

ANA CAROLINE GABRIEL GONÇALVES

**ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES COM HIPÓTESE DIAGNÓSTICA DE
SÍNDROME DE SILVER-RUSSELL**

BRASÍLIA

2020

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

ANA CAROLINE GABRIEL GONÇALVES

**ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES COM HIPÓTESE DIAGNÓSTICA DE
SÍNDROME DE SILVER-RUSSELL**

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

Orientadora: Juliana Forte Mazzeu de Araújo

BRASÍLIA

2020

ANA CAROLINE GABRIEL GONÇALVES

**ESTUDO GENÉTICO DE PACIENTES COM HIPÓTESE DIAGNÓSTICA DE
SÍNDROME DE SILVER-RUSSELL**

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

Aprovada em 14 dezembro 2020.

BANCA EXAMINADORA

Juliana Forte Mazzeu de Araújo - (presidente)
Universidade de Brasília - UnB

Aline Pic-Taylor
Universidade de Brasília - UnB

Erica Carine Campos Caldas Rosa
Universidade de Brasília - UnB

Patrícia Natalia Silva Moretti (suplente)
Universidade de Brasília - UnB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, pelo suporte incondicional, pela educação, por todo o amor, e pela contribuição genética que me tornaram a pessoa que sou.

À minha família, pelo apoio e pelo carinho.

À minha orientadora Dra. Juliana Forte Mazzeu, por todos os ensinamentos, pela amizade e pela paciência.

Às doutoras Aline Pic-Taylor, Érica Rosa, Patrícia Moretti e Silviene Oliveira, pelas excelentes lições.

Ao doutor Adriano Bonaldi e às doutoras Halinna Wawruk e Lia Formigli, pela contribuição para este trabalho.

À doutora Íris, por ser um exemplo na área de genética clínica e por todas as reuniões.

Às doutoras do HUB, Mara, Beatriz e Rosenelle, pelo acolhimento e esclarecimentos durante os atendimentos aos pacientes.

À Nilsa, à Renata e ao Aluísio, pela amizade e pela ajuda prestada durante os experimentos.

Às doutorandas Ana Carolina Vaqueiro e Vanessa Sodr  por terem compartilhado conhecimento e pela disposi o em sempre ajudar.  s minhas demais colegas de P s-Gradua o.

À estagiária Gabriela Fernandes, pela amizade e pela companhia durante os momentos de bancada.

Aos pacientes, que concordaram em participar deste estudo.

A minhas amigas Amanda Moro e Gabriela Pazzine, pela amizade que começou nos primórdios da faculdade e que já perdura há quase 10 anos, e a todos os meus amigos.

À minha ex-roommate e eterna amiga, Jessica, pelo incentivo.

A todas as pessoas que, de longe ou de perto, carrego comigo em pensamento e de alguma forma contribuíram positivamente para a pessoa que me tornei.

Ao Programa de Pós-Graduação, por ter me permitido realizar este trabalho.

À Universidade de Brasília, por ter se tornado um segundo lar.

À CAPES, ao CNPq e à FAP/DF, pelo suporte financeiro.

Muito obrigada.

RESUMO

O *imprinting* genômico é um processo epigenético em que alguns genes são naturalmente silenciados de forma parental-específica. Defeitos no processo de *imprinting* podem acarretar em síndromes genéticas como, por exemplo, a Síndrome de Silver-Russell (SSR). A SSR é caracterizada por restrição de crescimento pré e pós-natal, face triangular, testa proeminente, macrocefalia, clinodactilia de 5º dedo, entre outros sinais. Em cerca de 40% dos casos de SSR a etiologia é desconhecida. A maioria dos pacientes com diagnóstico molecular apresenta hipometilação paterna do cromossomo 11p15 ou dissomia uniparental materna do cromossomo 7. O objetivo do presente estudo foi compilar dados de pacientes que apresentam fenótipo sugestivo de SSR e relatar o progresso da investigação molecular. Dezenove pacientes com fenótipo de SSR ou SSR-*like* foram selecionados para esta pesquisa. A partir das amostras destes pacientes, os exames de cariótipo, MS-MLPA e genotipagem por microssatélites foram realizados, seguidos por exoma, *microarray* e sequenciamento *mate-pair* para algumas destas amostras. Após a realização destes testes foi possível confirmar a suspeita de SSR em oito casos. Cinco apresentavam hipometilação no cromossomo 11p15, um apresentava isodissomia uniparental materna, e duas irmãs, disrupção do gene *HMGA2*. Além disso, o sequenciamento de exoma permitiu o diagnóstico de duas pacientes que apresentavam variantes patogênicas no gene *PIK3R1* (Síndrome SHORT) e no *POC1A* (Síndrome SOFT). Esses resultados são concordantes com as frequências descritas na literatura. O correto diagnóstico contribui para o seguimento clínico e aconselhamento genético destes pacientes.

Palavras-chave: *imprinting* genômico; síndrome de Silver-Russell; metilação de DNA; baixa estatura; Síndrome SHORT; Síndrome SOFT

ABSTRACT

Genomic imprinting is an epigenetic process in which some genes are naturally silenced in a parental-specific manner. Defects in the imprinting process can lead to genetic syndromes, such as Silver-Russell Syndrome (SRS). SRS is characterized by intrauterine and postnatal growth restriction, triangular face, prominent forehead, macrocephaly, 5th finger clinodactyly, among other signs. In about 40% of clinical cases of SRS, the etiology is unknown. Most patients with a molecular diagnosis have paternal hypomethylation of chromosome 11p15 or maternal uniparental disomy of chromosome 7. The main goal of this study was to gather data from patients with a suggestive phenotype of SRS and report the progress of the molecular investigation. Nineteen patients with SRS or SRS-like phenotype were selected for this research. From the samples of these patients, karyotype, MS-MLPA and microsatellite genotyping tests were performed, followed by exome sequencing, chromosomal microarray analysis and mate-pair sequencing for some of these samples. After performing these tests diagnosis of SRS could be confirmed in eight cases. Five of them had hypomethylation of chromosome 11p15, one had maternal uniparental isodisomy and two sisters, disruption of *HMGA2* gene. Furthermore, exome sequencing enabled the diagnosis of two patients who exhibited pathogenic variants at *PIK3R1* gene (SHORT Syndrome) and at *POC1A* gene (SOFT Syndrome). These results are in accordance with the frequencies described in the literature. The correct diagnosis contributes to the clinical follow up and genetic counselling of these patients.

Keywords: genomic imprinting; Silver-Russell syndrome; DNA methylation; short stature; SOFT syndrome; SHORT syndrome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquematização do processo de metilação de DNA e seu impacto na cromatina e no gene.

Figura 2: Esquematização da banda 15q11-q13 do alelo paterno (A) e do materno (B), mostrando os principais genes, com destaque para o UBE3A envolvido na etiologia da SA. Os retângulos cinzas representam os genes expressos paternalmente, enquanto os pretos representam os expressos maternalmente. Os retângulos brancos representam os genes silenciados maternalmente e os retângulos cinza escuro representam os genes expressos de forma bialélica. O triângulo verde representa a atividade no centro de imprinting da SA, enquanto o triângulo verde e a elipse vermelha representam a atividade e o silenciamento do centro de imprinting da SPW, respectivamente.

Figura 3: Esquematização do cromossomo 15 destacando as principais regiões envolvidas na etiologia da SPW e da SA, em que genes de *imprinting* podem ou não estar envolvidos. Destaca-se a região de deleção mais comum na SPW.

Figura 4: Cluster de *imprinting* do cromossomo 11p15 esquematizado em 3 situações: a) banda cromossômica normal; b) ganho de metilação envolvendo o gene H19 em um paciente com SBW; os três pontos azuis ligados as diferentes regiões do cluster representam um grupamento metil.

Figura 5: O cluster de genes de imprinting em 11p15.5, que é dividido em dois domínios funcionais cujo imprinting é dependente de ICRs distintos (H19/IGF2: IG-DMR, KCNQ1OT1: TSS-DMR). Retângulos preenchidos representam os genes que codificam proteínas; retângulos vazios representam genes não codificadores; Ω representam miRNAs; bolinhas preenchidas, as regiões metiladas; bolinhas vazias, as regiões não metiladas; em vermelho, os genes expressos do cromossomo materno; em azul, os genes expressos do cromossomo paterno.

Figura 6: Paciente diagnosticado com SSR.

Figura 7: Região de *imprinting* em 11p15 Status de metilação dos genes mapeados em 11p15 em indivíduos normais e nas diversas causas de hipometilação levando à síndrome de Silver-Russell: epimutações no ICR1, dissomia uniparental materna do cromossomo 11p15 e duplicação no cromossomo 11p15.

Figura 8: Modelo de análise de dados de MS-MLPA retirado do sítio do fornecedor, comparando o número de cópias (acima) de uma amostra referência (esquerda) com uma amostra teste (direita) e a porcentagem de metilação (abaixo) entre uma amostra referência e uma teste. Os alelos não metilados sofrem digestão pela enzima Hha1, enquanto os metilados continuam na reação e emitem picos.

