alpha-L-iduronidase (associated to a lysosomal storage disease by homozygous or compound heterozygous mutation), *FGFRL1* (#605830) the fibroblast growth factor receptor-like 1, *RNF212* (#612041) a ring finger protein that plays a role in meiotic recombination, *SPON2* (#605918) the spondin 2, *CTBP1* (#602618) the C-terminal-binding protein 1. MLPA confirmed the array result with two probes for genes *SPON2* and *FGFRL1*. Parental testing was performed with MLPA, showing the father to be carrier of the same imbalance.

Discussion

We report a patient with an interstitial deletion on 4p16.3, inherited from the father, this deletion is distal to the WHS critical regions. However this imbalance encompasses the *fibroblast growth factor receptor-like 1 (FGFRL1)* gene, proposed to be implicated as an important candidate contributing to the craniofacial phenotype,^{5,6} the patient described lack the typical facial features of the WHS, only exhibiting prominent nose and short *philtrum*. This gene has also been associated with intrauterine growth retardation and postnatal short stature in WHS patients,⁷ opposite to the findings in our patient that displays overgrowth since the neonatal period. Delayed in speech is a frequent problem in patients with 4p16.3 deletions⁸, even among patients with non overlapping imbalances, probably more than one gene contribute to this impairment, and in the proband and his father it is probably associated with the dysfunction of the temporomandibular articulation.

FGFRL1 gene inhibits cell proliferation, but promotes cell differentiation and induces cell adhesion (involved in cell-cell fusion), it is primarily expressed in cartilaginous tissues and in bone primordia (like the maxillae, the mandibles, the ribs and the nose), the muscles of the tongue and the diaphragm express *FGRFL1* at a relatively high level, but the heart, aorta, skeletal muscle, brain, lung, liver, kidney and gut it is expressed at a moderate level.⁹ Taking into account its function and pattern of expression, the haploinsufficiency of *FGFRL1* could be associated with the craniofacial phenotype of the patient including the dysfunction of temporomandibular articulation,

the overgrowth could be a consequence of the partial lack of the negative effect of *FGFRL1* in cell proliferation particularly in bone tissues.

In the research work of Catela *et al.*⁶, with an *Fgfr1* null mice (a novel animal model to dissect the aetiology of WHS), it is suggested a role for *Fgfr1* in valvulogenesis and ventricular septation. The presence of cardiac defects is observed in some patients with WHS⁷, but a patient described by Okamoto *et al.*¹⁰, with a small deletion encompassing *WHSC1* but not including the *FGFRL1*, didn't exhibit cardiac malformation. On the other hand in the report of South *et al.*¹¹, the echocardiogram of both patients didn't reveal any alteration although the deletions involved include *FGFRL1* gene. In the patient described the presence of a bicuspid aortic valve could be a coincidental finding or maybe suggests the contribution of *FGFRL1* in heart valvulogenesis.

In the work reported by Hammond *et al.*¹² a correlation between the genes involved in different deletions within 4p16.3 and the craniofacial phenotype is done. One of the patients was reported by Faravelli *et al.*¹³, mother of the propositus, she carries a terminal deletion distal to both critical regions of WHS, but including *FGFRL1*, her facial features included hypertelorism, high nasal bridge, down-slanting of palpebral fissures and large protruding eyes, but our patient with a smaller deletion also harbouring *FGFRL1* doesn't display neither of these characteristics. South *et al.*¹¹ described two patients with 4p terminal deletions distal to WHS critical regions but including *FGFRL1* and a portion of *LETM1* in one of them (Fig .2), they didn't exhibit the typical facial features of the syndrome, but have prominent forehead, mild telecanthus and normal philtral length, in both it was observed growth delay and mild developmental delay. On the other hand the patient reported by Engbers *et al.*⁵ with a 1.6 Mb deletion have typical facial signs of the WHS, this deletion includes *FGFRL1* but also other proximal genes that could be involved in the displayed phenotype (Fig. 2).

Our report supports the hypothesis that multiple genes are involved in the orchestration, not only of the facial phenotypic features but in the other malformations and cognitive skills observed in WHS patients in a contiguous manner. As it was confirmed in the study of Maas *et al.*⁷, of a cohort of patients with different size deletions and genotype-phenotype correlation, several clinical features of WHS have considerable variable expressivity or penetrance, so it is difficult to pinpoint the

genes involved in the more rare aspects of the WHS phenotype. The identification of distal 4p deletions covering about 0.4-0.5 Mb in individuals without a pathogenic phenotype suggests that monosomy of this region is likely benign.^{14,15} But deletions extending to the 1.4 Mb region appear to be pathogenic (Fig. 2), although with a mild phenotype^{7,11,13} and no typical facial appearance of WHS, deletions extending to 1.6 Mb can however display some overlapping features to the phenotype of WHS,⁵ suggesting the presence of other genes contributing to the displayed features.

The present report could help to unravel the phenotypic manifestations underlying the haploinsufficiency of the *FGFRL1* gene, particularly the involvement in the bone primordia formation and in valve morphogenesis, although we cannot discard the possible involvement of other neighboring genes in the phenotype. A better characterization of patients with atypical and smaller interstitial deletions could contribute to the knowledge of the biological function of neighboring genes out of the core critical regions of the WHS.

Acknowledgments

We would like to thank the family for their willing participation in this report.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Zollino M, Murdolo M, Marangi G *et al*: On the nosology and pathogenesis of Wolf-Hirschhorn syndrome: genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. *Am J Med Genet C Sem Med Genet* 2008; **148C**: 257–269.
- 2 Rauch A, Schellmoser S, Kraus C *et al*: First known microdeletion within the Wolf-Hirschhorn syndrome critical region refines genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 2001; **99**: 338–342.
- 3 Zollino M, Lecce R, Fischetto R *et al*: Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet* 2003; **72**: 590–597.
- 4 Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A *et al*: Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the EPHA5 gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet Part A* 2013; **161A**: 1923–1928.
- 5 Engbers H, van der Smagt JJ, van 't Slot R *et al*: Wolf-Hirschhorn syndrome facial dysmorphic features in a patient with a terminal 4p16.3 deletion telomeric to the WHSCR and WHSCR 2 regions. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 129–132.
- 6 Catela C, Bilbao-Cortes D, Slonimsky E *et al*: Multiple congenital malformations of Wolf-Hirschhorn syndrome are recapitulated in Fgfr1 null mice. *Dis Model Mech* 2009; **2**:283-294.
- 7 Maas NM, Van Buggenhout G, Hannes F *et al*: Genotype-phenotype correlation in 21 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome using high resolution array comparative genome hybridisation (CGH). *J Med Genet* 2008; **45**: 71–80.
- 8 Andersen EF, Carey JC, Earl DL *et al*: Deletions involving genes WHSC1 and LETM1 may be necessary, but are not sufficient to cause Wolf-Hirschhorn Syndrome. *Eur J Hum Genet* 2014; **22**: 464-470.
- 9 Trueb B, Taeschler S: Expression of FGFR1, a novel fibroblast growth factor receptor, during embryonic development. *Int J Mol Med* 2006; **17**:617-620.

10 Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S *et al*: 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A* 2013; **161A**: 1465-1469.

11 South ST, Bleyl SB, Carey JC: Two unique patients with novel microdeletions in 4p16.3 that exclude the WHS critical regions: Implications for critical region designation. *Am J Med Genet A* 2007; **143A**: 2137–2142.

12 Hammond P, Hannes F, Suttie M *et al*: Fine-grained facial phenotype-genotype analysis in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Eur J Hum Genet* 2012; **20**: 33-40.

13 Faravelli F, Murdolo M, Marangi G *et al*: Mother to son amplification of a small subtelomeric deletion: a new mechanism of familial recurrence in microdeletion syndromes. *Am J Med Genet A* 2007; **143A**: 1169–1173.

14 Van Buggenhout G, Melotte C, Dutta B *et al*: Mild Wolf–Hirschhorn syndrome: microarray CGH analysis of atypical 4p16.3 deletions enables refinement of the genotype–phenotype map. *J Med Genet* 2004; **41**: 691–698.

15 Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P *et al*: Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 2006; **43**: 478-489.

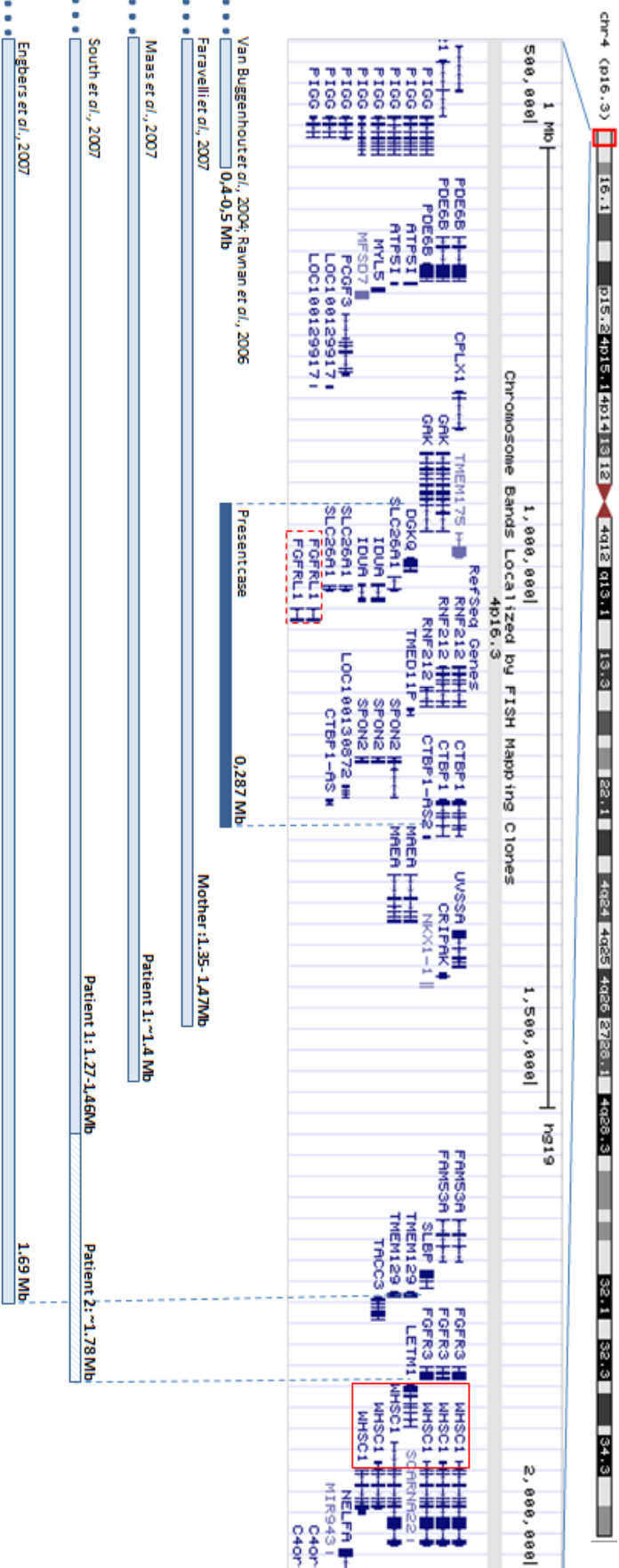
Titles and legends to figures

Figure 1 Phenotypic characteristics of the patient at 14 years of age. (a) Asymmetric long face, with retrognathia and short philtrum, (b) long and prominent nose, large or prominent ears, (c) hands with long fingers, (d) bilateral sandal gap of the first toes with large halluces, (e) postural kyphosis with sloping shoulders.



Interstitial deletion of 4p16.3 including *FGFR3*

Figure 2 Genomic region of 4p16.3 involved in the deletions of patients with distal imbalances to WHS critical regions (adapted from UCSC Genome Browser, GRCh37/hg19), displaying the RefSeq genes. A comparison of the extension of the deletions with previous reported patients is also shown.



Artigo 7

Interstitial triplication 20p11.22p11.21 in a girl with development delay and vertebral anomalies, an overlapping phenotype to the trisomy 20p syndrome

Matoso E, Ramos L, Ferreira SI, Vermeesch JR, Melo JB, Carreira IM

(em submissão)

Interstitial triplication 20p11.22p11.21 in a girl with development delay and vertebral anomalies, an overlapping phenotype to the trisomy 20p syndrome

Eunice Matoso^{a,b,c}, Lina Ramos^b, Susana I Ferreira^a, Joris R Vermeesch^d, Joana B Melo^{a,c,e}, Isabel M Carreira^{a,c,e*}

^aCytogenetics and Genomics Laboratory, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

^bMedical Genetics Unit, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

^cCIMAGO – Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

^dCenter for Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, University Hospital Leuven, Belgium

^eCNC - Centro de Neurociências e Biologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

* Corresponding author

Running title: triplication 20p11.22p11.21 in a girl with development delay and vertebral anomalies

Abstract

Background: Interstitial triplications leading to partial tetrasomies are rare chromosomal aberrations, the majority involve chromosome 15q11q13, but sporadic intrachromosomal triplications have also been described for other chromosomes and regions. For the short arm of chromosome 20, tetrasomy was only reported in two pre-natal cases and one post-natal involving the full arm.