Figura 9: Representação de resultados que podem ser obtidos por eletroforese após MS-MLPA a partir de amostras de pacientes com SSR. Os M representam a metilação nos ICRs. A direita estão amostras controle e a esquerda amostras de pacientes que apresentam hipometilação de CI1 (SSR). Acima estão as amostras que não passaram por digestão e são úteis para a análise do número de cópias. Abaixo, a seta vermelha (3) representa a ausência de pico devido a digestão pela enzima Hha1 pela hipometilação da sonda afetada, enquanto as setas lilás indicam a redução de 50% dos picos correspondentes a CI1 (3) e CI2 (5). O controle de digestão (7) está desmetilado, e não projeta um pico, sendo indicado por um *.

Figura 10: Resultado normal para o padrão de metilação em ICR1 (amostra digerida, acima) e número de cópias (amostra não digerida, abaixo).

Figura 11: Imagem obtida pelo programa IGV após análise por sequenciamento de exoma da paciente I mostrando a variante identificada na paciente (verde).

Figura 12: Imagem obtida pelo programa IGV após análise por sequenciamento de exoma da paciente R mostrando a variante identificada na paciente (verde).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Organização dos critérios de classificação de variantes por tipo de evidência e pela força de impacto de cada critério para a classificação benigna ou patológica.

Tabela 2 – Sinais clínicos exibidos pelos pacientes e contagem de acordo com o Netchine-Harbison Clinical Scoring System (NH-CSS)

Tabela 3 – Resultados dos testes de genotipagem de microssatélites do cromossomo 7, MS-MLPA, análise cromossômica por *microarray*, sequenciamento de exoma e conclusão diagnóstica dos pacientes deste estudo.

Tabela 4 – Resumo dos resultados da investigação de matUPD7 nos pacientes com SSR obtidos por genotipagem de microssatélites. O sinal + representa a presença do sítio para a enzima de restrição e o sinal – representa sua ausência. Os alelos apresentados referentes aos marcadores de microssatélites representam o tamanho dos mesmos em pares de bases. M- Mãe; C- Criança; P- Pai

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI Centro de *imprinting*

CMA análise cromossômica por *micrarray*

CNV Variação no número de cópias

DMNT Diabetes Mellitus Neonatal Transitório

DMR Região de metilação diferenciada

EEG Eletroencefalograma

HMGA2 *High Mobility Group At-Hook 2*

ICR Região de controle de *imprinting*

MS-MLPA *Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NAALADL2 *N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase-Like 2*

NH-CSS *Netchine-Harbison Clinical Scoring System*

PHP Pseudohipoparatiroidismo

PPC2 Puberdade precoce central 2

PPHP Pseudo-pseudohipoparatiroidismo

RCIU Restrição no crescimento intrauterino

SA Síndrome de Angelman

SBW Síndrome de Beckwith-Wiedemann

SNP Polimorfismos de nucleotídeo único

SPW Síndrome de Prader-Willi

SSR Síndrome de Silver-Russell

ST Síndrome Temple

UPD Dissomia uniparental

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>IMPRINTING</i> GENÔMICO	14
1.2	SÍNDROMES DE <i>IMPRINTING</i>	20
1.2.1	Cromossomo 15	20
1.2.2	Cromossomo 6	23
1.2.3	Cromossomo 8	24
1.2.4	Cromossomo 14	25
1.2.5	Cromossomo 20	26
1.2.6	<i>Imprinting</i> no cromossomo 11	27
1.3	SÍNDROME DE SILVER-RUSSELL	29
1.4	ETIOLOGIA DA SSR.....	33
1.4.1	Alterações no cromossomo 7	33
1.4.2	Alterações no cromossomo 11	35
1.4.3	Genes candidatos	37
1.5	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	38
1.5.1	Diagnóstico Diferencial	41
2	OBJETIVOS	45
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3	PACIENTES E MÉTODOS	47
3.1	PACIENTES	47
3.2	MÉTODOS	48
3.2.1	Cultura de leucócitos e exame de cariótipo	49
3.2.2	Extração de DNA genômico	49
3.2.3	Busca por alterações epi(genéticas) no cromossomo 11	50
3.2.4	Busca por alterações no cromossomo 7	54
3.2.5	Busca por alterações cromossômicas por <i>Microarray</i>	55

3.2.6	Busca de alterações por Sequenciamento de Exoma.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	BUSCA POR ALTERAÇÕES EPI(GENÉTICAS) NO CROMOSSOMO 11	64
4.1.1	Hipometilação de ICR1.....	64
4.2	BUSCA POR DISSOMIA UNIPARENTAL MATERNA	66
4.3	PESQUISA DE MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES POR CMA	69
4.4	ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO DE EXOMA.....	70
4.4.1	Paciente I.....	70
4.4.2	Paciente R.....	72
4.5	TRANSLOCAÇÃO ENTRE CROMOSSOMO 3 E CROMOSSOMO 12	74
4.6	CONCLUSÃO.....	78
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

CAPÍTULO 1.
INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO

1.1 *IMPRINTING* GENÔMICO

O *imprinting* genômico é um processo epigenético de marcação ou silenciamento de alguns genes, com base na origem paterna ou materna. No genoma humano, poucos são os genes que passam por este processo, essencial para o correto desenvolvimento do indivíduo. No *imprinting*, os processos epigenéticos alteram a expressão gênica e são transmitidos para a prole. Ocorrem durante a gametogênese e a cada geração há uma reprogramação, ou seja, o indivíduo transmitirá para a prole apenas os genes que sofreram *imprinting* de seu progenitor de igual sexo (1, 2).

Em uma situação normal, cada indivíduo herda dois alelos de cada gene, uma cópia materna e outra paterna. Alguns destes genes passam por *imprinting* genômico e apenas um dos alelos herdado é expresso de forma parental-dependente. O outro alelo é silenciado pela regulação epigenética. Desta forma, apenas o alelo de origem paterna é expresso, enquanto o materno é silenciado, ou vice-versa (3).

A desregulação do processo de *imprinting* leva a quadros sindrômicos. É o que ocorre, por exemplo, quando a capacidade celular de passar pelo *imprinting* está comprometida ou quando o gene ativo (não-silenciado) encontra-se deletado. O alelo silenciado não compensa a perda de função do alelo que deveria estar ativo, o que pode ocasionar um fenótipo patológico (1).

O *imprinting* genômico ocorre não apenas em seres humanos, mas também nos outros mamíferos placentários, em marsupiais e em algumas plantas floríferas. O processo é imprescindível para a manutenção normal da embriogênese e para o crescimento pré e pós-natal (3).

Vários subprocessos estão envolvidos na geração de uma marca epigenética única observada em um subconjunto de loci no genoma. Pode-se destacar entre eles a

acetilação de histonas, os RNAs não codificantes e a metilação do DNA. Esta última é o alicerce para o estabelecimento de marcas de *imprinting* nos alelos parentais (3).

A metilação do DNA é um exemplo de processo epigenético em que um grupo metil (-CH₃) é adicionado de forma reversível a regiões CpG, também conhecidas como ilhas CpG (Figura 1). Estas regiões são ricas em nucleotídeos citosina. A metilação de DNA, além de desempenhar papel crucial em vários processos biológicos, como o desenvolvimento e diferenciação gênica, é responsável pela modelagem da estrutura de cromatina, o que altera a capacidade de ligação de proteínas ao DNA, e como resultado, a expressão gênica (4, 5).

Durante o desenvolvimento embrionário, há períodos de ganho e perda de metilação. O primeiro ciclo de desmetilação ocorre durante a fase de blastocisto. Nesta etapa, os genes que passam pelo processo de *imprinting* mantêm suas marcas epigenéticas. A metilação é reestabelecida durante a formação do epiblasto (6, 7, 8).

Após a fertilização, uma desmetilação global ocorre durante a migração das células germinativas primordiais, em que as marcas de metilação herdadas são apagadas, à exceção de algumas regiões, como as ICRs (*Imprinting Control Regions*). Esta segunda fase de desmetilação se completa com aproximadamente 10 a 11 semanas de gestação e é essencial para a redefinição do *imprinting* de forma específica ao sexo do indivíduo (6, 9, 10).

O reestabelecimento de padrões de metilação nas células germinativas ocorre em diferentes estágios do desenvolvimento, de forma sexo-dependente. O início deste processo ocorre após a implantação, com aproximadamente 12 semanas de gestação, e termina antes do fim da gestação nos espermatozoides de indivíduos do sexo masculino. Já em indivíduos do sexo feminino, o reestabelecimento destas marcas nos oócitos ocorre após o nascimento (6, 8, 10).

Metilação de DNA

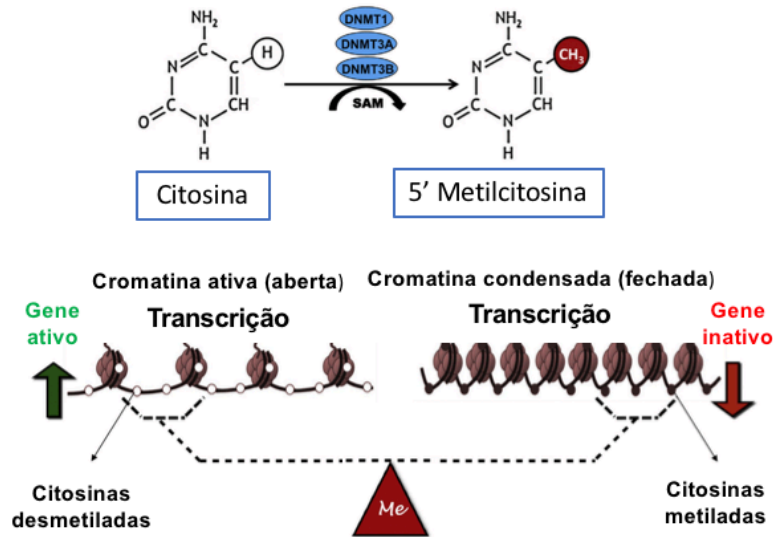


Figura 1: Esquemática do processo de metilação de DNA e seu impacto na cromatina e no gene. Adaptada de: Agrawal *et al.*, 2018 (11).