Methods and results: Herein we report a patient with a *de novo* non-recurrent interstitial triplication of 20p11.2 detected using oligonucleotide array comparative genomic hybridization and confirmed by multiplex ligation-dependent probe amplification and further characterized with fluorescence *in situ* hybridization. SNP array was applied to conclude about the parental origin and probable mechanism of formation. The imbalance encompasses 19 RefSeq genes, two of which are, *PAX1* and *SSTR4*, whose deregulation may play a critical role in the development of the vertebral anomalies and the intellectual disability. The patient share consistent features with the phenotype of the trisomy 20p syndrome, including: psychomotor retardation and vertebral anomalies, but additionally exhibits microcephaly and severe language impairment.

Conclusion: Tetrasomy 20p11.2 due to an interstitial triplication have never been reported, the patient exhibits the main clinical features of the trisomy 20p syndrome but with more severe manifestations. This region could delineate a minimal critical region disclosing candidate genes, *PAX1* and *SSTR4*, responsible for the vertebral anomalies and the intellectual disability.

Key words: chromosome 20, triplication 20p11.2, *SSTR4* gene, *PAX1* gene

1. Introduction

Interstitial triplications leading to partial tetrasomies are rare chromosomal aberrations. The majority of interstitial triplications reported involve chromosome 15, showing a middle inverted repeat [Roberts *et al.*, 2002]. Sporadic intrachromosomal triplications have also been described for several chromosomes and regions: 2q11.2q21 [Wang *et al.*, 1999], 2q12.3q13 [Mercer *et al.*, 2009], 2q37 [Rauch *et al.*, 1996], 3q25.3q29 [Öunap *et al.*, 2005], 5p14p15.33 [Harrison *et al.*, 1998], 7p21.3p22 [Rivera *et al.*, 1998], 7q11.23 [Beunders *et al.*, 2010], 9p13p22 [Verheij *et al.*, 1999], 10q26qter [Devriendt *et al.*, 1999], 11q23.3q24.1 [Burnside *et al.*, 2009], 11q24.1 [Beneteau *et al.*, 2011], 12p11.22p12.3 [Eckel *et al.*, 2006], 13q21.1q21.33 [Lopéz-Expósito *et al.*, 2008], 13q22q33 [Reddy *et al.*, 2000], 16q12.1q12.2 [Berry *et al.*, 1990], 18q21.3 [Giorda *et al.*, 2011], 22q11 [Knijnenburg *et al.*, 2012], Xq13q22 [Matsuki *et al.*, 1998] and Xq [Ocak and Surucu, 2012].

Tetrasomy of the short arm of chromosome 20 was only reported in two pre-natal cases carrying an isochromosome 20p and associated with multiple congenital abnormalities [Wu *et al.*, 2003; Fryer *et al.*, 2005] and one post-natal patient with triplication of all 20p, due to inherited translocation and secondary nondisjunction, presenting moderate development delay [Marcus *et al.*, 1979]. In most triplications the resulting phenotype is consistent with the displayed in patients with duplication of the same segment, but more severe [Mercer *et al.*, 2009]. Trisomy involving 20p is not so rare, with at least 39 cases reported [review in Chaabouni *et al.*, 2007; Leclercq *et al.*, 2009; D'Angelo *et al.*, 2010]. A detailed molecular characterization is lacking in the majority of the reports, being difficult to ascertain an accurate correlation between the phenotype and the genomic imbalance.

Herein, we report the first patient with an interstitial triplication of 20p11.2, leading to a partial tetrasomy 20p, showing overlapping features to the already described trisomy 20p syndrome including: psychomotor retardation, poor motor coordination, vertebral anomalies and facial dysmorphisms. We discuss the involvement of the *PAX1* and *SSTR4* genes in the development of the vertebral anomalies and the intellectual disability.

2. Clinical report

The patient, a 5-year-old girl, is the second child of healthy unrelated parents, with a 8-year-old brother also healthy. During pregnancy amniocentesis was performed at 17 weeks of gestation, because of advanced maternal age (36 years-old), revealing a normal female karyotype. Intrauterine growth restriction was only noted at 32 weeks of gestation. She was born at term (40 weeks and 5 days) by caesarean section due to acute fetal suffering. Apgar scores were 9 and 10 at 1 and 5 min, respectively. Birth weight was 2.220 g (<3th centile), birth length 43 cm (<5th centile) and occipitofrontal circumference (OFC) 30cm (<10th centile). The microcephaly was evident and she showed marked hypotonia. She had left club foot corrected by surgery. At 8 months her weight was on the 90th centile and height was below the 5th centile. She had short stature, obesity and microcephaly with plagiocephaly. On examination at 18 months, weight was 9.330 g (<5th centile), height 74.5 cm (<5th centile) and OFC 44cm (<3th centile). She only walked independently at 3 years old; at this age she exhibited sensorineural hearing loss. At the age of 5 years, her weight was 17 kg (25th centile), height 104.5 cm (10th centile) and OFC 47 cm (<3th centile). She had severe developmental delay, with absence of language, still has microcephaly with craniofacial asymmetry, plagiocephaly and dolicocephaly. Brain MRI revealed microlissencephaly with partial agenesis of the *corpus callosum* associated with bilateral periventricular band heterotopia. She only had seizures in the neonatal period controlled with medication in the first two months of life. She had a round face with prominent cheeks, high forehead, malar hypoplasia with moderate micrognathia, high arched palate, nose with large flared nostrils, broad and prominent nasal bridge, frontal bossing, V-shaped high arched eyebrows sparsely laterally, deep-set eyes, down-slanting palpebral fissures, prominent lower lip, short *philtrum* (Fig. 1A-B), short neck with limitation of head movement and a low posterior hairline. Short hands with clinodactyly of the 4th and 5th fingers, the 5th finger is short in both hands. She has very poor motor coordination with ataxia, restricted joint mobility of knees and elbows. She was assessed using the Schedule of Growing Skills II at 62 months of age revealing: in locomotor and manipulative areas appropriate results for 24 months; visual, hearing and language skills score of 36 months; speech and language score of

24 months; interactive and self-care appropriate of 36 months; a cognitive skill score of 30 months. She only says two monosyllabic words with progression in gestural language. The patient exhibits scoliosis and kyphosis, vertebral column X-ray detected cervical fusion of C1-C2 and reduction of intervertebral spaces between D3 to D6 at the dorsal region. She had eleven thoracic vertebrae. Analysis of hormone levels for: thyroid-stimulating hormone (TSH), freeT4, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), IGF binding protein-3 (IGFBP-3) revealed all in the normal range. On ophthalmologic examination the girl exhibits strabismus, horizontal nystagmus and amblyopia.

3. Materials and methods

3.1 Array Comparative Genomic Hybridization (array-CGH)

Oligonucleotide array-CGH was performed using Agilent SurePrint G3 Human Genome microarray 180K (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's instructions (protocol version 6.2.1), as previously described [Matoso *et al.*, 2013]. Data were extracted with Feature Extraction software (v10.7) and analyzed using Agilent Genomic Workbench (v6.0) with the following settings: ADM2 as aberration algorithm, threshold of 6.0, moving average 2 Mb.

3.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

To confirm the array-CGH result, MLPA was performed using the set of probes P007 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturers' instructions.

3.3 Cytogenetic and FISH analysis

Standard chromosome analysis was performed on GTG-banded metaphases at approximately the resolution of 550-band level, obtained from cultured peripheral blood lymphocytes. The karyotype was described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [ISCN 2013]. FISH technique was performed with BAC clone RP1-167O22, within the 20p11.22 triplicated region, using standard protocols, in the patient and her parents. Analysis was carried out using a Nikon Eclipse fluorescence microscope (Nikon Instruments Europe B.V.;

Badhoevedorp, The Netherlands) coupled with the Cytovision system (Applied Imaging International Lda; Newcastle upon Tyne, UK).

4. Results

Array-CGH analysis revealed an increased dosage on chromosome 20p11.22p11.21 region, spanning about 2 Mb of genomic DNA. The start of the gain is between base pair number 21,330,078 (clone A_16_P21098196) and 21,312,256 (clone A_14_P124251) and the end is between base pair 23,347,721 (clone A_14_P133269) and 23,360,821 (clone A_14_P200567) (hg19; GRCh Build 37.1, February 2009) (Fig. 2A). The oligonucleotides within the amplified region had consistent values with the presence of four copies, most probably a triplication or a homozygous duplication.

MLPA showed a gain of signal ratio (1.91) for probe to *THBD* gene, suggesting a copy number of four.

Metaphase FISH analysis showed apparently two copies of RP1-167O22, however, the signals present in the two homologues were of different intensity (Fig. 2B), the stronger signal was also visible in the interphase, and in some interphases we could see a split signal of the larger one (Fig. 2C), but we failed to prove the triplication probably due to the proximity of the copies. However the discrepancy of the signals between the two homologues ruled out the possibility of a homozygous duplication. Since array-CGH and MLPA had consistent results with the existence of four copies, the interstitial triplication is the most probable rearrangement. FISH was also performed in metaphases of both parents and showed normal hybridization results.

The final karyotype of the patient was:

46,XX,arr 20p11.22p11.21(21,330,078-23,347,721)x4.rsa 20p11.21(THBD)x4dn

5. Discussion

This is the first report of a patient with a *de novo* non-recurrent interstitial triplication of the 20p11.22p11.21 region. The copy number alteration was detected using oligo array-CGH, confirmed by MLPA and further characterized with interphase and metaphase FISH. Our patient share consistent features with the phenotype of patients with trisomy 20p syndrome (see Table 1) including: psychomotor retardation, poor

motor coordination, vertebral anomalies, short neck, craniofacial asymmetry, language delay, coarse hair, round face with prominent cheeks, large flared nostrils, high-arched eyebrows, downslanting of palpebral fissures, moderate micrognathia and high arched palate [Sidwell *et al.*, 2000; Leclercq *et al.*, 2009; D'Angelo *et al.*, 2010]. The microcephaly observed in the described patient has not been reported before and her speech is almost absent with only two monosyllables at 5 years of age. Our case demonstrates that an increased dosage of the expression of genes within the region 20p11.2 is of significant relevance for the phenotype.

The triplicated region 20p11.22p11.21 encompasses 19 RefSeq genes, with 10 described in the OMIM database (*XRN2*, *NKX2-4*, *NKX2-2*, *PAX1*, *FOXA2*, *SSTR4*, *THBD*, *CD93*, *NXT1*, *GZF1*). *THBD* gene encodes thrombomodulin, an endothelial cell surface glycoprotein that forms a complex with the coagulation factor thrombin, it has been reported an association of thrombophilia due to thrombomodulin defect (MIM: 188040) and heterozygous mutations that confer susceptibility to Hemolytic uremic syndrome (MIM: 612926). Taking into account the expression and function of the other genes involved, we identified two genes, *PAX1* and *SSTR4*, whose deregulation may play a critical role in the development of the vertebral anomalies and the intellectual disability respectively. *PAX1* belongs to a highly conserved family of developmental control genes, and it seems to play an important role in the normal development of the vertebral column. Recently it has been annotated in the OMIM database associated with Otofaciocervical syndrome (MIM: 615560), caused by homozygous mutations, and including vertebral defects and mild intellectual disability [Pohl *et al.*, 2013]. Based on mouse studies, the human phenotype of a *PAX1* mutant would be expected to have vertebral segmentation anomalies, that could have as a consequence a failed segmentation of the cervical vertebrae with the clinical sequelae of a short immobile neck and a low posterior hairline, vertebral fusions may also occur elsewhere along the spine and other vertebral anomalies [McGaughran *et al.*, 2003]. It seemed to be not coincidental that almost all the patients with deregulation of expression in this region, by carrying more than two copies, are reported with vertebral anomalies (Table 1), and the features present in our patient are very consistent.

SSTR4 gene, the somatostatin receptor 4, is expressed in highest levels in fetal and adult brain and lung. It is functionally coupled not only to inhibition of adenylate cyclase, but also to activation of both arachidonate release and mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. The results of the experimental work of Gastambide *et al.* [2009] in mice, suggests that hippocampal *SSTR4* are functionally involved in a switch from hippocampus-based memory to dorsal striatum-based memory.

In conclusion, we report the first tetrasomy 20p11.22q11.21 due to an interstitial triplication, the patient exhibits the main clinical features of the trisomy 20p syndrome. This region could delineate a minimal critical region, disclosing candidate genes that we propose to be *PAX1* and *SSTR4*, whose overexpression could be responsible for the vertebral anomalies and the intellectual disability respectively.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We would like to thank the family for their willing participation in this report.

References

Berry R, Manchester DK, Feingolf M et al. Tetrasomy 16q12.1-q12.2 as a result of an interstitial triplication. *Am J Hum Genet* 1990;47:A26.

Beneteau C, Landais E, Doco-Fenzy M, Gavazzi C, Philippe C, Béri-Dexheimer M, Bonnet C, Vigneron J, Walrafen P, Motte J, Leheup B, Jonveaux P. Microtriplication of 11q24.1: a highly recognisable phenotype with short stature, distinctive facial features, keratoconus, overweight, and intellectual disability. *J Med Genet* 2011;48:635-639.

Beunders G, van de Kamp JM, Veenhoven RH, van Hagen JM, Nieuwint AW, Sistermans EA. A triplication of the Williams-Beuren syndrome region in a patient with mental retardation, a severe expressive language delay, behavioural problems and dysmorphisms. *J Med Genet* 2010;47:271-275.

Burnside RD, Lose EJ, Domínguez MG, Sánchez-Corona J, Rivera H, Carroll AJ, Mikhail FM. Molecular cytogenetic characterization of two cases with constitutional distal 11q duplication/triplication. *Am J Med Genet Part A* 2009;149A:1516–1522.

Chaabouni M, Turleau C, Karboul L, Jemaa LB, Maazoul F, Attie-Bitach T, Romana S, Chaabouni H. De novo trisomy 20p of paternal origin. *Am J Med Genet Part A* 2007;143A:1100–1103.

Christofolini DM, Meloni VA, Ramos MAP, Oliveira MM, de Mello CB, Pellegrino R, Takeno SS, Melaragno MI. Autistic Disorder Phenotype Associated to a Complex 15q Intrachromosomal Rearrangement. *Am J Med Genet Part B* 2012;159B:823–828.

D'Angelo CS, de Oliveira MA, de Castro CIE, Koiffmann CP. Molecular cytogenetic characterization of an inherited maternal duplication 20p11.21p13 associated with a small 20p11.21 deletion. *Am J Med Genet Part A* 2010;152A:3197–3202.

Devriendt K, Matthijs G, Holvoet M, Schoenmakers E, Fryns JP. Triplication of distal chromosome 10q. *J Med Genet* 1999;36: 242–245.

Eckel H, Wimmer R, Volleth M, Jakubiczka S, Muschke P, Wieacker P. Intrachromosomal triplication 12p11.22-p12.3 and gonadal mosaicism of partial tetrasomy 12p. *Am J Med Genet* 2006;140:1219–1222.

Fryer AE, Ashworth M, Hawe J, Pilling D, Pauling M, Maye U. Isochromosome 20p associated with multiple congenital abnormalities. *Clin Dysmorphol.* 2005;14:49-50.

Triplication 20p11.22p11.21 in a girl with development delay and vertebral anomalies

Gastambide F, Viollet C, Lepousez G, Epelbaum J, Guillou JL. Hippocampal SSTR4 somatostatin receptors control the selection of memory strategies. *Psychopharmacology* 2009;202:153–163.

Giorda R, Beri S, Bonaglia MC, Spaccini L, Scelsa B, Manolakos E, Mina ED, Ciccone R, Zuffardi O. Common structural features characterize interstitial intrachromosomal Xp and 18q triplications. *Am J Med Genet Part A* 2011;155:2681–2687.

Harrison KJ, Teshima IE, Silver MM et al. Partial tetrasomy with triplication of chromosome (5)(p14-15.33) in a patient with severe multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 1998;79: 103–107.

ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M (eds), (S Karger, Basel 2013).

Knijnenburg J, van Bever Y, Hulsman LO, van Kempen CA, Bolman GM, van Loon RL, Beverloo HB, van Zutven LJ. A 600 kb triplication in the cat eye syndrome critical region causes anorectal, renal and preauricular anomalies in a three-generation family. *Eur J Hum Genet* 2012;20:986-989.

Leclercq S, Maincent K, Baverel F, Tessier DL, Letourneur F, Lebbar A, Dupont J-M. Molecular cytogenetic characterization of the first reported case of inv dup del 20p compatible with a U-type exchange model. *Am J Med Genet Part A* 2009;149A:437–445.

López-Expósito I, Bafalliu JA, Santos M, Fuster C, Puche-Mira A, Guillén-Navarro E. Intrachromosomal partial triplication of chromosome 13 secondary to a paternal duplication with mild phenotypic effect. *Am J Med Genet Part A* 2008;146A:1190–1194.

Marcus, E.S., Fuller, B. and Riccardi, M. Triplication of chromosome arm 20p due to inherited translocation and secondary nondisjunction. *Am J Med Genet* 1979;4: 47-50.

Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A, Castelo TM, Weise A, Carreira IM. Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the EPHA5 gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet A* 2013;161A:1923-1928.

Matsuki S, Sasagawa I, Kakizaki H, Itoh K, Nakada T. A boy with intrachromosomal triplication of the X chromosome. *J Urol* 1998;160:1490-1491.

McGaughran JM, Oates A, Donnai D, Read AP, Tassabehji M. Mutations in PAX1 may be associated with Klippel-Feil syndrome. *Eur J Hum Genet* 2003;11:468-474.

Mercer CL, Browne CE, Barber JCK, Maloney VK, Huang S, Thomas NS, Foulds N. A complex medical phenotype in a patient with triplication of 2q12.3 to 2q13 characterized with oligonucleotide array CGH. *Cytogenet Genome Res* 2009;124:179–186.

Ocak Z, Surucu R. Molecular cytogenetic characterization of a case of primary amenorrhea with intrachromosomal triplication of the X chromosome q arm. *Genet Couns.* 2012;23:297-304.

Öunap, K., Ilus, T. and Bartsch, O. A girl with inverted triplication of chromosome 3q25.3 → q29 and multiple congenital anomalies consistent with 3q duplication syndrome. *Am J Med Genet* 2005;134A: 434–438.

Pohl E, Aykut A, Beleggia F, Karaca E, Durmaz B, Keupp K, Arslan E, Palamar M, Yigit G, Özkinay F, Wollnik B. A hypofunctional PAX1 mutation causes autosomal recessively inherited otofaciocervical syndrome. *Hum Genet* 2013;132:1311-1320.

Rauch A, Pfeiffer RA, Trautmann U. Deletion or triplication of the $\alpha 3(\text{VI})$ collagen gene in three patients with 2q37 chromosome aberrations and symptoms of collagen-related disorders. *Clin Genet* 1996;49:279–285.

Reddy KS, Logan JJ. Intrachromosomal triplications: molecular cytogenetic and clinical studies. *Clin Genet* 2000; 58: 134–141.

Rivera H, Bobadilla L, Rolon A, Kunz J, Crolla JA. Intrachromosomal triplication of distal 7p. *J Med Genet* 1998;35: 78–80.

Roberts SE, Dennis NR, Browne CE, Willatt L, Woods CG, Cross I, Jacobs PA, Thomas NS. Characterisation of interstitial duplications and triplications of chromosome 15q11-q13. *Hum Genet* 2002;110:227–234.

Schluth C, Mattei MG, Mignon-Ravix C, Salman S, Alembik Y, Willig J, Gingliger E, Jeandidier E. Intrachromosomal triplication for the distal part of chromosome 15q. *Am J Med Genet Part A* 2005;136A:179–184.

Sidwell RU, Pinson MP, Gibbons B, Byatt SA, Svennevik EC, Hastings RJ, Flynn DM. Pure trisomy 20p resulting from isochromosome formation and whole arm translocation. *J Med Genet* 2000;37:454-458.

Ungaro P, Christian SL, Fantes JA, Mutirangura A, Black S, Reynolds J, Malcolm S, Dobyns WB, Ledbetter DH. Molecular characterization of four cases of intrachromosomal triplication of chromosome 15q11-q14. *J Med Genet* 2001;38:26–34.

Triplication 20p11.22p11.21 in a girl with development delay and vertebral anomalies

Verheij JBG, Bouman K, van Lingen RA et al. Tetrasomy 9q due to an intrachromosomal triplication of 9p13-p22. *Am J Med Genet* 1999; 86: 168–173.

Wang J, Reddy KS, Wang E et al. Intrachromosomal triplication of 2q11.2q21 in a severely malformed infant: case report and review of triplications and their possible mechanism. *Am J Med Genet* 1999;82:312-317.

Wu YC, Fang JS, Lee KF, Estipona J, Yang ML, Yuan CC. Prenatal diagnosis of occipital encephalocele, mega-cisterna magna, mesomelic shortening, and clubfeet associated with pure tetrasomy 20p. *Prenat Diagn* 2003;23:124-127.

Legends, Figures and Tables



Figure 1 – Photographs of the Patient with 5 years old.(A-B) Facial appearance: round face with prominent cheeks, high forehead, moderate micrognathia, nose with large flared nostrils, broad and prominent nasal bridge, frontal bossing, V-shaped high arched eyebrows (spared laterally), deep-set eyes, down-slanting palpebral fissures, prominent lower lip, short *philtrum*.

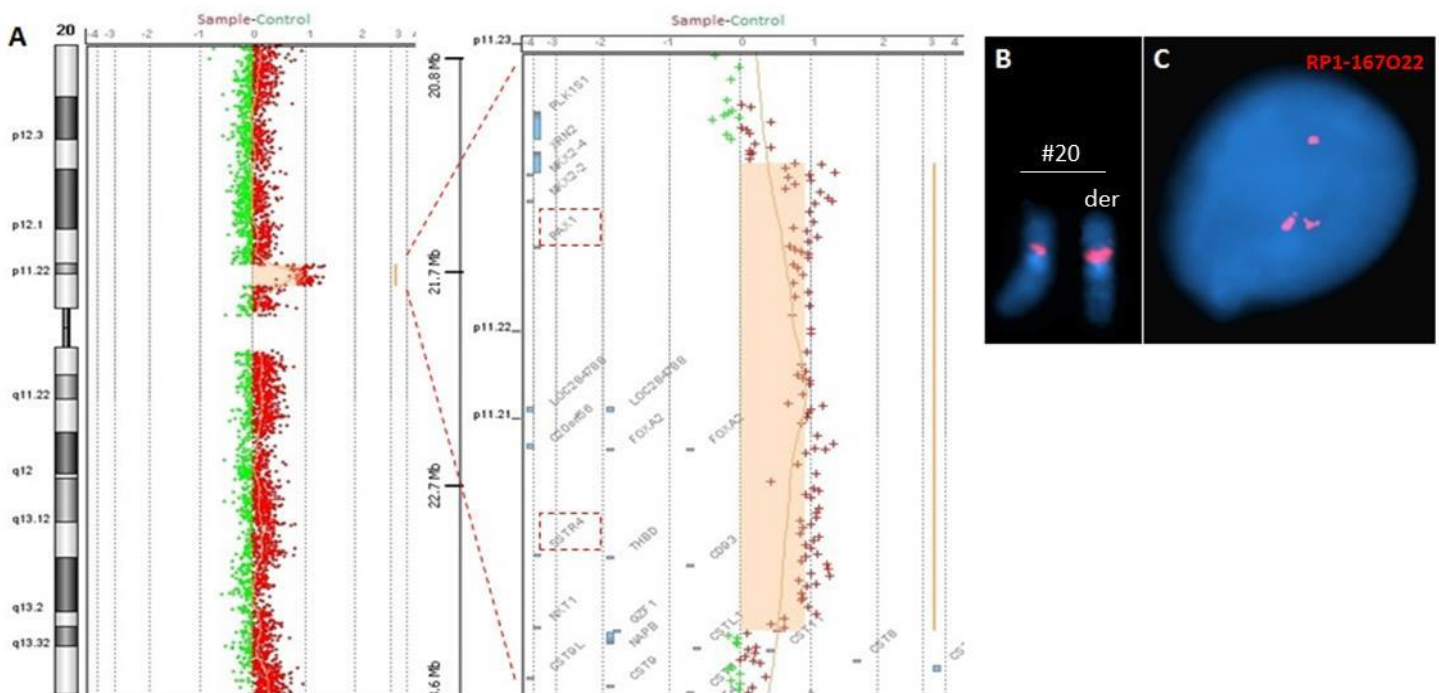


Figure 2 – Oligoarray analyses and FISH results. (A) ArrayCGH profile of chromosome 20, showing the amplified region 20p11.22p11.21 (chr20: 21,330,078-23,347,721; NCBI hg19); (B-C) Hybridization results with probe RP1-167O22 showing: a stronger signal in the derivative 20 (B), and three signals in the interphase (C).

Table 1. Main phenotypic features of patients with duplications including 20p11.2 previously reported in the literature and comparison with the patient described in this study.