O *imprinting* de determinado gene ocorre quando um de seus alelos, o paterno ou o materno, é silenciado pela metilação de DNA das ilhas CpG. Estas marcas de metilação parentais se originam no oócito ou no espermatozoide e produzem uma expressão monoalélica em determinadas regiões cromossômicas. O *imprinting* epigenético é preservado na linhagem celular a medida que as divisões celulares ocorrem no embrião, embora algumas marcas de metilação permaneçam apenas na placenta após a implantação (12, 13).

A reprogramação epigenética é responsável por reiniciar e reestabelecer marcas epigenéticas logo no início do desenvolvimento embrionário. É um processo essencial na gametogênese e embriogênese. Qualquer erro nesta reprogramação pode ocasionar a perda de *imprinting* (14).

Uma das teorias sobre a origem do *imprinting* genômico é de cunho evolucionário. Ele teria surgido como consequência de uma competição entre os interesses dos genes maternos e paternos no feto em desenvolvimento. De acordo com esta teoria, o lado paterno ensinaria um bebê grande, capaz de sobreviver e carregar seus genes e passá-

los adiante. Já o lado materno almejaria uma prole maior, em que os bebês gerados fossem pequenos e necessitassem menos de seus esforços, para que a mãe pudesse ter mais filhos (15).

A hipótese do conflito parental evolucionário converge com a tendência dos genes que sofrem *imprinting*. O crescimento do feto é estimulado quando os genes que passam por *imprinting* no cromossomo materno estão silenciados, mas expressos no cromossomo de origem paterna. Já quando genes deste cromossomo estão silenciados, o crescimento é inibido (16).

O *imprinting* ocorre de forma específica em cada tecido. Isso significa que um gene pode ser expresso monoalelicamente em determinado tecido humano e bialelicamente em outros tecidos. Além da metilação do DNA, modificações histônicas e RNAs não codificantes contribuem para o processo de *imprinting* (16).

O total de genes que passa por *imprinting* é relativamente pequeno. Estudos sobre *imprinting* verificaram que os genes que passam por este processo são conservados dentro de uma mesma espécie. Mais de 90 genes que sofrem *imprinting* já foram identificados na espécie humana, enquanto mais de 125 genes de *imprinting* foram identificados em ratos. A maioria destes genes encontra-se agrupada nos mesmos clusters e loci. Na espécie humana os genes que sofrem *imprinting* estão distribuídos em sete cromossomos nas regiões 6q24, 6p22, 7p13-q32, 8q24, 11p15, 14q32, 15q11-q13 e 20q13 (17,18).

Doenças relacionadas a *imprinting* resultam de erros neste mecanismo. Porém nem todos os erros de *imprinting* resultam em alterações fenotípicas. Existem casos relatados na literatura, por exemplo, de indivíduos saudáveis que apresentam defeitos de *imprinting* na região dos genes *H19* e *IGF2* (19).

Perdas de *imprinting* podem ter quatro origens: Deleções, mutações de ponto, dissomia uniparental (UPD) e epimutações. Estas afetam o loci chave para o *imprinting* e resultam no silenciamento anormal de alelos que deveriam ser ativos ou na expressão de alelos que deveriam ser inativos. Mutações e deleções são causas comuns de doenças relacionadas ao *imprinting* e podem afetar tanto genes como regiões intergênicas, promotores e ICRs (19).

A UPD é um fenômeno que ocorre quando há uma falha na disjunção cromossômica, e ambas as cópias de um cromossomo (ou parte delas) oriundas de um mesmo genitor são transmitidas ao feto. A UPD pode ocorrer para resgatar o número de cópias em um feto trissômico ou em um feto monossômico. Nesse processo o feto pode ficar com duas cópias maternas do mesmo cromossomo e nenhuma paterna, ou ainda, duas paternas e nenhuma materna. No caso do resgate da monossomia, o feto terá uma isodissomia, enquanto nos casos de resgate trissômico pode haver heterodissomia ou isodissomia. Quando há uma alteração fenotípica em indivíduos com UPD, esta pode ser decorrente da homozigose de genes recessivos ou de defeitos de *imprinting*. (1, 2).

As síndromes de *imprinting* mais prevalentes são: Silver-Russell, Beckwith-Wiedemann, Prader-Willi e Angelman. Além destas, pode-se citar ainda a síndrome Schaaf-Yang, a puberdade precoce central 2, o pseudohipoparatiroidismo tipo 1A e 1C e o pseudo-pseudohipoparatiroidismo, o diabetes mellitus neonatal transitório, a síndrome Birk-Barel, a síndrome IMAGE, a síndrome Temple e a síndrome Kagami-Ogata, além de alterações em genes mapeados no cromossomo 20 (4).

Quadro 1 – Síndromes de *imprinting*, principais genes envolvidos e regiões cromossômicas correspondentes.

Cromossomo	Regiões	Gene(s) envolvido(s)	Síndrome(s)
15	15q11-q13	<i>UBR3</i>	Angelman
		<i>SNRPN</i> <i>NDN</i>	Prader-Willi
		<i>MAGEL2</i>	Schaaf-Yang
		<i>MKRN3/ZFP127</i>	Puberdade precoce central 2
6	6p22.1	<i>PLAG1</i>	Diabetes mellitus neonatal transitório
	6q24.2	<i>HYMA1</i>	
	6p22	<i>ZEP57</i>	
8	8q24	<i>KCNK9</i>	Birk-Barel
		<i>PEG13</i>	
		<i>TASK3</i>	
14	14q32.2	<i>DLK1</i> <i>DIO3</i> <i>RTL1</i> <i>MEG3</i>	Temple
		<i>MEG3</i>	Kagami-Ogata
20	20q13	<i>GNAS1</i>	Pseudohipoparatiroidismo tipo 1 Pseudo-pseudohipoparatiroidismo
	20q11-q13		matUPD20
11	11p15.5	<i>CDKN1C</i>	IMAGE
		<i>CDKN1C</i> <i>IGF2</i>	Beckwith-Wiedemann
	11p15	<i>H19</i> <i>IGF2</i>	Silver-Russell

1.2 SÍNDROMES DE IMPRINTING

1.2.1 Cromossomo 15

Distúrbios envolvendo a região de *imprinting* 15q11-q13 foram relacionados à quatro síndromes distintas no ser humano: a síndrome de Angelman (SA), a síndrome de Prader-Willi (SPW), a síndrome Schaaf-Yang e a puberdade precoce tipo 2 (20, 21).

A maioria dos casos da SA é originada pela ausência *de novo* da região de *imprinting* 15q11-q13 do cromossomo de origem materna. Um dos genes desta região relacionados a etiologia é o *UBE3A*, responsável pela codificação da ligase ubiquitina E3 (22). As causas estabelecidas para a SA estão ilustradas na Figura 2.

A SA é uma doença do neurodesenvolvimento caracterizada por deficiência intelectual, alterações de movimento ou de equilíbrio, hiperatividade, comportamentos anormais, limitações severas da fala e convulsões. Além disso, pacientes com SA costumam apresentar risada fácil, hiperatividade e uma atração peculiar por água. Quatro mecanismos moleculares já foram descritos como causas para a SA, todos envolvendo a região cromossômica 15q11-q13: deleções, mutações intragênicas, dissomia uniparental paterna e defeitos de *imprinting* de origem materna que alteram a expressão (23).

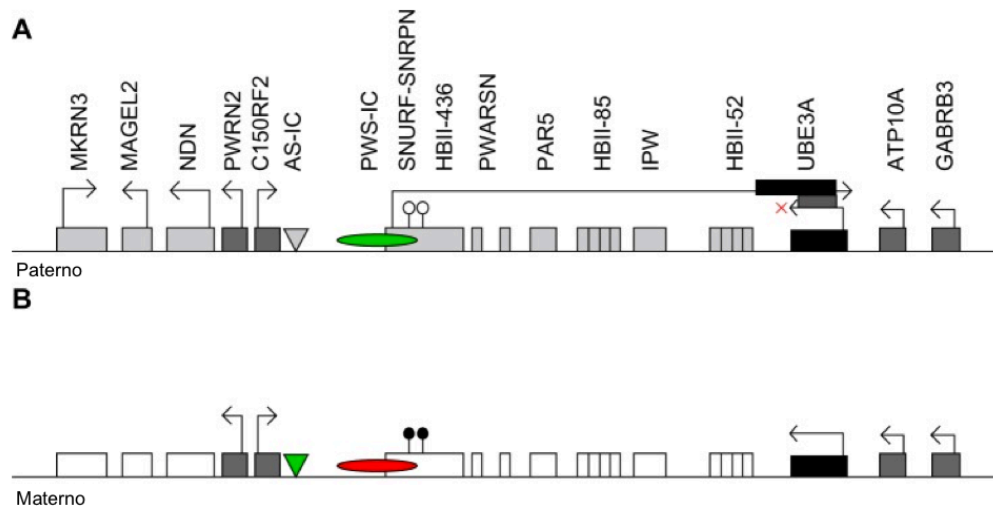


Figura 2: Esquematização da banda 15q11-q13 do alelo paterno (A) e do materno (B), mostrando os principais genes, com destaque para o UBE3A envolvido na etiologia da SA. Os retângulos cinzas representam os genes expressos paternalmente, enquanto os pretos representam os expressos maternalmente. Os retângulos brancos representam os genes silenciados maternalmente e os retângulos cinza escuro representam os genes expressos de forma bialélica. O triângulo verde representa a atividade no centro de *imprinting* da SA, enquanto o triângulo verde e a elipse vermelha representam a atividade e o silenciamento do centro de *imprinting* da SPW, respectivamente. Adaptada de: Bird, 2014 (24)

A SPW tem uma etiologia parecida com a SA, com a diferença de que a região 15q11-q13 não expressa é oriunda do cromossomo paterno. Este é o mecanismo mais comum, mas a etiologia da SPW compreende outros dois mecanismos principais: a dissomia uniparental materna do cromossomo 15, e um defeito na região genômica responsável pelo controle de *imprinting*. Este último é conhecido como defeito de *imprinting* e pode surgir a partir de microdeleções no centro de *imprinting* (CI). O CI regula a expressão gênica alelo-específica além de reestabelecer a identidade parental alélica entre as gerações (25, 26).