Reference	Oppenheimer et al. [2000]	Sidwell et al. [2000]	Faivre et al. [2000]	Chaabouni et al. [2007]	Leclercq et al. [2009]	D'Angelo et al. [2010]	Our patient
Characterization	Karyotype	FISH	FISH	FISH	Oligo array	SNP array	Oligo array
duplicated segment	20pter-p11.1*	20q11.1-pter	20p11.2-p12.1**	20p11.22-pter	20p11.22-20p13	20p11.21-p13	Triplication 20p11.22p11.21
Deleted segment				20q13.3	20p13	20p11.21	
Developmental delay	+	+	+	+	+	+	+
Hypotonia	0	+	+	0	0	0	+
Poor motor coordination	+	+	+	+	+	+	+
Coarse hair	+	+	+	0	+	0	+
Round face with prominent cheeks	+	+	-	-	+	-/+	+
large flared nostrils	+	+	+	0	+	-	+
High-arched eyebrows	+	+	+	0	0	+	+
Hypertelorism	+	+	-	+	-	+	-
Down-slanting of palpebral fissures	-	-	Upward	+	-	+	+
Short neck	+	+	-	0	+	-	+
Vertebral anomalies	+	+	+	0	+	+	+
Dental anomalies	+	+	-	+	-	0	-
Language delay	+	+	+	+	+	-	+
Cranial asymmetry	0	0	+	Macrocephaly and dolicocephaly	-	Plagiocephaly	+
							Plagiocephaly and dolicocephaly

* other chromosome imbalance involved; (+) present; (-) absent; (0) not cited; **mosaic

3.3 CNVs de SCI provavelmente patogénicas, provavelmente benignas ou apenas SCI

Um grupo de 34 pacientes revelou CNVs de SCI que foram sub-classificadas em provavelmente patogénicas, provavelmente benignas ou apenas de SCI considerando: o seu conteúdo genómico, algum paciente semelhante previamente reportado e a herança familiar. As CNVs estão descritas na Tabela IV, por ordem de cromossoma e localização (pter→qter), no caso do mesmo paciente apresentar duas CNVs de SCI a organização obedece à CNV localizada no cromossoma de nº mais baixo.

Cromossoma 1

No cromossoma 1 observou-se apenas uma CNV em 1p13.3 de 257 kb e de origem materna (M44/11). Inclui o gene *VAV3* (OMIM#605541) envolvido na angiogénese, sem patologia conhecida por variação no nº cópias. A progenitora portadora não apresenta manifestações, tem apenas uma CNV sobreponível descrita na DGV. Classificada apenas de SCI.

Cromossoma 2

No braço curto do cromossoma 2(p22.3) observou-se uma triplicação numa extensão de 677 kb, incluindo 7 genes RefSeq (2 microRNA), que mostrou ser de origem materna. Na DGV estão descritas CNVs sobreponíveis mas apenas em duplicação. A paciente (M968/10) apresenta DI, ataxia e baixa estatura também presente na progenitora. Mãe alcoólica sem avaliação quanto ao DI. CNV classificada apenas de SCI.

Os pacientes M1018/10 e M503/11 revelaram CNVs no braço longo em 2(q11.1q11.2) com pontos de quebra diferentes mas sobreponíveis e com o mesmo conteúdo de genes reportado na OMIM, no primeiro a alteração mostrou ser *de novo*, mas no último verificou-se uma herança paterna. Esta região não é coberta por CNVs frequentes na DGV. Existem três pacientes na base DECIPHER com CNVs sobreponíveis [287648, 254438, 267934] herdadas, mas sem fenótipo descrito. O gene *SNRNP200* está associado a uma forma de Retinite Pigmentar (MIM#601664) de transmissão autossómica dominante. O probando M503/11 e o progenitor, após exames oftalmológicos adequados, não mostraram qualquer lesão sugestiva da patologia, na outra paciente após um exame oftalmológico de rotina nada foi referido. Podemos concluir que a haploinsuficiência do gene não parece provocar Retinite Pigmentar

mesmo de manifestação mais tardia. Entre os outros genes temos um associado a susceptibilidade ao feocromocitoma (MIM#171300) e outro associado a uma síndrome de herança autossômica recessiva (MIM#217080), a sua causalidade foi excluída também pela clínica. Os probandos apresentam ambos DI, no entanto um é macrossômico, tal como o pai, e o outro apresenta microcefalia e baixa estatura. Uma vez que, apesar da presença do DI, o fenótipo dos probandos não é semelhante, e o progenitor portador não evidencia DI, não é possível atribuir a estas CNVs um significado clínico patogénico, ficando apenas de SCI.

O paciente SM126/11, referido com ADPM, microftalmia e coloboma bilateral, revelou uma deleção intragénica do *RAB3GAP1* (exões 19-25). Este gene está associado ao *Warburg micro syndrome 1* (MIM#600118), sendo no entanto uma patologia de transmissão autossômica recessiva. Face ao quadro clínico compatível com a síndrome, tudo indica uma provável mutação no outro alelo, no entanto não foi possível acompanhar os estudos subsequentes nesta família. Apesar de permanecer de SCI, tudo indica que esta CNV será provavelmente patogénica.

No cromossoma 2 observaram-se oito CNVs de SCI, uma provavelmente patogénica e sete apenas de SCI. Duas destas CNVs localizadas em 2(p15) e 2(q37.2) estão apenas descritas na Tabela IV (M55/11, M103/11) e outras duas estão descritas na Tabela III por pertencerem a pacientes portadores de CNVs patogénicas.

Cromossoma 3

Neste cromossoma observaram-se quatro CNVs, uma localizada no braço curto em 3(p14.2) e três no braço longo em 3(q22.3), 3(q25.2), 3(q28q29). Não apresentam CNVs sobreponíveis na DGV e o conteúdo génico é aparentemente irrelevante. Na segunda CNV a herança é desconhecida (M213/11), duas são herdadas de progenitor sem manifestações (M149/11, M316/11) e na última (M189/11) o progenitor é referido com dificuldades de aprendizagem. Apenas foi possível classificá-las com SCI.

Cromossoma 4

Observaram-se duas CNVs (SM30/11, M952/10), uma no braço curto em 4(p14) e outra no longo 4(q13.3). Não apresentam CNVs frequentes descritas na DGV, o seu

conteúdo génico tem um impacto desconhecido ou irrelevante, ambas herdadas de progenitor com dificuldades de aprendizagem. CNVs classificadas com SCI.

Cromossoma 5

A penas uma CNV localizada em 5(q22.3q23.1) de 418 kb (SM40/11). Sem CNVs sobreponíveis na DGV, herança de progenitor sem manifestações. Diagnóstico posterior de Neurofibromatose por mutação no gene *NF1* que justifica quadro clínico. Classificada como provavelmente benigna.

Cromossoma 6

Uma duplicação de 216 kb localizada em 6q(26) de origem paterna (M930/10), apenas um gene na OMIM sem patologia associada conhecida. Pai não apresenta as manifestações do filho. Classificada apenas com SCI.

Cromossoma 7

O cromossoma 7 revelou duas CNVs, ambas deleções no braço curto em 7(p22.33) e 7(p21.2p15.3), envolvendo uma extensão de 2 Mb e 3.2 Mb respectivamente (M1007/10, M929/10). Ambas são herdadas, num dos pacientes o DI é *borderline* não havendo informação quanto ao progenitor, no outro paciente o DI é grave e o progenitor apresenta DI ligeiro. O conteúdo génico tem uma extensão relevante, os genes associados com patologia conhecida não apresentam expressão relevante em hemizigotia ou as manifestações foram excluídas por exames clínicos. Estão reportados dois pacientes na DECIPHER com alterações dentro da região 7(p22.3) com um quadro clínico de DI (278871, 258611), uma delas herdada de progenitor semelhante. Existe um caso reportado na literatura que inclui a região 7(p21.2p15.3), mas tem uma extensão muito superior (7 Mb) com conteúdo génico que não é comum e é responsável por MC graves [Fryssira *et al.*, 2011]. Classificadas de SCI.

Cromossoma 8

Observaram-se em dois pacientes (M118/11, M902/10) deleções do braço longo do cromossoma 8. Uma delas em 8(q21.3) de 73 kb envolvendo apenas um gene, herdada de um progenitor sem manifestações clínicas, mas com apenas uma CNV na DGV,

provavelmente benigna. A outra deleção em 8(q22.2) envolve uma porção intragénica do *COH1* (exões 8-19), mutações neste gene em homocigotia ou heterocigotia composta estão associadas à síndrome de Cohen, por indicação da genética clínica o fenótipo do paciente não justifica pesquisar mutação no outro alelo. Apenas tem duas CNVs descritas na DGV e classificou-se como de SCI.

Cromossoma 9

Uma duplicação em 9(q22.3) de 536 kb (M1013/10) envolvendo nove genes, três deles descritos na OMIM mas sem associação conhecida a patologia, sem CNVs reportadas na DGV, herdada de progenitor sem manifestações. Classificada apenas com SCI.

Cromossoma 10

Observaram-se três CNVs em duplicação, uma em 10(p15.3) de 504 kb (M154/11), que inclui quatro genes, mas apenas um descrito na base OMIM (expressão específica no cérebro) sem patologia associada conhecida; existem dois pacientes descritos na DECIPHER (#287723, #284696) com duplicações incluindo o mesmo gene, um deles com autismo e o outro com DI moderado. Esta CNV é herdada de progenitor com dificuldades escolares, face às evidências serem pouco específicas e consistentes, esta CNV classificou-se apenas com SCI. As outras duas CNVs foram observadas no mesmo paciente (M986/10) no braço longo em 10(q26.13q26.2) e 10(q26.2) em posições nucleotídicas próximas mas distintas, ambas são de origem paterna (sem manifestações fenotípicas) os genes envolvidos apenas um deles tem patologia associada mas irrelevante para esta CNV. Ambas as CNVs são de SCI.

Cromossoma 11

Observou-se uma duplicação em 11(p15.1p14.3) que envolve uma extensão de 3 Mb incluindo nove genes, dos quais cinco estão na OMIM, dois deles estão associados a patologia de expressão irrelevante não só para o desequilíbrio em causa como no contexto da clínica (M931/10). Existe um paciente na base DECIPHER (#289417) com uma CNV que inclui os genes *ANO5* e *SLC17A6*, com autismo e DI. A duplicação é herdada de um progenitor sem manifestações, no entanto face à extensão da CNV, ao fenótipo do probando com PHDA, DI mais ao nível da linguagem e epilepsia, não se

pode excluir a sua patogenicidade embora também não exista nenhuma evidência que o comprove. Classificada apenas de SCI.

No braço longo em 11(q13.5) observou-se uma CNV em duplicação, num paciente também portador de outra alteração no cromossoma 7 (M1007/10). Esta duplicação é *de novo*, tem a extensão de 1 Mb e envolve oito genes descritos na OMIM, um dos pontos de quebra é no gene *CAPN5* que está associado a uma retinopatia de transmissão autossômica dominante, a clínica não refere qualquer distúrbio ao nível oftalmológico. Classificada apenas de SCI.

Cromossoma 12

Uma duplicação em 12(q21.31) numa extensão de 742 kb e de origem paterna (M150/11). Para os genes envolvidos não se conhece patologia associada, não existem CNVs semelhantes reportadas na DGV, classificada apenas de SCI.

Cromossoma 13

Observou-se uma deleção em 13(q21.2) numa extensão de 200 kb e de origem materna (M102/11). Dos três genes incluídos apenas o *DIAPH3* está na OMIM e associado a uma neuropatia auditiva de transmissão autossômica dominante. O probando não apresenta queixas auditivas (confirmado pela clínica), assim como a progenitora sem qualquer outra manifestação fenotípica. Classificada apenas de SCI.

Cromossoma 14

Neste cromossoma foi observada uma pequena deleção intragénica do *GPHN* (M944/10), este gene está associado a uma doença metabólica de transmissão autossômica recessiva, codifica para uma proteína microtubular do citoesqueleto da membrana neuronal pós-sináptica. Recentemente foram reportados seis pacientes com deleções em hemizigotia neste gene, *de novo* e herdadas de progenitor sem manifestações, cobrindo os mesmos exões e associadas a perturbações do neurodesenvolvimento incluindo PEA, esquizofrenia e convulsões [Lionel *et al.*, 2013]. A semelhança, ao nível genómico e fenotípico, com os casos reportados leva-nos a classificar esta CNV como provavelmente patogénica.

Cromossoma 15

Localizada em 15(q26.2) observou-se uma duplicação num paciente (M149/11) também portador de outra CNV no cromossoma 3 (SCI) já descrita. Esta CNV é de origem materna, abrange 526 kb com dois genes um deles na OMIM e onde se localiza um dos pontos de quebra, o *IGF1R* com associação a resistência à insulina. A mãe portadora não apresenta manifestações, já o pai tem um fenótipo sobreponível com epilepsia e DI embora mais ligeiro. Não existem CNVs reportadas na DGV, classificada apenas de SCI.