A ausência de expressão dos genes de origem paterna do cromossomo 15q11.2-q13 origina um fenótipo da SPW relacionado a dupla falta de expressão dos genes *SNRPN* e *NDN*, que passam por *imprinting*. Estes genes maternos já são inativados naturalmente por fatores epigenéticos, enquanto os genes paternos deveriam estar ativos (27).

Pacientes com SPW apresentam quadro clínico variável. Destaca-se hipotonia grave com dificuldades na alimentação durante os primeiros anos de vida, seguida por um aumento gradual de apetite chegando a obesidade mórbida caso não haja um controle. O atraso cognitivo também está presente em variados graus. Além disso, podem ocorrer atrasos no desenvolvimento da fala e no desenvolvimento motor, baixa estatura relacionada a deficiência do hormônio de crescimento, hipogonadismo, estrabismo, escoliose, insônia e diabetes tipo 2 (22).

Apesar de englobar o mesmo locus da SA, os fenótipos são praticamente opostos, como é comum nas síndromes de *imprinting* que envolvem a mesma região cromossômica (28). A Figura 3 representa o cromossomo 15, destacando as regiões que sofrem alterações em ambas as síndromes.

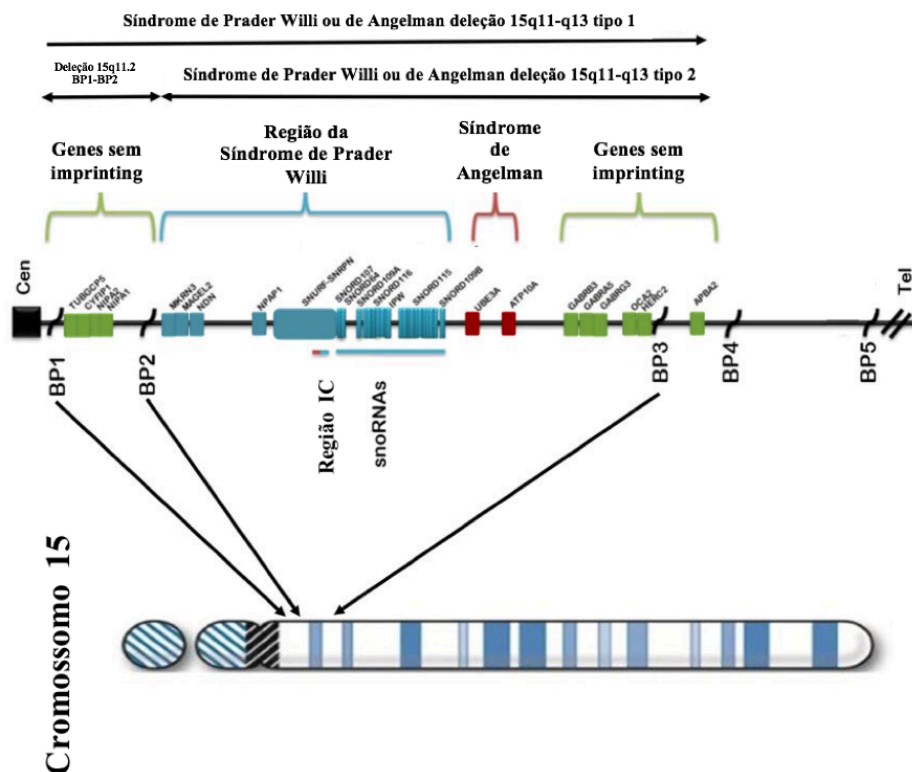


Figura 3: Esquemática do cromossomo 15 destacando as principais regiões envolvidas na etiologia da SPW e da SA, em que genes de *imprinting* podem ou não estar envolvidos. Destaca-se a região de deleção mais comum na SPW. Adaptada de: Butler, 2017 (29).

A síndrome Schaaf-Yang, uma doença semelhante a SPW, é ocasionada por mutações truncadas no gene *MAGEL2*, que está localizado na região cromossômica 15q11-q13 e normalmente passa por *imprinting*, sendo expresso paternalmente. Ao contrário da SPW, a hiperfagia e obesidade geralmente estão ausentes. É caracterizada por hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual, hipogonadismo, comportamento autista e contraturas articulares (30).

A puberdade precoce central 2 (PPC2) é causada por mutações de perda de função em heterozigose no gene *MKRN3/ZFP127*, também localizado na região 15q11-q13. Este gene passa por *imprinting* e encontra-se expresso pelo alelo materno. Portanto, apenas as mutações herdadas do pai ocasionam a doença caracterizada por uma ativação prematura do eixo reprodutivo, antes dos oito anos nas meninas e nove anos nos meninos (31).

O fenótipo da PPC2 inclui sinais puberais, como desenvolvimento da mama ou aumento testicular e aceleração do crescimento e idade óssea, consistentes com níveis elevados de hormônio luteinizante basal e estimulados pelo hormônio liberador de gonadotrofina (31).

1.2.2 Cromossomo 6

O Diabetes Mellitus neonatal transitório (DMNT) é uma patologia rara cuja etiologia está relacionada a superexpressão dos genes *PLAG1* e *HMAG1* expressos paternalmente, ambos localizados no locus 6q24. O gene *ZFP57* em 6p22.1 também está envolvido na etiologia da doença. Existem três tipos de DMNT, sendo que o tipo 2 e tipo 3 foram relacionados a mutações envolvendo os genes *ABCC8* e *KCNJ11*, respectivamente, ambos mapeados em 11p15.1 (32).

O DMNT ocorre em recém-nascidos e é caracterizado por restrição no crescimento intrauterino (RCIU) e hiperglicemia persistente durante as primeiras seis semanas de vida, desidratação e ausência de cetoacidose. Estes bebês apresentam deficiência de insulina e o quadro costuma se reverter em um ano e meio em cerca de 50% dos casos.

O tratamento consiste na administração de insulina durante períodos de hiperglicemia. Pacientes com DMNT têm maiores probabilidades de desenvolver diabetes mellitus tipo 2 no futuro (2, 33).

O gene *PLAGL1* é um regulador de transcrição e supressor de tumores que codifica uma proteína responsável pelo controle do ciclo celular e apoptose. Além disso, esta proteína induz a transcrição do receptor de polipeptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária, que aumenta os níveis de liberação de insulina. A superexpressão de *PLAGL1* resulta na retroalimentação negativa da função das células β pancreáticas e gera o quadro de DMNT tipo 1 (DMNT1) (34).

Além do *PLAG1*, o *imprinting* materno é modulado pela metilação do promotor *HYMA1* (ou P1) (5). Aproximadamente 20% dos casos de DMNT1 são causados por metilação de DNA anormal no ICR/P1 no locus 6q24, 35% a 40% são causados por UPD6 paterna e 35 a 40% por duplicações em 6q24 (34).

A cascata de *ZFP57* possui um papel crucial na regulação e manutenção da metilação de DNA em diversos ICRs. Mutações e deleções envolvendo este gene podem acarretar em perda de função de proteínas reguladoras de metilação, o que resulta na hipometilação de determinados loci e na perda de *imprinting*. Este mecanismo foi relatado em poucos casos de DMNT1 (35).

O papel patológico da dissomia uniparental materna do cromossomo 6 ainda está sendo discutido. Não existem evidências de que algum quadro clínico sindrômico esteja relacionado a esse mecanismo e a maior parte das alterações clínicas patológicas são associadas a trissomias em algumas linhagens celulares ou a mutações recessivas neste cromossomo (36).

1.2.3 Cromossomo 8

A etiologia da síndrome Birk-Barel está relacionada a mutações envolvendo a região cromossômica 8q24. Esta região cromossômica inclui dois genes que passam por *imprinting*: *PEG13*, expresso pelo alelo paterno e *KCNK9*, expresso pelo alelo materno.

A síndrome Birk-Barel é ocasionada por mutações específicas de origem materna, ou seja, envolvendo o gene *KCNK9* (37).