Cromossoma 16

A deleção observada em 16(p13.2p13.33) envolve 291 kb (M917/10), incluindo o gene *ATF7IP2* (factor de transcrição) sem patologia associada conhecida, herdada de progenitora sem manifestações. Na DGV apenas estão descritas raras CNVs cobrindo este gene. Classificada apenas de SCI.

Cromossoma 17

Neste cromossoma foram observadas duas CNVs no braço longo, uma delas localizada em 17(q12) numa região de 711 kb (M702/10), que inclui 16 genes descritos na base OMIM, três deles estão associados a patologia cuja expressão não é relevante para uma duplicação. Nesta região existe uma síndrome de genes contíguos mas cuja região crítica está fora das posições nucleotídicas desta CNV. Contudo, esta CNV inclui o gene *PNMT* descrito com possível associação a hipertensão (MIM#145500) e que codifica para uma enzima que catalisa a síntese de epinefrina. Existem dois pacientes na DECIPHER com CNVs menores (#257527, #250287) um deles com DI e o outro com DI, déficit de atenção e *tics*. Esta CNV é *de novo*, não existem CNVs sobreponíveis na DGV, está reportada na base DECIPHER (#291762), face ao descrito e ao fenótipo do probando, crises de ansiedade com estereotipias dos membros superiores e PHDA, a sua patogenicidade não pode ser excluída. Classificada com apenas de SCI.

A outra CNV no cromossoma 17 foi observada num paciente (M189/11) também portador de uma deleção no cromossoma 3, envolve 169 kb e está localizada em 17(q22). Esta duplicação envolve um gene que não está descrito na base OMIM e a sua origem é desconhecida. Classificada apenas de SCI.

Cromossomas 19 e 21

As CNVs observadas nestes cromossomas, todas classificadas de SCI provavelmente benignas (M261/11, M215/11, M1013/11), estão apenas descritas na Tabela IV.

Cromossoma 22

No cromossoma 22 observaram-se duas CNVs na mesma região 22(q11.21), em pacientes distintos (M1010/10, M942/10) com o desequilíbrio recíproco e com os mesmos genes descritos na OMIM, um deles o *PRODH* está associado a patologia de transmissão autossômica recessiva e que se manifesta por níveis de prolina elevados (MIM#239500) assim como a susceptibilidade à esquizofrenia (#600850). Os níveis de prolina em ambos os pacientes apresentaram valores normais, não existindo evidências claras mesmo no caso da deleção quanto à sua patogenicidade. A duplicação, de origem desconhecida, surge num contexto de consanguinidade dos progenitores. Ambas as CNVs classificadas apenas de SCI.

Cromossoma X

No cromossoma X observaram-se três duplicações, uma no braço curto e duas no braço longo. A CNV localizada em X(p22.31) tem uma extensão de 1.6 Mb envolve seis genes (M184/11), quatro deles descritos na base OMIM, inclui o gene *STS* associado a Ictiose (MIM#308100) mas por mutação ou deleção. Existem vários pacientes reportados na DECIPHER e na literatura, mas para além de apresentar penetrância incompleta, esta CNV tem uma interpretação bastante controversa [Faletra *et al.*, 2012; Esplin *et al.*, 2014]. O paciente descrito é do sexo masculino, herdou esta CNV da mãe com dificuldades de aprendizagem e que apresentou um desvio no estudo de inactivação do cromossoma X. Apesar das evidências controversas, esta CNV foi classificada com SCI mas provavelmente patogénica.

Uma duplicação do braço longo localizada em X(q13.3), envolve 182 kb incluindo dois genes na base OMIM, um dos pontos de quebra está localizado no gene *ZDHC15*, numa paciente do sexo feminino (M246/11) e com herança materna. Este gene tem possível associação a défice cognitivo (MIM#300577) por uma paciente reportada com uma translocação equilibrada mas com ponto de quebra neste gene, apresentando um desvio na inactivação do X, com reflexo na expressão do gene e

associado a DI severo [Mansouri *et al.*, 2005]. Existe uma CNV semelhante na DECIPHER (#268040) num paciente do sexo masculino com autismo e défice cognitivo. A patogenicidade desta alteração estará condicionada pelo padrão de inactivação do cromossoma X. Apesar de não haver informação clínica quanto ao fenótipo da mãe, nem estudo do padrão de inactivação do X, esta CNV embora de SCI foi considerada como provavelmente patogénica. A outra duplicação localizada em X(q28) observou-se num paciente (M165/11) também portador de outra CNV e está descrita na Tabela III apesar de ter SCI.

Dilemas que permanecem na interpretação das CNVs de SCI

No caso de CNVs de SCI herdadas, tanto quando o progenitor não apresenta manifestações, como quando é descrito um quadro inespecífico de dificuldades de aprendizagem, não é possível nem prudente tirar conclusões seguras sobre a sua patogenicidade. O progenitor não tem geralmente uma avaliação formal, sendo difícil no caso de distúrbios do neurodesenvolvimento ligeiros tirar conclusões assertivas num contacto informal, essa avaliação deverá ser realizada *a posteriori* se a clínica assim o entender. Mesmo num progenitor com referência a manifestações concordantes, esta ocorrência pode ser uma coincidência, quando possível outros membros da família devem ser avaliados para constatar se a CNV segrega com o fenótipo. Também quando um progenitor portador não tem manifestações isso por si só não comprova a provável benignidade da CNV, pois é necessário considerar: a penetrância incompleta, a expressão variável com manifestações mais subtis, regiões sujeitas a *imprinting* condicionadas pela herança parental, uma mutação no outro alelo (não detectável pelo array) que leve à expressão de um distúrbio recessivo ou mesmo a presença de genes “modificadores” no probando que condicionem a expressão e que não estão presentes no progenitor. A possibilidade de um mosaicismo parental confinado a certos tecidos e que por isso não tem expressão clínica, deve ainda ser tida em consideração. Existem ainda situações mais raras já reportadas como a expansão da CNV, sendo no progenitor de um tamanho e no probando afectado de maior extensão [South *et al.*, 2008].

Tabela IV – Pacientes apenas com CNVs de SCI, provavelmente patogênicas, provavelmente benignas ou apenas de SCI.

ID	Desequilíbrio	Cromossoma (Cr.)	Início (bp)	Fim (bp)	Tamanho (bp)	Herança	Genes RefSeq		Descrição clínica [F] sexo feminino; [M] sexo masculino
								OMIM	
CNVs significados clínico incerto									
M44/11	deleção	1p13.3	108,175,530	108,433,140	257,611	materna		VAV3 (#605541)	[M] ADPM grave, dificuldades alimentares desde os 1 ^{os} meses de vida, baixo peso e estatura, microcefalia; cabelo espesso, pavilhões auriculares grandes rodados e lóbulos antevertidos, sobranceira arqueada, lábio inferior invertido; dedos pés longos; sutura metópica proeminente. Mãe sem manifestações.
Apenas uma CNV na DGV; um gene (oncogene); progenitor portador sem alterações.									
M968/10	triplicação	2p22.3	32,642,543	33,319,951	677,409	materna	7 (2 MIR) BIRC6 (#605638) LTBP1 (#150390)		[F] Défice cognitivo; baixa estatura ligeira (presente na mãe); osteopenia ligeira, escleróticas azuladas; ataxia.
CNVs na DGV apenas em duplicação; mãe com baixa estatura, alcoólica, sem informação quanto ao défice cognitivo.									
M55/11	deleção	2p15	63,319,597	63,605,603	286,007	materna	2 WDPCP (#613580)		[F] QI <i>borderline</i> , graves dificuldades de aprendizagem; turricefalia; sinofre; 4 ^o e 5 ^o dedos com encurtamento dos metacarpos (presente na mãe); surdez de transmissão com atraso na linguagem e terapia da fala. Pai com dificuldades de aprendizagem e depressão.
Apenas uma CNV parcial na DGV; gene associado a síndrome geneticamente muito heterogênea e de herança autossômica recessiva. Mãe não evidencia défice cognitivo.									
M1018/10	deleção	2q11.1q11.2	96,755,045	98,168,224	1,413,180	<i>de novo</i>	[13 OMIM] TMEM127 (#613403) SNRNP200 (#601664) CNUM4 (#607805)		[F] ADPM, início da linguagem aos 2 anos, microcefalia, baixa estatura, má progressão estato-ponderal desde os 2 meses de idade; mamilos afastados; dismorfismos faciais menor: fendas palpebrais oblíquas para baixo, implantação baixa das orelhas, hipoplasia do terço médio da face; malformação da charneira occipito-cervical.

Tabela IV (continuação)

M503/11	deleção	2q11.1q11.2	96,169,626	97,695,409	1,525,784	paterna	[13 OMIM] TMEM127 (#613403) SNRNP200 (#601664) CNNM4 (#607805)	[M] Déficit cognitivo, início da linguagem aos 3 anos. Macrossomia, adipomastia bilateral com mamilos invertidos; fácies achatada e alongada, micrognatia ligeira, palato alto, fendas palpebrais ligeiramente oblíquas para baixo, achatamento occipital; clinodactilia dos 5ºs dedos, haluces vagos. Pais com baixa escolaridade, alguns familiares paternos com DA.
Apenas SCI								
SM126/11	deleção	2q21.3	135,910,526	136,071,347	160,822	paterna	RAB3GAP1 (#602536)	[F] ADPM, microftalmia, coloboma bilateral. Manifestações sobreponíveis ao Síndrome de Warburg (#600118).
Proavelmente Patogénica								
Deleção intragénica do RAB3GAP1 (exões 19-25), associado ao <i>Warburg micro syndrome 1</i> (MIM#600118), de herança autossômica recessiva. Face ao quadro clínico tudo indica provável mutação no outro alelo.								
M103/11	deleção	2q37.2	236,429,985	236,596,165	166,181	?	AGAP1 (#608651)	[M] DI moderado, obesidade, sem distorções.
Apenas SCI								
Sem CNVs reportadas na DGV; sem avaliação dos progenitores; irmão sem a mesma CNV.								
M149/11	deleção	3p14.2	60,411,078	60,487,020	75,943	materna	FHIT (#601153)	[M] ADPM grave, epilepsia. Pai com epilepsia, baixa estatura, não sabe ler nem escrever; mãe e irmãos sem problemas.
	duplicação	15q26.2	98,685,713	99,212,346	526,634		2. IGF1R (#147370)	
Cr. 3: deleção intragénica do FHIT (1ª exão), várias CNVs mas parciais na DGV. Cr. 15: duplicação sem CNVs reportadas na DGV, IGF1R associado a resistência à insulina.								
Apenas SCI								
M213/11	duplicação	3q22.3	138,218,913	138,683,143	464,231	?	6 CEP70 (#614310) PIK3CB (#602925) FOX12 (#605597)	[M] DI ligeiro, déficit de atenção; escoliose postural e hemihipertrofia do lado direito.
Sem CNVs na DGV; inconclusivo quanto à origem, sem avaliação do pai; o gene FOX12 está associado a patologia (MIM#110100), mas em duplicação não parece relevante.								
Apenas SCI								
M316/11	deleção	3q25.2	153,861,528	153,943,799	82,272	materna	ARHGGE26	[F] ADPM ligeiro, QI global 82 (verbal 91, realização 78); hiperactividade; alteração da motricidade; distúrbios menores: síncope, <i>epicanthus</i> , fendas palpebrais grandes e largas, pestanas longas, ponta nasal

												bolbosa, lábios finos, palato alto e em V, fetal pads; baixa estatura.
Sem CNVs reportadas na DGV; apenas de 82 kb, um gene; apesar do fácies semelhante, mãe não evidencia déficit cognitivo.												
M189/11	deleção	3q28q29	191,261,697	192,759,438	1,497,742	paterna	4, FGF12 (#601513)					[F] QI global de 69 (verbal 72, realização 76), ligeiro, sem distormorfismos; microcefalia e baixa estatura. Irmão com déficit cognitivo; pai com DA, avó com déficit cognitivo.
	duplicação	17q22	54,267,157	54,436,237	169,081	?	ANKFN1					
<p>Cr. 3: deleção sem CNVs relevantes na DGV; gene, <i>Fibroblast growth factor 12</i>, sem associação a patologia, mas expresso no cérebro; paciente da base DECIPHER [277871] sobreponível ao gene e com déficit intelectual. Face às evidências familiares poderá ser causal. Cr. 17: duplicação com apenas um gene sem descrição na OMIM.</p>												
SM30/11	duplicação	4p14	39,233,753	39,540,174	306,422	materna	9					[F] Dificuldades de aprendizagem (presente em ambos os progenitores); epilepsia; macrossomia com peso e estatura elevados; Síndrome de <i>Waardenburg</i> de herança paterna (surdez neurosensorial, heterocromia da íris).
			6	WDR19 (#608151)	LIAS (#607031)							
Sem CNVs totalmente sobreponíveis na DGV; os genes envolvidos associados a patologia têm uma transmissão autossômica recessiva. Face às evidências em ambos os progenitores não é possível prever a sua causalidade.												
M952/10	deleção	4q13.3	71,162,798	71,283,216	120,419	paterna	4					[M] Atrazo global do desenvolvimento (QD 65); PHDA; manchas hipopigmentadas. Pai com dificuldades de aprendizagem.
							2					
<p>Algumas CNVs reportadas na DGV, duas totalmente sobreponíveis; os genes envolvidos (SMR3B #611593; PROL1 #608936) não estão associados a patologia. Na base DECIPHER dois pacientes [#256067, #263571] com CNVs envolvendo os mesmos genes, herança de progenitor normal, mas sem descrição de fenótipo. O fenótipo paterno não nos permite concluir.</p>												
SM40/11	duplicação	5q22.3q23.1	115,089,842	115,508,388	418,547	paterna	6					[M] ADPM, patologia do comportamento, distormorfismos, manchas cutâneas, má progressão estado-ponderal, macrocefalia. Pai sem manifestações. Diagnóstico Neurofibromatose (mutação dominante no gene <i>NF1</i>).
							4					
Novo diagnóstico justifica quadro clínico. Não causal.												
M930/10	duplicação	6q26	163,587,544	163,804,110	216,567	paterna	3					[M] Déficit cognitivo não síndromico, PHDA,

Tabela IV (continuação)

								PACRG (#608427)	crescimento normal, sem distúrbios.
Região sem CNVs reportadas na DGV; o gene <i>PACRG</i> não apresenta patologia descrita associada. Pai com baixo nível de escolaridade, mas não apresenta os problemas do filho.									
M1007/10	deleção	7p22.33	65,558	2,160,385	2,094,828	materna		32 [14 OMIM]: FAM20C (#611061) HEATR2 (#614864) MAD11I (#602686)	[M] QD global de 77, surdez congênita, distúrbios familiares.
	duplicação	11q13.5	75,759,501	76,785,130	1,025,630	de novo		12 [8 OMIM]	
Sem CNVs sobreponíveis na DGV; Cr.7 : os genes associados a patologia não são relevantes no caso de hemizigotia e/ou as manifestações estão excluídas pelo quadro clínico; Cr. 11 : gene CAPNS (1º exão) associado a uma retinopatia (MIM# 193235) de transmissão autossômica dominante, não estão referidas queixas oftalmológicas.									
M929/10	deleção	7p21.2p15.3	19,761,586	23,030,768	3,269,183	paterna		22 [11 OMIM] DNAH11 (#603339) IL6 (#147620) FAM126A (#610531)	[M] ADPM muito grave, hipoplasia do vermis, sem distúrbios; epilepsia; PHDA. Ambos os progenitores com atraso ligeiro, mais acentuado no pai, não apresenta um quadro grave como o filho.
	Sem CNVs na DGV; os genes envolvidos associados a patologia apresentam uma transmissão autossômica recessiva ou mutações que conferem susceptibilidade a patologias não relacionados com esta situação clínica; o gene <i>FAM126A</i> está associado a uma Leucodistrofia Hípmielinizante (MIM#610532), o que foi excluído pela RMN. Face ao contexto familiar não podemos excluir a sua patogenicidade.								
M118/11	deleção	8q21.3	88,321,948	88,395,053	73,106	paterna		1 0	[M] ADPM ligeiro; déficit visual, nistagmo e ambliopia; CIA; múltiplas alergias. <i>Facies</i> muito semelhante ao pai.
	Região coberta por raras CNVs em deleção; gene não descrito na base OMIM. Pai sem os problemas do filho, provavelmente não causal.								
M902/10	deleção	8q22.2	100,127,962	100,312,706	184,745	?		COH1 (#607817) exões 8-19	[M] Hipotonia neonatal; microcefalia pós-natal com braquicefalia; baixa estatura; atraso grave do desenvolvimento; neutropenia; pés aducidos; clinodactilia dos 3º, 4º e 5º dedos dos pés; assimetria da face; ptose palpebral à direita; sulco nasolabial curto; lábio superior evertido, mamilos afastados.
	O probando não apresenta fenótipo de <i>Cohen</i> , é uma síndrome de herança autossômica recessiva que por vezes apresenta heterozigotia composta (diferentes mutações ou um alelo com deleção e outro com mutação).								
								Apenas SCI	Apenas SCI

M1013/10	duplicação	9q22.3	95,685,000	96,221,327	536,328	paterna	9	3 OMIM	[M] ADPM, história pré-natal com restrição do crescimento intra-uterino, hemiparesia do membro superior direito aos 10 meses; epilepsia controlada; displasia cerebral do tipo polimicrogiria, surdez neurosensorial. Pai saudável.
	deleção	21q21.1	23,498,838	23,968,548	469,711		0		
Cr:9: não coberta por CNVs reportadas na DGV, os genes envolvidos (<i>NINJ1</i> #602062; <i>WNK2</i> #606249; <i>FAM120A</i> #612265) não estão reportados associados a patologia. Cr21: raras CNVs na DGV parcialmente sobreponíveis, mas sem genes descritos. Progenitor portador sem manifestações.									
M154/11	duplicação	10p15.3	1,161,116	1,665,741	504,626	materna	4	ADARB2 (#602065)	[F] QI global de 58 (WISC III); baixa estatura proporcionada (presente na mãe); CIV com estenose aórtica; nariz comprido de base larga; <i>pectus carinatum</i> e <i>excavatum</i> (presente na mãe); braquidactilia e clinodactilia. Mãe com dificuldades escolares.
Região não coberta por CNVs reportadas na DGV. O gene <i>Double-stranded RNA-specific editase B2</i> tem uma expressão específica do cérebro, mas não está reportada patologia associada. Dois pacientes descritos na DECIPHER [287723, 284696] cobrindo o mesmo gene, um deles com autismo e o outro com déficit intelectual moderado. Atendendo à história materna não podemos excluir a sua patogenicidade.									
M986/10	duplicação	10q26.13q26.2	127,218,414	127,516,186	297,773	paterna	10	3 OMIM	[M] ADPM ligeiro, microcefalia, pavilhões auriculares displásicos, dismorfismos craniofaciais sugestivos de disostose mandibulofacial; baixa estatura; estenose esofágica congénita. Pai sem alterações fenotípicas.
		10q26.2	128,893,320	129,157,117	263,798		2	1 OMIM	
Regiões pouco cobertas por CNVs reportadas na DGV, os genes <i>MMP21</i> (#608416), <i>BCCIP</i> (#611883); <i>DOCK1</i> (#601403) não se encontram associados a patologia, o gene <i>UROS</i> (#606938) está associado a uma doença de transmissão autossômica recessiva. O progenitor não apresenta manifestações fenotípicas.									
M931/10	duplicação	11p15.1p14.3	20,985,806	24,165,720	3,179,915	paterna	9		[M] QI global 92 (verbal 66, realização 65); epilepsia; PHDA; estatura no percentil 95 e OFC no percentil 90. Pai sem dificuldades na escola.
							5		
Região não coberta por CNVs reportadas na DGV. Dos genes envolvidos, <i>NELL1</i> (#602319), <i>ANOS1</i> (#608662), <i>SLC17A6</i> (#607563), <i>FANCF</i> (#613897), <i>GAS2</i> (#602835), dois deles têm patologias associadas sem significado no contexto do desequilíbrio envolvido e clínica. No contexto da herança paterna esta CNV não aparenta ter efeito patogénico.									
M150/11	duplicação	12q21.31	81,188,494	81,931,441	742,948	paterna	7	3 OMIM	[M] ADPM ligeiro, dificuldades de aprendizagem; autismo; sem dismorfismos. Progenitores e irmão sem manifestações.
Sem CNVs reportadas na DGV. Os genes envolvidos <i>LIN7A</i> (#603380), <i>ACSS3</i> (#614356), <i>PPFIA2</i> (#603143) não estão descritos associados a									

Tabela IV (continuação)

patologia.									
M102/11	deleção	13q21.2	60,524,322	60,724,973	200,652	materna	3 DIAPH3 (#614567)	[F] ADPM moderado, dismorfismos inespecíficos; sem manifestações auditivas no probando e mãe.	
Sem CNVs na DGV totalmente sobreponíveis. Inclui gene associado a neuropatia auditiva de transmissão autossômica dominante (MIM#609129), no entanto tanto a probando como a progenitora não apresentaram queixas auditivas. Progenitores sem outro tipo de manifestações fenotípicas.									
M944/10	deleção	14q23.3	67,276,324	67,379,403	103,080	paterna	GPHN (#603930) exões 4-5	[M] ADPM, microcefalia pós-natal; estrabismo; atrofia cortico-subcortical; 3 episódios de convulsões generalizadas associadas a febre (~7 anos); EEG com actividade paroxística generalizada; <i>food craving</i> e obesidade.	
Região coberta por raras CNVs reportadas na DGV. O gene <i>GPHN</i> está associado a uma doença de transmissão autossômica recessiva (MIM#615504), no entanto face à clínica e a um estudo recentemente reportado com microdeleções em hemizigotia cobrindo os mesmos exões [Lionel <i>et al.</i> , 2013] e expressão variável mas sobreponível, a causalidade desta CNV não pode ser excluída.									
M917/10	deleção	16p13.2p13.13	10,285,186	10,577,181	291,996	materna	ATF7IP2 (#613645)	[M] ADPM global ligeiro; macrocefalia, peso e estatura também elevados; hipertelorismo, face triangular. Mãe sem manifestações fenotípicas.	
Apenas duas CNVs parcialmente sobreponíveis na DGV, cobrindo o gene envolvido. Este não se encontra reportado em associação a patologia, face à herança é pouco provável ser patogénica.									
M702/10	duplicação	17q12	37,288,416	37,999,699	711,284	de novo	18 [16 OMIM] TCAP1 (#604488) PGAP3 (#611801) ERBB2 (#164870)	ADPM, micrognatia, pavilhões auriculares descolados, má progressão ponderal; suspeita de epilepsia, esteriótipias, PHDA; discreta atrofia subcortical sem lesão estrutural ou displasia; miopia e estrabismo,	
Região não coberta por CNVs reportadas na DGV: três dos genes associados a patologia não parecem relevantes em sobre-expressão, mas o gene <i>PMMT</i> está reportado com possível associação à hipertensão (MIM#145500), codifica uma enzima que catalisa a síntese de epinefrina.									
M264/11	deleção	19q13.32	47,679,132	47,728,988	49,857	de novo	SAE1 (#613294) BBC3 (#605854)	[M] Aos 4 anos perfil de <i>Growing Skills</i> II). Dificuldades de aprendizagem, atraso na linguagem; hipotónico; esteriótipias das mãos, Síndrome de Asperger.	
Raras CNVs na DGV, genes sem referência de associação a patologia. Alteração <i>de novo</i> , não é possível prever a sua patogénica.									
							Apenas SCI	Apenas SCI	

M215/11	duplicação	21q21.2q21.3	26,413,536	26,975,984	562,449	paterna	6	[M] ADPM grave; hipermetropia; aplasia da cútis na região parietal esquerda, atrofia corticossupratentorial nesse hemisfério; encefalopatia epiléptica. Pai com muitas dificuldades de aprendizagem.
							MIR155 (#609337) MRPL3 (#611845)	
Sem CNVs reportadas na DGV, genes envolvidos sem associação a patologia. Um deles é uma proteína mitocondrial ribossomal, estando envolvido no ponto de quebra mais distal. Herança paterna não nos permite excluir a sua patogenicidade.								
M1010/10	deleção	22q11.21	18,894,835	19,010,508	115,674	paterna	5	[M] ADPM grave; antecedente pré-natal de higroma quístico; parâmetros de crescimento no percentil 10; braquicefalia; pavilhões auriculares grandes, fendas palpebrais oblíquas para baixo, lábios grossos e invertidos; hénia inguinal bilateral operada, obstipação grave; nível de prolina normal. Pai sem referência a alterações.
							DGCR6 (#601279), PRODH (#606810)	
CNV dentro de um região muito variável, a flanquear a região crítica 22q11. O gene <i>PRODH</i> está associado a patologia, de transmissão autossômica recessiva, que se manifesta por níveis de prolina elevados(MIM#239500). Este gene representa também um locus associado a susceptibilidade à esquizofrenia (MIM#600850).								
M942/10	duplicação	22q11.21	18894835	18999862	105,028	?	3	[M] ADPM grave, alterações do comportamento sem dismorfismos, atraso na mielinização do sistema nervoso central, estudo metabólico com nível de prolina normal. Pais co-sanguíneos.
							DGCR6 (#601279), PRODH (#606810)	
CNV sobreponível e cobrindo os mesmos genes da anterior. A associação à susceptibilidade à esquizofrenia (MIM#600850) está mais relacionada com deleção. Não é possível tirar conclusões em termos familiares, a co-sanguinidade agrava a probabilidade de manifestação de patologia autossômica recessiva.								
M184/11	duplicação	Xp22.31	6,489,877	8,131,810	1,641,934	materna	6	[M] QI global de 74 (teste WISC III), DA generalizadas, PHDA, manchas hipocrômicas. Mãe tem estudo de inativação do X com desvio, irmão (tio) com DA.
							4	
Algumas CNVs em duplicação na DGV; inclui os genes <i>HDHD1</i> (#306480), STS (#300747), <i>VCX</i> (#300229), <i>PNPLA4</i> (#300102); vários pacientes na DECIPHER e reportados na literatura, sendo no entanto controversa a patogenicidade desta CNV uma vez que apresenta penetrância muito incompleta [Faletra <i>et al.</i> , 2012; Esplin <i>et al.</i> , 2014], para além de neste caso o probando ser do sexo masculino e a herança materna.								
Provavelmente Patogénica								