O gene *KCNK9/TASK3* codifica canal de potássio com dois domínios de poro. O *TASK3* desempenha um papel na migração de neurônios piramidais corticais que regulam a atividade e o desenvolvimento neuronal. A síndrome Birk-Barel é caracterizada por hipotonia neonatal grave, hipoglicemia neonatal transitória, fenda palatina, microrretrognatia, atraso de desenvolvimento e deficiência intelectual de variados graus. Dismorfias faciais distintas incluem dolicocefalia, filtro curto e sobrancelhas arredondadas (6, 37, 38).

1.2.4 Cromossomo 14

Alterações na expressão de genes de *imprinting* no cromossomo 14q32.2 fazem parte da etiologia de duas síndromes distintas: a síndrome Temple (ST) e a síndrome Kagami-Ogata (SKO) (39).

Essa região cromossômica 14q32.2 comporta um cluster de *imprinting* que inclui três genes expressos paternalmente, *DLK1*, *DIO3* e *RTL1*. Os mecanismos envolvidos na etiologia da síndrome Temple incluem a matUPD14 em aproximadamente 78% dos casos, a deficiência de metilação em *MEG3:TSS-DMR*, que regula a expressão gênica paterna, em 12% dos casos e deleções de origem paterna no cromossomo 14 em cerca de 10% dos casos (39).

A ST é caracterizada por retardo no crescimento pré-natal e pós-natal, hipotonia, dificuldades de alimentação, atraso no desenvolvimento motor, obesidade, testa ampla e outros dismorfismos. Alguns dos sinais clínicos podem ser confundidos com os da SPW ou da SSR, integrando o diagnóstico diferencial para estas síndromes. (40)

Os mecanismos envolvidos na Síndrome Kagami-Ogata são a patUPD14, em cerca de 65% dos casos, microdeleção na região de *imprinting* 14q32.2 materna em 20% e hipermetilação nesta região materna afetando o DMR *MEG3:TSS-DMR*. Foi observado que em parte dos pacientes com SKO, a etiologia não envolve necessariamente genes

de *imprinting* na região, e pequenas deleções em outros genes podem gerar o fenótipo da síndrome (41).

Pacientes com SKO podem apresentar crescimento exacerbado, polidrâmnio, defeitos no fechamento da parede abdominal, bochechas cheias, micrognatia, pescoço curto, filtro naso-labial protuberante, tórax pequeno e atraso no desenvolvimento ou deficiência intelectual (42).

1.2.5 Cromossomo 20

Algumas síndromes de *imprinting* foram atreladas a distúrbios no cromossomo 20: o pseudohipoparatiroidismo (PHP) tipo 1 e o pseudo-pseudohipoparatiroidismo (PPHP), ocasionados por mutações na região cromossômica 20q13.2-13.3 e a dissomia uniparental do cromossomo 20 materna (43).

A etiologia do PHP1 e do PPHP está relacionada à mutação inativadora no gene *GNAS1*, que codifica a subunidade α da proteína G e está localizado em 20q13.2-13.3. PHP1A e PHP1C decorrem da inativação do *GNAS1* materno, enquanto o PHP1B decorre de defeitos de metilação em *GNAS1*. Já o PPHP decorre de mutação inativadora no *GNAS1* paterno (43).

O PPHP é caracterizado por baixa estatura, face arredondada, braquidactilia, ossificação subcutânea, anomalias dentárias, obesidade, atraso no desenvolvimento e macrocefalia relativa. Já o PHP1A e o PHP1C são caracterizados por este mesmo fenótipo além de resistência ao paratormônio, ao hormônio estimulador da tireoide, ao hormônio liberador do hormônio do crescimento, a gonadotrofinas e à calcitonina. O PHP1B é caracterizado por resistência ao paratormônio e ao hormônio estimulador da tireoide sem o fenótipo de PPHP (44).

A UPD20 materna é caracterizada por RCIU, baixa estatura e dificuldades extremas de alimentação, frequentemente exigindo alimentação por sonda nasogástrica nos primeiros anos de vida. Por ter um fenótipo parecido com a síndrome de Silver-

Russell, vista em detalhes adiante, deve ser considerada em um diagnóstico diferencial (45).

1.2.6 *Imprinting* no cromossomo 11

A região cromossômica 11p15 está envolvida na etiologia de três síndromes de *imprinting*: a síndrome IMAGE, a síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) e a síndrome de Silver-Russell (SSR) (46).

Poucos casos de síndrome IMAGE foram relatados e sua etiologia está relacionada ao ganho de função por mutações no gene *CDKN1C* mapeado no cromossomo 11p15.4. O gene *CDKN1C* é expresso apenas maternalmente, logo a síndrome decorre de mutações de origem materna (47).

A síndrome IMAGE é caracterizada por RCIU, displasia metafisária, hipoplasia adrenal congênita e anomalias genitais, insuficiência adrenal grave logo após o nascimento, que pode ser fatal se não for reconhecida precocemente e se a terapia de reposição de esteroides não for iniciada. Outras características incluem hipercalcúria e/ou hipocalcemia, fenda palatina e escoliose (47).

A síndrome de Beckwith-Wiedemann é causada por alterações genéticas ou epigenéticas na região cromossômica 11p15.5. Esta região contém os genes *CDKN1C* e *IGF2*, que são fortes reguladores do crescimento fetal, como discutiremos mais a frente (46).

A SBW é caracterizada por crescimento exacerbado, macroglossia, hemi-hiperplasia, defeitos no fechamento abdominal, órgãos abdominais aumentados e hipoglicemia. Além disso, pacientes com a síndrome apresentam predisposição aumentada a tumores, inclusive na fase embrionária (48).

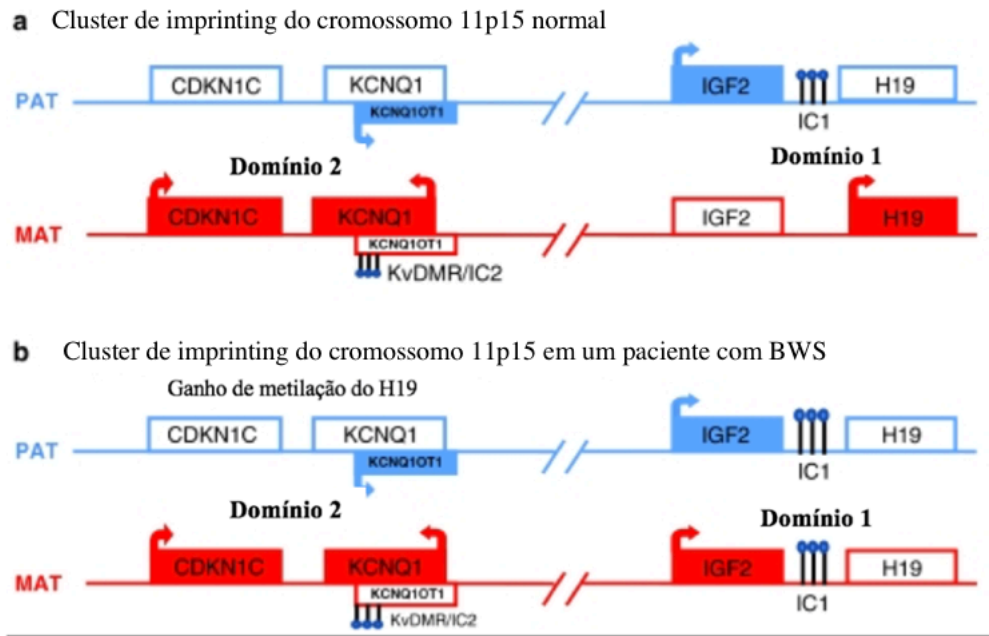


Figura 4: Cluster de *imprinting* do cromossomo 11p15 esquematizado em 3 situações: a) banda cromossômica normal; b) ganho de metilação envolvendo o gene *H19* em um paciente com SBW; os três pontos azuis ligados as diferentes regiões do cluster representam um grupamento metil. Adaptada de: Weksberg, 2010 (49)

Alterações nesses mesmos clusters estão também envolvidas na etiologia da Síndrome de Silver-Russell. A principal região envolvida na causa da SSR foi identificada como a banda p15 do cromossomo 11. Entretanto, além das alterações neste cromossomo, outras regiões gênicas foram relacionadas a casos de SSR ou fenótipos parecidos e alguns casos continuam sem causa identificada (50).

O fenótipo e cada uma destas alterações serão descritos a seguir.

1.3 SÍNDROME DE SILVER-RUSSELL

A SSR, também conhecida como Síndrome de Russell-Silver, foi primeiramente e independentemente descrita por dois pesquisadores, Silver e Russell, junto aos seus respectivos colaboradores. O grupo de Silver descreveu 2 casos de crianças afetadas, enquanto o de Russell descreveu 5 casos. Nenhum deles apresentava parentesco. Estes casos foram estudados no início da década de 1950 (50).

Ambas as crianças estudadas por Silver e seu grupo apresentavam baixa estatura, baixo peso ao nascimento e hemi-hipertrofia congênita. Os casos relatados por Russell apresentavam retardo no crescimento intrauterino, face triangular, testa larga, lábios finos e queixo pequeno. Duas destas cinco crianças apresentavam assimetria corporal (50).