Tabela IV (continuação)

M246/11	duplicação	Xq13.3	74,466,891	74,649,810	182,920	materna	UPRT (#300656) ZDHHCT5 (#300576)	[F] ADPM, cardiopatia, voz rouca, cabelo espesso e encaracolado. Sem informação clínica sobre os progenitores.
<p>Região coberta por 3 CNVs da DGV. O gene <i>ZDHHCT5</i> está associado a déficit cognitivo (MIM#300577), por quebra na sequência do gene (tal como acontece nesta paciente) e reflexo na sua expressão, um paciente do sexo masculino reportado na DECIPHER [268040] tem uma CNV semelhante e apresenta DI e autismo. Importante padrão de inativação.</p>								
<p>CIA comunicação interauricular; CIV comunicação interventricular; Cr. Cromossoma; Herança (?) sem estudo de um dos progenitores; EEG electroencefalograma; OFC <i>occipitofrontal</i> <i>circunferença</i>.</p>								
Provavelmente Patogénica								

Uma atenção especial deve ser tida no caso das CNVs ligadas ao cromossoma X. Quando uma CNV envolvendo o cromossoma X num probando do sexo masculino é transmitida pela mãe, portadora sem manifestações, é preciso ter sempre presente a hemizigotia no caso masculino. Os estudos de inativação do cromossoma X poderão ser informativos, não esquecendo que nem todas as CNVs do X escapam à inativação nas portadoras. Poderá também ser informativo estudar outros familiares do sexo masculino na família materna.

Também no caso de uma CNV ser *de novo* no probando isso apenas constitui evidência de patogenicidade se o conteúdo génico assim o comprovar, caso contrário poderá ser uma CNV benigna rara ainda não reportada com frequência nas bases de dados como a DGV.

CNVs de SCI – sub-classificação

Nos 34 pacientes observaram-se 39 CNVs de SCI, uma vez que cinco pacientes são portadores de duas CNVs de SCI e adicionalmente três CNVs em pacientes também portadores de uma CNV patogénica. Verificou-se um total de 42 CNVs de SCI. Destas apenas foi possível sub-classificar quatro delas como provavelmente patogénicas e três como provavelmente benignas, 35 permaneceram apenas de SCI.

3.4 Conclusão

Dos 147 pacientes com distúrbios do neurodesenvolvimento e/ou MC analisados por oligo array-CGH, seis deles tinham um diagnóstico prévio pela citogenética convencional e/ou molecular. Nestes os rearranjos foram caracterizados a nível genómico, alguns re-classificados: de duplicação para triplicação (SM75/07), de duplicação para inserção (SM2/10); ou revelou-se um desequilíbrio adicional com impacto no fenótipo: uma síndrome de microdeleção (SM69/10) ou uma microdeleção associada a uma inversão (M444/11). Em 141 pacientes não existia um diagnóstico de causa etiológica. Nestes, 85 pacientes apenas apresentaram CNVs benignas ou polimórficas (60,3%), 22 revelaram uma CNV classificada como patogénica (15,6%) e à qual foi atribuída a causalidade do quadro clínico. Em 34 pacientes apenas se observaram CNVs de SCI (24,1%).

3.5 Referências

Fontes da Web

Database of Genomic Variants (DGV), <http://dgv.tcag.ca/>

DECIPHER, <https://decipher.sanger.ac.uk/>

OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>

Referências

Barber JC, Thomas NS, Collinson MN, Dennis NR, Liehr T, Weise A, Belitz B, Pfeiffer L, Kirchhoff M, Krag-Olsen B, Lundsteen C. 2005. Segmental haplosufficiency: transmitted deletions of 2p12 include a pancreatic regeneration gene cluster and have no apparent phenotypic consequences. *Eur J Hum Genet* 13:283-291.

Barber JC, Maloney VK, Huang S, Bunyan DJ, Cresswell L, Kinning E, Benson A, Cheetham T, Wyllie J, Lynch SA, Zwolinski S, Prescott L, Crow Y, Morgan R, Hobson E. 2008. 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. *Eur J Hum Genet* 16:18-27.

Beleza-Meireles A, Matoso E, Ramos L, Melo JB, Carreira IM, Silva ED, Saraiva JM. 2013. Cryptic 7q36.2q36.3 deletion causes multiple congenital eye anomalies and craniofacial dysmorphism. *Am J Med Genet A* 161A:589-593.

Belligni EF, Di Gregorio E, Biamino E, Calcia A, Molinatto C, Talarico F, Ferrero GB, Brusco A, Silengo MC. 2012. 790 Kb microduplication in chromosome band 17p13.1 associated with intellectual disability, afebrile seizures, dysmorphic features, diabetes, and hypothyroidism. *Eur J Med Genet* 55:222-224.

Bill BR, Lowe JK, DyBuncio CT, Fogel BL. 2013. Orchestration of neurodevelopment programs by RBFOX1: implications for autism spectrum disorder. *Int Rev Neurobiol* 113:251-267.

Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG. 2011. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet* 130:517-528.

Calvari V, Bertini V, De Grandi A, Peverali G, Zuffardi O, Ferguson-Smith M, Knudtzon J, Camerino G, Borsani G, Guioli S. 2000. A new submicroscopic deletion that refines the 9p region for sex reversal. *Genomics* 65:203-212.

- Carreira IM, Melo JB, Rodrigues C, Backx L, Vermeesch J, Weise A, Kosyakova N, Oliveira G, Matoso E. 2009. Molecular cytogenetic characterisation of a mosaic add(12)(p13.3) with an inv dup(3)(q26.31 --> qter) detected in an autistic boy. *Mol Cytogenet* 2:16.
- Coutton C, Devillard F, Vieville G, Amblard F, Lopez G, Jouk PS, Satre V. 2012. 17p13.1 microduplication in a boy with Silver-Russell syndrome features and intellectual disability. *Am J Med Genet A* 158A:2564-2570.
- Esplin ED, Li B, Slavotinek A, Novelli A, Battaglia A, Clark R, Curry C, Hudgins L. 2014. Nine patients with Xp22.31 microduplication, cognitive deficits, seizures, and talipes anomalies. *Am J Med Genet A* 164:2097-2103.
- Faletta F, D'Adamo AP, Santa Rocca M, Carrozzi M, Perrone MD, Pecile V, Gasparini P. 2012. Does the 1.5 Mb microduplication in chromosome band Xp22.31 have a pathogenetic role? New contribution and a review of the literature. *Am J Med Genet A* 158A:461-464.
- Ferreira SI, Matoso E, Venâncio M, Saraiva J, Melo JB, Carreira IM. 2012. Critical region in 2q31.2q32.3 deletion syndrome: Report of two phenotypically distinct patients, one with an additional deletion in Alagille syndrome region. *Mol Cytogenet* 5:25.
- Fryssira H, Makrythanasis P, Kattamis A, Stokidis K, Menten B, Kosaki K, Willems P, Kanavakis E. 2011. Severe Developmental Delay in a Patient with 7p21.1-p14.3 Microdeletion Spanning the TWIST Gene and the HOXA Gene Cluster. *Mol Syndromol* 2:45-49.
- ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Nomenclature, ISCHC. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. Switzerland: S. Karger AG.
- Hauge X, Raca G, Cooper S, May K, Spiro R, Adam M, Martin CL. 2008. Detailed characterization of, and clinical correlations in, 10 patients with distal deletions of chromosome 9p. *Genet Med* 10:599-611.
- Hoppman-Chaney N, Wain K, Seger PR, Superneau DW, Hodge JC. 2013. Identification of single gene deletions at 15q13.3: further evidence that CHRNA7 causes the 15q13.3 microdeletion syndrome phenotype. *Clin Genet* 83:345-351.
- Krepischi-Santos AC, Rajan D, Temple IK, Shrubbs V, Crolla JA, Huang S, Beal S, Otto PA, Carter NP, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C. 2009. Constitutional haploinsufficiency of tumor suppressor genes in mentally retarded patients with microdeletions in 17p13.1. *Cytogenet Genome Res* 125:1-7.
- Ledig S, Hiort O, Wu"nsch L, Wieacker P. 2012. Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *Eur J Endocrinol* 167:119–124.
- Le Tanno P, Poreau B, Devillard F, Vieville G, Amblard F, Jouk PS, Satre V, Coutton C. 2014. Maternal complex chromosomal rearrangement leads to TCF12 microdeletion in a patient presenting with coronal craniosynostosis and intellectual disability. *Am J Med Genet* 164A:1530-1536.

Lionel AC, Vaags AK, Sato D, Gazzellone MJ, Mitchell EB, Chen HY, Costain G, Walker S, Egger G, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Prasad A, Anagnostou E, Fombonne E, Zwaigenbaum L, Roberts W, Szatmari P, Fernandez BA, Georgieva L, Brzustowicz LM, Roetzer K, Kaschnitz W, Vincent JB, Windpassinger C, Marshall CR, Trifiletti RR, Kirmani S, Kirov G, Petek E, Hodge JC, Bassett AS, Scherer SW. 2013. Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum Mol Genet* 22:2055-2066.

Mansouri MR, Marklund L, Gustavsson P, Davey E, Carlsson B, Larsson C, White I, Gustavson KH, Dahl N. 2005. Loss of ZDHHC15 expression in a woman with a balanced translocation t(X;15)(q13.3;cen) and severe mental retardation. *Eur J Hum Genet* 13:970-977.

Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A, Castelo TM, Weise A, Carreira IM. 2013. Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the EPHA5 gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet A* 161A:1923-1928.

Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D, Collins A, Mercer C, Norga K, de Ravel T, Devriendt K, Bongers EM, de Leeuw N, Reardon W, Gimelli S, Bena F, Hennekam RC, Male A, Gaunt L, Clayton-Smith J, Simoncic I, Park SM, Mehta SG, Nik-Zainal S, Woods CG, Firth HV, Parkin G, Fichera M, Reitano S, Lo Giudice M, Li KE, Casuga I, Broome A, Conrad B, Schwerzmann M, Räber L, Gallati S, Striano P, Coppola A, Tolmie JL, Tobias ES, Lilley C, Armengol L, Spyschaert Y, Verloo P, De Coene A, Goossens L, Mortier G, Speleman F, van Binsbergen E, Nelen MR, Hochstenbach R, Poot M, Gallagher L, Gill M, McClellan J, King MC, Regan R, Skinner C, Stevenson RE, Antonarakis SE, Chen C, Estivill X, Menten B, Gimelli G, Gribble S, Schwartz S, Sutcliffe JS, Walsh T, Knight SJ, Sebat J, Romano C, Schwartz CE, Veltman JA, de Vries BB, Vermeesch JR, Barber JC, Willatt L, Tassabehji M, Eichler EE. 2008. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 359:1685-1699.

Oliveira R, Dória S, Madureira C, Lima V, Almeida C, Pinho MJ, Ramalho C, Matoso E, Barros A, Carreira IM, Moura CP. 2013. Inv21p12q22del21q22 and intellectual disability. *Gene* 517:120-124.

Rajakulendran S, Roberts J, Koltzenburg M, Hanna MG, Stewart H. 2013. Deletion of chromosome 12q21 affecting KCNC2 and ATXN7L3B in a family with neurodevelopmental delay and ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:1255-1257.

Rosenfeld JA, Traylor RN, Schaefer GB, McPherson EW, Ballif BC, Klopocki E, Mundlos S, Shaffer LG, Aylsworth AS; 1q21.1 Study Group. 2012. Proximal microdeletions and microduplications of 1q21.1 contribute to variable abnormal phenotypes. *Eur J Hum Genet* 20:754-761.

Schwarzbraun T, Obenauf A C, Langmann A, Gruber-Sedlmayr U, Wagner K, Speicher MR, Kroisel P M. 2009. Predictive diagnosis of the cancer prone Li-Fraumeni syndrome by accident: new challenges through whole genome array testing. *J Med Genet* 46: 341-344.

Shchelochkov OA, Cheung SW, Lupski JR. 2010. Genomic and clinical characteristics of microduplications in chromosome 17. *Am J Med Genet A* 152:1101-1110.