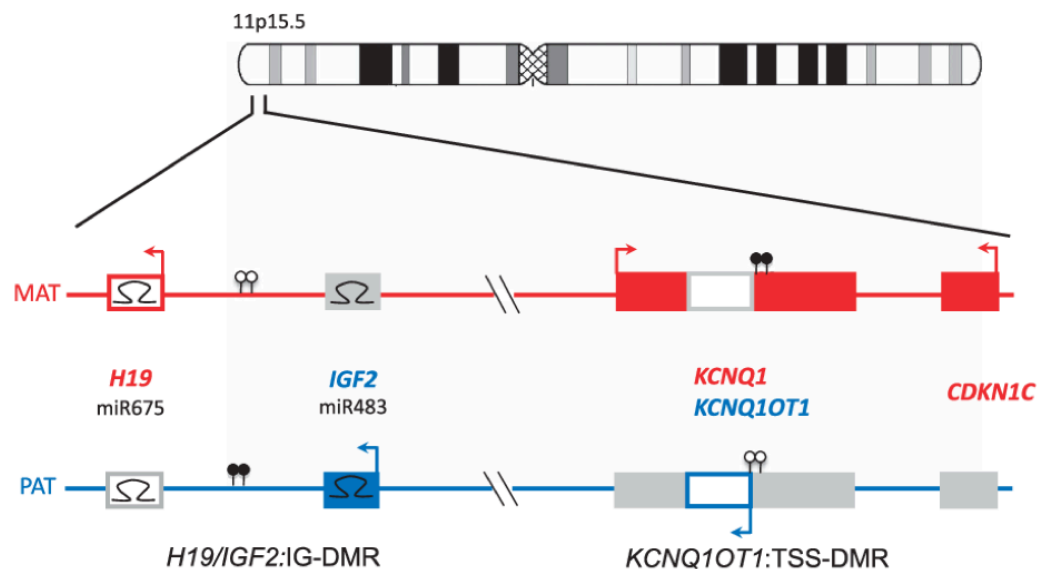


Figura 5: O cluster de genes de *imprinting* em 11p15.5, que é dividido em dois domínios funcionais cujo *imprinting* é dependente de ICRs distintos (H19/IGF2: IG-DMR, KCNQ1OT1: TSS-DMR). Retângulos preenchidos representam os genes que codificam proteínas; retângulos vazios representam genes não codificadores; Ω representam miRNAs; bolinhas preenchidas, as regiões metiladas; bolinhas vazias, as regiões não metiladas; em vermelho, os genes expressos do cromossomo materno; em azul, os genes expressos do cromossomo paterno. Adaptada de Eggermann, 2016 (51)

A SSR é uma condição rara e clínica e molecularmente heterogênea, caracterizada principalmente pelo retardo no crescimento intrauterino e pós-natal. Além do retardo de crescimento, outras características encontradas em indivíduos afetados são: macrocefalia relativa ao nascimento, face em formato triangular, testa proeminente com ou sem saliência frontal, micrognatia, queixo pequeno, assimetria corporal e entre membros, cantos da boca voltados para baixo, clinodactilia do quinto dedo ou bradidactilia e outras malformações leves. O crescimento da cabeça é normal, mas esta pode parecer desproporcionalmente maior se comparada ao resto do corpo (52, 53).

Além dos sinais clínicos supracitados, outros achados clínicos incluem voz aguda, atraso no fechamento da fontanela anterior, massa muscular diminuída, articulações do cotovelo hipoplásicas, escoliose, suor excessivo, atrasos cognitivos, na fala ou motores, dificuldade de aprendizado, anomalias geniturinárias e puberdade precoce (53).

Crianças afetadas costumam ser magras e apresentam apetite reduzido ou dificuldades de alimentação, resultando em hipoglicemia em alguns casos. Alguns afetados apresentam ainda resistência à insulina. Distúrbios do sistema gastrointestinal incluem refluxo gastroesofágico, esofagite, vômito e constipação. Os fenótipos costumam tornarem-se mais brandos com o passar do tempo, podendo dificultar o diagnóstico, principalmente na fase adulta (46, 52, 53).



Figura 6: Paciente diagnosticado com SSR. Fonte: Marsaud, 2015 (54)

Devido a ampla gama de sintomas que podem ser apresentados pelos afetados e ainda, a variação na intensidade destes sintomas, a SSR torna-se uma síndrome de diagnóstico complexo. Seus sinais característicos podem ser facilmente confundidos com os de outras síndromes genéticas (53).

O método *Netchine-Harbison Clinical Scoring System* (NH-CSS) foi desenvolvido com o objetivo de tornar o diagnóstico clínico da síndrome mais objetivo. Esse método tem se mostrado importante especialmente para o diagnóstico clínico de pacientes com sintomas mais brandos, como em adolescentes e adultos, por exemplo (53).

O método NH-CSS utiliza seis critérios principais: baixa estatura ao nascimento; retardo no crescimento pós-natal; macrocefalia relativa ao nascimento; assimetria corporal; dificuldades de alimentação e/ou baixo índice de massa corpórea e testa proeminente (53). Estes critérios estão mais explanados no Quadro 2.

Quadro 2 – Critérios clínicos para a determinação da SSR: Na coluna da esquerda estão listados e descritos os seis fatores-chave do método NH-CSS para o diagnóstico clínico. Na coluna da direita a presença destes critérios é classificada como obrigatória ou não para o enquadramento do paciente em questão na SSR. Além dos dois fatores listados como obrigatórios, pelo menos outros dois opcionais entre os listados devem estar presentes para o diagnóstico clínico sugestivo. A confirmação por meio de teste moleculares é recomendada para estes indivíduos. Adaptado de: Saal et al., 2002 (53)

Critérios clínicos	Relevância
1. Pequeno para a idade gestacional (peso ou altura ao nascimento com desvio ≥ 2 menor que a média para idade gestacional)	Opcional.
2. Atraso no crescimento pós-natal (comprimento ou altura \geq desvio padrão abaixo da média para 24 meses).	Opcional.
3. Macrocefalia relativa ao nascimento (circunferência da cabeça com desvio 1,5 acima do peso e/ou comprimento).	Obrigatória.
4. Testa proeminente (testa se projetando além do plano facial do bebê de 1 a 3 anos, vista lateralmente)	Obrigatória.
5. Assimetria corporal (discrepância entre comprimento dos membros $\geq 0,5$ cm; ou $< 0,5$ cm, mas com 2 ou mais outras partes corporais assimétricas).	Opcional.
6. Dificuldades para alimentar-se ou baixo índice de massa corpórea com desvio ≤ 2 aos 24 meses ou uso recorrente de tubo para nutrição ou de anti-histamínico para estimulação do apetite).	Opcional.

Pacientes que apresentem pelo menos quatro critérios são enquadrados como afetados pela síndrome. Dois desses critérios são considerados obrigatórios: testa proeminente e macrocefalia relativa ao nascer. Pacientes que preenchem três ou menos possuem baixas chances de possuírem a síndrome (53).

Após a suspeita de SSR, o paciente deve realizar testes moleculares para uma confirmação diagnóstica. Entretanto, é observado que, ainda que o método NH-CSS seja referência, este ainda pode entrar em contradição com os resultados destes testes. Pacientes que se encaixam em quatro ou mais fatores não necessariamente apresentam resultados de testes moleculares positivos para a síndrome, assim como há casos em que três fatores ou menos são preenchidos, mas os resultados são positivos para a síndrome (53). Assim, as análises clínica e molecular em outros grupos de pacientes podem contribuir para o delineamento da síndrome.

1.4 ETIOLOGIA DA SSR

Duas causas principais da SSR são conhecidas: defeitos de *imprinting* nos cromossomos 7 ou 11. Além disso, interrupções em genes localizados em outros cromossomos podem estar envolvidas na etiologia de alguns casos, como trataremos mais a frente. A dissomia uniparental materna do cromossomo 7 (matUPD7) e a perda de metilação do CI localizado no cromossomo 11 são responsáveis por aproximadamente 60 a 70% dos casos de SSR (55).

1.4.1 Alterações no cromossomo 7

A primeira alteração do cromossomo 7 identificada em pacientes com SSR foi a dissomia uniparental materna deste cromossomo - matUPD7. Atualmente, aproximadamente 7 a 10% dos casos de SSR relatados foram relacionados a dissomia uniparental do cromossomo 7 de origem materna. Esta alteração pode ocasionar fenótipos sindrômicos por modificar os níveis de metilação de DMRs/ICRs (46).

O cluster principal de *imprinting* no cromossomo 7 está localizado na região 7q32 e inclui os genes *PEG1*, *MEST*, *CPA4* e *COPG2*, além dos RNAs não codificantes *MESTIT*, *CIT1/COPG2T1*. A função biológica de *PEG1* e *MEST* permanece incerta (54).

Estudos com marcadores de microssatélites sugerem que a matUPD7 seja decorrente de um resgate de trissomia. Desta forma, há evidências de que a trissomia do cromossomo 7 em mosaico também esteja envolvida na etiologia e no fenótipo da SSR. Entretanto ainda não foi possível confirmar esta relação devido à alta letalidade da trissomia do cromossomo 7, ainda que em mosaico, limitando a quantidade de amostra de tecido a ser analisada (56).

A redução à homozigose de mutações recessivas em alelos do cromossomo 7 foi relatada em pacientes com SSR e fibrose cística cujo gene está mapeado em 7q31. O

estudo desses casos permitiu sugerir que a matUPD7 como uma das causas de SSR (57).