South ST, Rope AF, Lamb AN, Aston E, Glaus N, Whitby H, Maxwell T, Zhu XL, Brothman AR. 2008. Expansion in size of a terminal deletion: a paradigm shift for parental follow-up studies. *J Med Genet* 45:391-395.

Szafranski P, Schaaf CP, Person RE, Gibson IB, Xia Z, Mahadevan S, Wiszniewska J, Bacino CA, Lalani S, Potocki L, Kang SH, Patel A, Cheung SW, Probst FJ, Graham BH, Shinawi M, Beaudet AL, Stankiewicz P. 2010. Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving CHRNA7: benign or pathological? *Hum Mutat* 31:840-850.

Swinkels ME, Simons A, Smeets DF, Vissers LE, Veltman JA, Pfundt R, de Vries BB, Faas BH, Schrandt-Stumpel CT, McCann E, Sweeney E, May P, Draaisma JM, Knoers NV, van Kessel AG, van Ravenswaaij-Arts CM. 2008. Clinical and cytogenetic characterization of 13 Dutch patients with deletion 9p syndrome: Delineation of the critical region for a consensus phenotype. *Am J Med Genet A* 146A:1430-438.

Takenouchi T, Hashida N, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. 2014. 1p34.3 deletion involving GRIK3: Further clinical implication of GRIK family glutamate receptors in the pathogenesis of developmental delay. *Am J Med Genet A* 164A:456-460

Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B, Destrée A, Maystadt I, Männik K, Kurg A, Reimand T, McMullan D, Oley C, Brueton L, Bongers EM, van Bon BW, Pfund R, Jacquemont S, Ferrarini A, Martinet D, Schrandt-Stumpel C, Stegmann AP, Frints SG, de Vries BB, Ceulemans B, Kooy RF. 2009. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet* 52:94-100.

Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, Keinanen M, McDonald-McGinn D, Somer M, Spinner N, Yang-Feng T, Zackai E, Altherr MR. 1997. A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf–Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 6:317–324.

Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, Butte C, Memo L, Capovilla G, Neri G. 2003. Mapping the Wolf–Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet* 72:590–597.

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas

4.1 Conclusões gerais

O grupo de estudo deste trabalho fez parte da fase de implementação da técnica de array-CGH em diagnóstico pós-natal no LCG-FMUC. Numa fase inicial foram utilizados como controlos positivos amostras de pacientes com desequilíbrios cromossómicos microscópicos em que era necessária uma caracterização do rearranjo envolvido, não só para uma melhor correlação genótipo-fenótipo, como para o cálculo do risco de recorrência com vista a um aconselhamento genético mais preciso. Simultaneamente realizou-se também a pesquisa de desequilíbrios submicroscópicos em pacientes com DI e/ou MC, já com um estudo citogenético e/ou outras pesquisas moleculares com resultados normais e portanto sem um diagnóstico etiológico. Progressivamente a técnica de array-CGH começou a ser o teste de primeira linha a aplicar aos pacientes com DI, PEA e/ou MC, passando a citogenética convencional e molecular para uma segunda fase em casos específicos onde pelo(s) desequilíbrio(s) envolvido(s) se poderia suspeitar de um rearranjo estrutural transmitido por um progenitor.

Neste grupo de estudo a técnica de array-CGH, utilizando uma plataforma de oligonucleótidos 180 k, revelou uma incidência de CNVs patogénicas em 15,6 % dos pacientes com DI, PEA e/ou MC sem outro diagnóstico etiológico. Em cerca de 24 % dos pacientes apenas se identificaram CNVs às quais não foi possível atribuir nem a causalidade do fenótipo nem classificá-las como benignas, permanecendo de SCI. Destas em 4 pacientes (2,8 %) foi possível classificá-las como provavelmente patogénicas, o que contribuiria para a identificação de um desequilíbrio genómico causal em 18,4 % dos pacientes. De entre as CNVs patogénicas e submicroscópicas identificadas, 50% correspondem a síndromes de microdeleção/microduplicação já estabelecidas, mas que apresentam um expressão fenotípica variável, no caso das duplicações porque apresentam um fenótipo mais ligeiro e menos identificável, nomeadamente na síndrome de duplicação 7q11.23, ou por serem síndromes que apresentam penetrância incompleta e expressão variável (regiões: 1q21.1, 15q11.2). Seria assim difícil haver uma orientação clínica prévia para pesquisa destas CNVs. No caso das CNVs de maior extensão entre 3-4.9 Mb, verificou-se revisitando a citogenética que não era possível diagnosticá-las por não se observar alteração no padrão de bandas e muitas delas representarem uma diminuição imperceptível de

uma banda clara ou escura (padrão GTG), apenas numa deleção (Tabela II, SM62/11) houve uma dúvida persistente na citogenética, na região 7(p13), que levou à pesquisa por array e que de outro modo não era possível diagnosticar inequivocamente. Todas as CNVs com identificação prévia pela citogenética seriam identificáveis se se começasse pelo array, no entanto em três casos: na inserção (SM2/10), no mosaico (SM75/07) e na inversão (M444/11), seria necessário complementar o estudo com citogenética convencional e/ou FISH para caracterização do rearranjo cromossómico envolvido.

4.2 Array-CGH como teste de primeira linha – benefícios e limitações

Uma vez que a técnica de array apresenta uma taxa de detecção de desequilíbrios genómicos global superior à citogenética convencional e molecular (FISH e MLPA) em conjunto, faz sentido e será mais rentável que quando não existe uma suspeita clínica específica, que direcione a pesquisa de uma síndrome ou mutação, se comece pela array-CGH pela sua resolução e por permitir um *screening* global de todo o genoma. De qualquer forma é preciso não esquecer que para além da interpretação da patogenicidade de uma CNV é muito importante equacionar os rearranjos possíveis que podem estar na origem de um desequilíbrio genómico. Para além de uma variação no número de cópias uma CNV pode envolver um rearranjo, que só a citogenética convencional e ou a FISH poderão esclarecer, permitir o diagnóstico de portadores equilibrados, determinar o risco de recorrência assim como identificar familiares de risco. Se é fácil concluir que na origem de uma duplicação e deleção terminais pode estar o derivativo de uma translocação ou um recombinante de uma inversão, consoante estão envolvidos cromossomas não homólogos ou o mesmo cromossoma, já é muito difícil suspeitar se na origem de uma deleção ou de uma duplicação intersticiais pode estar o derivativo de uma inserção, só mesmo a FISH ou a citogenética (dependendo do tamanho e localização da CNV) poderão dar a resposta. Também os mosaicos de baixa expressão assim como os cromossomas marcadores que incluem muitas vezes regiões pericentroméricas geralmente pouco cobertas pelas sondas incluídas no array, podem passar indetectáveis.

As plataformas de SNPs permitem ainda a detecção de LOH, que poderá resultar de uma deleção ou de dissomia uniparental que, em algumas regiões do genoma que sofrem o mecanismo de *imprinting*, está associada a síndromes como o de Prader-Willi e Angelman ou de Silver-Russel. Com um array de SNPs é ainda possível distinguir entre heterodissomia e isodissomia se os pais também forem analisados e ainda determinar a origem parental de uma deleção. No entanto, a aplicação de diferentes plataformas de array tem conduzido a resultados semelhantes, embora dependendo dos critérios de selecção dos pacientes, a prevalência de CNVs consideradas causais varia entre 5-20 % [Koolen *et al.*, 2009; Veltman, 2006; Knight e Regan 2006]. Nas novas síndromes estabelecidas, após a utilização da array-CGH, a identificação de genótipos sobreponíveis é que conduziu ao estabelecer de um quadro clínico comum, inversamente ao que sucedeu nas primeiras síndromes [revisto em Vissers *et al.*, 2009]. Para além da detecção de novas CNVs recorrentes e não recorrentes, a genómica tem permitido ainda a identificação de genes responsáveis por algumas síndromes, em que a causa genética era pouco clara, pela sobreposição dos seus genótipos e a tentativa de encontrar regiões críticas mínimas por vezes limitadas a porções intragénicas e permitindo definir genes candidatos que se vêm a revelar de causa monogénica, de que é exemplo a Síndrome de CHARGE (MIM#214800). É assim muitas vezes imprevisível dizer se uma síndrome resulta de um distúrbio monogénico, de um conjunto de genes contíguos ou de uma combinação de factores genómicos. Com base no algoritmo proposto (2.3.6), é muito importante que nos pacientes em que não foi encontrada uma causa etiológica e que apresentaram CNVs de SCI, seja realizada uma nova avaliação (periódica) destas alterações quanto ao seu conteúdo génico e pacientes semelhantes reportados, com recurso às bases de dados UCSC Genome Browser, OMIM, ISCA, DGV, DECIPHER e pesquisa na PubMed. É ainda essencial que o laboratório tenha acesso não só a histórias clínicas detalhadas, para uma interpretação mais correta e melhor correlação do genótipo com o fenótipo, assim como a uma discussão conjunta com os geneticistas clínicos. Esta estratégia de colaboração poderia clarificar e facilitar a interpretação de muitas CNVs que permanecem de SCI e resultar num melhor acompanhamento dos pacientes e familiares de risco.

4.3 Perspectivas com as novas técnicas de sequenciação massiva

Surgem entretanto novas tecnologias que permitem a detecção de mutações no genoma ao nível do par de nucleótidos, estas novas tecnologias de sequenciação do genoma são denominadas globalmente por *Next Generation Sequencing* (NGS). A sequenciação massiva engloba métodos denominados de *shotgun sequencing*, não baseados no método de Sanger, em que o genoma é fragmentado em pequenos pedaços de DNA que são sequenciados em paralelo. Os fragmentos sequenciados são depois comparados com um genoma de referência sendo possível detectar tanto mutações pontuais de apenas um nucleótido como alterações estruturais [revisado em Vissers *et al.*, 2009]. Estas tecnologias permitem não só detectar alterações desequilibradas como rearranjos estruturais equilibrados nomeadamente translocações e inversões. Existem três níveis principais de análise, que correspondem também a graus de complexidade progressivamente mais elevada, que podem ser realizadas através da NGS: (1) painéis com grupos de genes para uma determinada patologia, (2) a sequenciação do exoma e a (3) sequenciação do genoma. Todas estas estratégias têm vantagens sobre o método de sequenciação de Sanger, pela sua capacidade de sequenciação massiva e em todas elas se levantam desafios na interpretação clínica dos seus resultados. No caso dos painéis direccionados a uma patologia, permitem uma grande cobertura para um pequeno número de genes apresentando grande sensibilidade e especificidade. A sequenciação do exoma cobre as regiões codificantes do genoma (~1–2%), abrangendo aproximadamente 85% das mutações conhecidas associadas a patologia. Esta metodologia é aplicada para detectar variantes em genes conhecidos associados a patologia assim como para descobrir novos genes candidatos. A sensibilidade analítica deste método, pela sua cobertura pouco uniforme, é mais baixa existindo exões com pouca cobertura associados a patologia podendo levar a falsos negativos ou positivos. O método de Sanger é muitas vezes utilizado para cobrir estes *gaps* em regiões de fraca cobertura, sendo praticável no caso dos painéis direccionados, mas no caso da sequenciação do exoma torna-se muito dispendioso e impraticável. Na sequenciação de todo o genoma, codificante e não codificante, a sua análise levanta grandes desafios e constitui o método mais dispendioso [Rehm *et al.*, 2013].

As técnicas de NGS irão eventualmente substituir a array-CGH no diagnóstico dos distúrbios do neurodesenvolvimento e MC. Sequenciar todo o genoma é exequível, em poucos anos será financeiramente comportável e talvez mais aplicável em larga escala, mas será necessária a participação de bioinformáticos para o tornar possível. A interpretação do grande número de novas variantes que serão identificadas será um desafio enorme para cientistas e clínicos. Deverão existir estratégias concertadas entre o laboratório e a clínica dentro da área de genética, de modo a que seja feita a melhor gestão possível dos recursos existentes com o melhor benefício para os pacientes. A introdução das novas tecnologias de sequenciação massiva no diagnóstico deverá ser realizada por centros de referência, com larga experiência na área da citogenética e genómica cumprindo as normas internacionais.

4.4 Referências

Fontes da Web

DECIPHER, <https://decipher.sanger.ac.uk/>

DGV, <http://dgv.tcag.ca/>

ISCA, <https://www.iscaconsortium.org/>

OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>

Referências

Knight SJ, Regan R. 2006. Idiopathic learning disability and genome imbalance. *Cytogenet Genome Res* 115:215-224.

Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG, Geurts van Kessel A, Veltman JA, de Vries BB. 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat* 30:283-292.

Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. 2013. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 15:7337-7347.

Veltman JA. 2006. Genomic microarrays in clinical diagnosis. *Curr Opin Pediatr* 18:598-603.

Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. 2010. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet* 47:289-297.