Quando comparados a pacientes com SSR com defeitos de *imprinting* no cromossomo 11, pacientes com matUPD7 apresentaram uma frequência maior de dificuldades de aprendizado e distúrbios na fala. Além disso, estes pacientes apresentaram uma resposta melhor a terapia hormonal para crescimento. O teste para matUPD7 é realizado a partir de marcadores específicos para a região, que revelam a presença de heterozigose ou homozigose (57).

A dissomia uniparental do cromossomo 7 de origem paterna não foi associada ao quadro clínico da SSR, ao contrário da matUPD7. A partir desta premissa, surgiram duas hipóteses: a diminuição da expressão do alelo paterno ou a superexpressão de fatores do cromossomo 7 herdados maternalmente originariam a SSR (58).

Outra região do cromossomo 7, localizada no braço curto, também foi implicada na etiologia da SSR. Duplicações na região 7p11.2-p13 foram identificadas em pacientes com SSR. Nesta região está mapeado o gene de *imprinting* *GRB10*, dentre outros genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento humano, como *IGFBP1*, *IGFBP3*, *PHKG1*, *EGFR* e *GHRHR* (58).

O gene *GRB10*, que codifica a proteína-10 ligada ao receptor de fator de crescimento, sofre *imprinting* em camundongos e provavelmente em humanos. Ele está localizado próximo ao cromossomo 11 em camundongos e na região 7p12-p11.2 em humanos. A proteína GRB10 se liga ao receptor de insulina (INSR) e ao IGF1R e inibe a atividade da tirosina-quinase que está envolvida na promoção do crescimento pela insulina e fatores de crescimento análogos a insulina 1 e 2 (IGF1 e IGF2). Esta cascata em união com a localização do gene e os casos de matUPD7 proveem fortes indícios de que o gene *GRB10* é um candidato para a síndrome (58).

Além do papel importante do gene *GRB10* no crescimento, uma duplicação na região 7p11.2-p12 que não envolvia este gene foi relatada em pacientes sem fenótipo da SSR, o que corrobora com seu potencial como gene causativa desta síndrome. Mutações de ponto ou desregulações no *imprinting* envolvendo esse gene não foram detectadas em pacientes com SSR (58).

1.4.2 Alterações no cromossomo 11

Grande parte dos genes regulados por *imprinting* estão localizados em clusters, ou seja, próximos. O cromossomo 11p15.5 possui um cluster de genes de *imprinting* extremamente importante para o controle do crescimento fetal. Este cluster é composto por dois domínios. O domínio IGF2/H19 localizado na região telomérica é regulado pela região de controle de *imprinting* 1 (ICR1), enquanto o domínio centromérico KCNQ1OT1/CDKN1C é regulado por ICR2 (46).

O ICR1 regula a expressão de dois genes: o *IGF2* e o *H19*. O *IGF2* codifica o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2, essencial principalmente durante o desenvolvimento fetal. Os genes *H19* e *IGF2* são expressos nos mesmos tecidos durante o desenvolvimento embrionário e acabam competindo pelos mesmos potenciadores. O gene *H19* modula a proliferação celular endotelial, além de possuir papel oncogênico, o que têm impulsionado pesquisas sobre sua utilização como alvo de terapias oncológicas (59, 60).

Aproximadamente 1% dos pacientes diagnosticados com hipometilação de ICR1 apresentam uma deleção de parte deste centro (Figura 7). Nestes casos há uma mutação genética por trás desta alteração epigenética. Deleções maiores podem ser detectadas por exames citogenéticos, enquanto a técnica de *microarray* pode ser utilizada para a detecção de microdeleções (61, 62).

Em outros casos raros de SSR, uma duplicação da região 11p15.5 de origem materna foi relatada. Tanto a deleção parcial de ICR1 como a duplicação da região 11p15.5 materna possuem risco de recorrência de 50% (63).

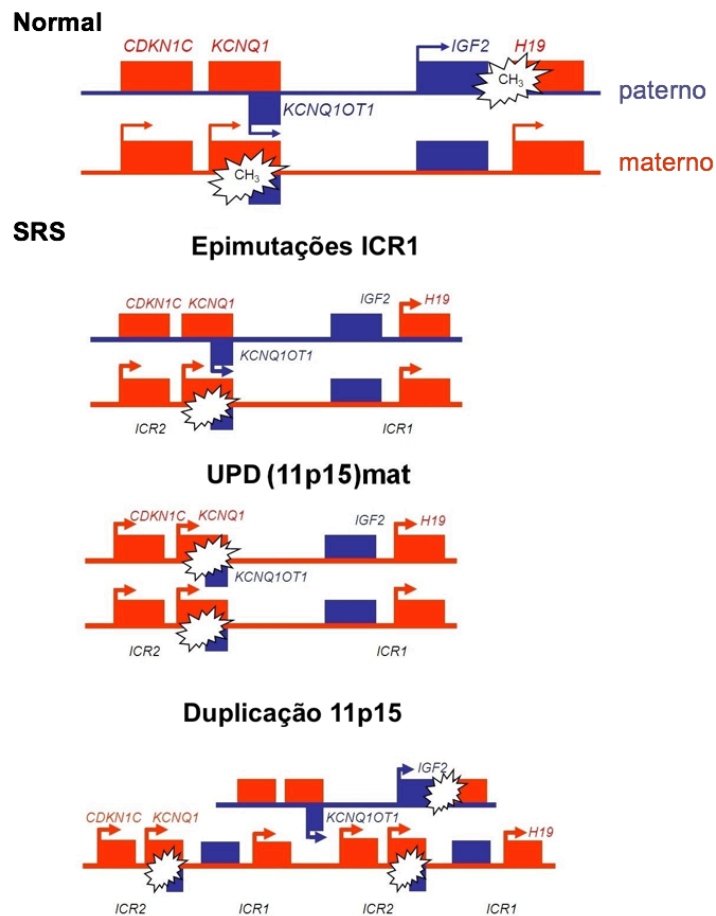


Figura 7: Região de *imprinting* em 11p15. Status de metilação dos genes mapeados em 11p15 em indivíduos normais e nas diversas causas de hipometilação levando à síndrome de Silver-Russell: epimutações no ICR1, dissomia uniparental materna do cromossomo 11p15 e duplicação no cromossomo 11p15. Adaptada de: Eggemann, 2010 (62)

A investigação da variação no número de cópias é importante em casos de perda de metilação. A técnica de *Multiplex-Ligation Amplification Probe* (MLPA) é amplamente empregada para esse tipo de análise. A variante de MLPA, conhecida como *Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MS-MLPA) além de identificar a variação no número de cópias, detecta os padrões de metilação das amostras testadas e é considerada padrão ouro para o diagnóstico da síndrome (64).

Estudos realizados comparam pacientes diagnosticados com SSR que apresentavam defeitos na metilação envolvendo ICR1 com outros que apresentavam

dissomia uniparental do cromossomo 7. O primeiro grupo de pacientes apresentou uma frequência maior de clinodactilia do quinto dedo e de anomalias congênitas quando comparado com o segundo. Apresentou também níveis elevados de glicose compatíveis com resistência ao IGF1 (57).

1.4.3 Genes candidatos

Outras etiologias que expliquem a síndrome continuam a ser estudadas. Diagnósticos clínicos muitas vezes não correspondem aos resultados esperados de testes moleculares comuns. Desta forma, aproximadamente 40% dos quadros cuja clínica se encaixa na SSR seguem sem causa genética conhecida (46).

Uma causa proposta recentemente seria oriunda de uma variante patogênica (c.157+5G>A) do IGF2, um fator de crescimento peptídico da família insulínica. Essa variante de *splicing* foi descrita por Xia et al. (2019) em um paciente com clínica pra SSR cujos pais não apresentam a doença (51).

Mutações de ponto em genes que sofrem *imprinting* na região cromossômica 11p15 ou em outros genes conhecidos como causadores de doença também foram descritas em casos de SSR. Em adendo, variações no número de cópias (CNVs) em diferentes regiões cromossômicas também são apontadas como causas para a SSR (65).

A maior parte dos casos de SSR advém de uma alteração genética ou epigenética *de novo*, ou seja, os pais do paciente costumam não apresentar a síndrome, ficando esta restrita ao probando. Desta forma, o risco de recorrência em geral é pequeno, mas pode chegar a até 50%, mostrando assim a importância de se determinar a etiologia da SSR em cada caso (50).

Mutações nos genes *CDKN1C* e *PLAG1* foram identificadas em pacientes com SSR. O gene *CDKN1C*, também relacionado a etiologia das síndromes IMAGE e SBW, regula negativamente a proliferação celular e causa restrição no crescimento. Além disso, está associado a parada no ciclo celular. O gene *PLAG1*, mapeado no cromossomo 8q12,

é um fator de transcrição amplamente expresso durante o desenvolvimento embrionário. Regula a expressão do gene *IGF2* e de outros fatores de crescimento (65, 66, 67).

O gene *HMGA2*, mapeado em 11p13-q15, codifica uma proteína capaz de interagir com o DNA e alterar sua conformação e a transcrição de alguns genes, como o gene *IGF2*. O gene *HMGA2* possui um papel importante na regulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular. Desempenha um papel crucial no crescimento e desenvolvimento, desde a embriogênese (68).

Em alguns casos relatados, alterações envolvendo o gene *HMGA2* são responsáveis pelo retardo no crescimento pré e pós-natal. Interrupções e deleções envolvendo este gene foram identificadas em cerca de trinta pacientes com fenótipo sugestivo de SSR. Além disso, existem relatos de casos de pacientes que apresentavam crescimento exacerbado, obesidade e idade óssea avançada em que duplicações do gene *HMGA2* foram identificadas, reforçando o papel deste gene na regulação do crescimento (69).

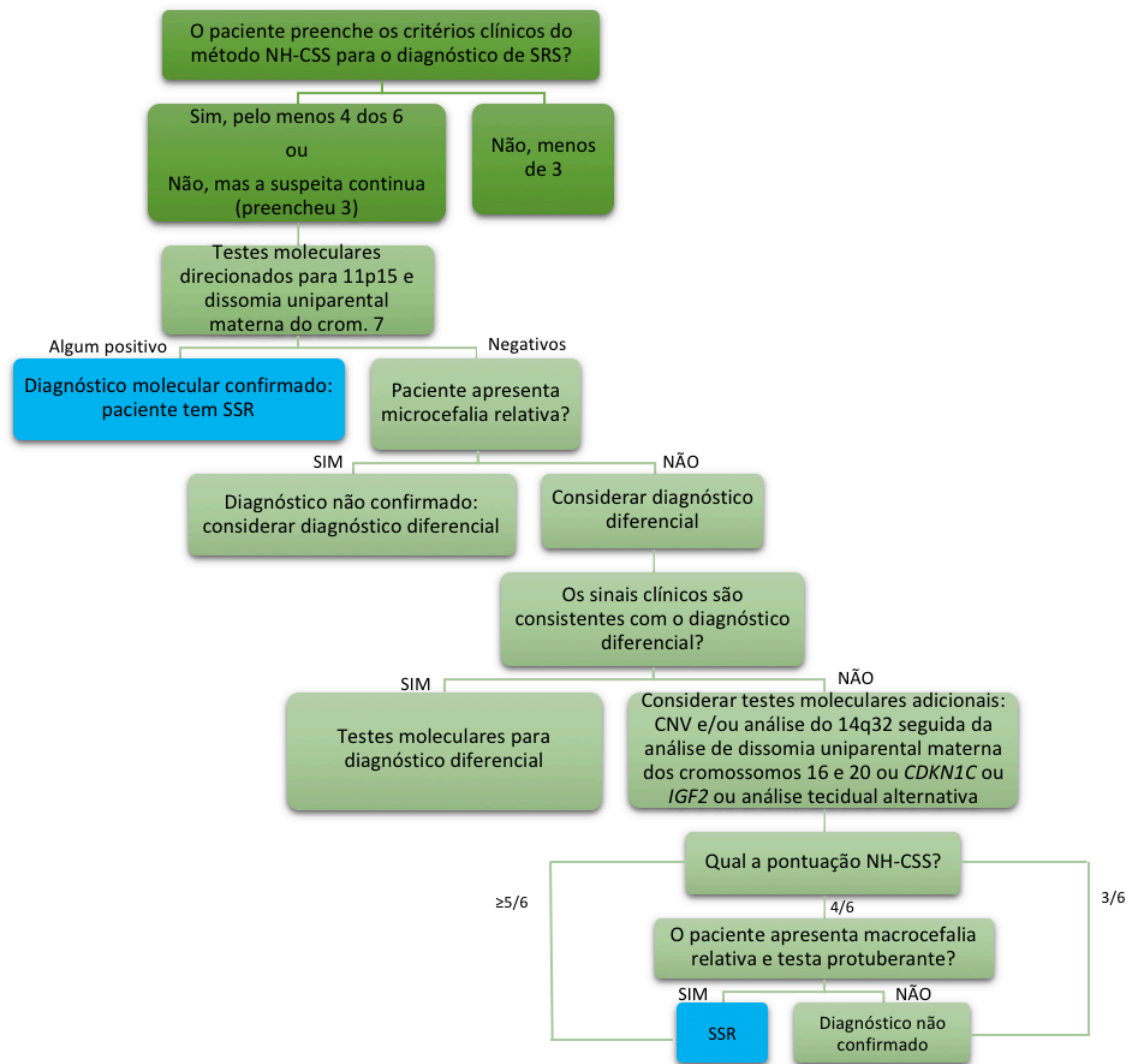
Estudos comparativos têm demonstrado que pacientes com variantes patogênicas de *PLAG1* ou que apresentam matUPD7 costumam apresentar um atraso mais brando no crescimento do que o observado em pacientes com mutações em *HMGA2*, *IGF2* e hipometilação em 11p15. A inclusão de alterações no gene *HMGA2* como etiologia da SSR vêm sendo proposta após a exclusão das causas mais frequentes (66, 70).

1.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O diagnóstico da SSR é realizado quando o paciente apresenta diagnóstico clínico, ou seja, quando apresenta pelo menos quatro dos seis critérios do sistema NH-CSS (Quadro 2) cumulativamente com o diagnóstico por testes moleculares. Como a maior parte dos pacientes já diagnosticados apresenta hipometilação do cromossomo 11p15 ou dissomia uniparental materna do cromossomo 7, estas são as primeiras hipóteses a serem analisadas e testadas (64).

Caso o probando apresente quadro clínico sugestivo de SSR, mas os resultados dos testes citados acima sejam normais, outras regiões cromossômicas podem ser levantadas como causa. Os genes *IGF2*, *CDKN1C*, *PLAG1*, *HMGA2* e outros podem ser analisados por meio de um painel para verificar a existência de alguma variante patogênica (69). O Fluxograma 1 apresenta as etapas a serem seguidas em casos de suspeita de SSR, e que podem levar a confirmação ou exclusão do diagnóstico.

É importante ressaltar que aproximadamente 40% dos casos de SSR apresentam resultados de teste moleculares normais, ou seja, não há uma confirmação molecular. Pacientes nesta situação podem receber o diagnóstico clínico quando outras hipóteses diagnósticas forem descartadas e quando apresentar os dois critérios obrigatórios sugeridos pelo NH-CSS (testa proeminente e macrocefalia relativa ao nascimento). A impossibilidade do fechamento de um diagnóstico conclusivo jamais deve impedir o manejo dos sintomas e sinais apresentados pelo paciente (53).



Fluxograma 1: Esquematização do passo a passo que deve ser seguido quando o paciente apresenta clínica indicativa de SSR, tendo como base o protocolo NH-CSS, para se chegar ao correto diagnóstico da síndrome ou descartá-lo. Adaptada de Saal et al., 2002 (53)

1.5.1 Diagnóstico Diferencial

Alguns sinais característicos da SSR estão presentes em outras síndromes. O diagnóstico diferencial deve ser considerado sempre que estas condições possam ser confundidas com a SSR. As semelhanças e diferenças entre os sinais e sintomas clínicos devem ser avaliadas para evitar um diagnóstico impreciso (71).

O crescimento intrauterino diminuído e a baixa estatura, por exemplo, podem estar presentes em outras condições, que devem ser analisadas como candidatas ao diagnóstico. Displasias ósseas podem ser diferenciadas da SSR pela presença de baixa estatura desproporcional e, neste caso, pode ser solicitado uma avaliação radiológica do esqueleto visando a diferenciação. O crescimento atrasado das estruturas ósseas também está presente tanto em pacientes com SSR como em outras condições (71).

Existem vários quadros ocasionados por desequilíbrios cromossômicos em que o paciente apresenta restrição no crescimento intrauterino bem como baixa estatura e que podem ser facilmente confundidas com a SSR. Por ser algo comum, um diagnóstico diferencial pode ser imprescindível para que não ocorram erros. Um *microarray* cromossômico pode ser útil na identificação de microduplicações e microdeleções bem como na detecção de regiões de homozigose que podem indicar a presença de dissomias uniparentais e doenças recessivas raras em casos de consanguinidade. A síndrome Temple e outras síndromes oriundas de dissomia uniparental dos cromossomos 6, 16 ou 20 podem apresentar quadro clínico similar ao de SSR (53).

Indivíduos com SSR apresentam circunferência da cabeça normal ou macrocefalia relativa. A presença microcefalia exacerbada é um indicativo para a busca de uma etiologia alternativa (53). O Quadro 3 resume as principais condições que podem ser confundidas com SSR e suas principais diferenças da síndrome em questão.

Quadro 3 - Principais doenças que podem ser confundidas com SSR devido a clínica semelhante a esta síndrome. Adaptada de Saal et al, 2002. Continua.

	Doença	Gene(s)	Sinais clínicos adicionais desta doença	
			Semelhantes a SSR	Diferentes da SSR
Doenças monogênicas	Síndrome 3M	<i>CCDC8</i> <i>CUL7</i> <i>OBSL1</i>	Clinodactilia Bossa frontal Macrocefalia relativa Face triangular	Pectus excavatum Hipoplasia de costela Pescoço curto
	Síndrome IMAGE	<i>CDKN1C</i>	Bossa frontal Macrocefalia	Hipoplasia adrenal Insuficiência adrenal Displasia metafisária
	Síndrome Bloom	<i>BLM</i>	Face triangular Clinodactilia do quinto dedo Manchas café com leite	Troca anormal de cromátides irmãs Dolicocefalia Microcefalia
	Síndrome de quebras Nijmegen	<i>NBN</i>	Manchas café com leite	Instabilidade cromossômica Microcefalia Testa inclinada Telangiectasia
	Síndrome de quebras Warsal	<i>DDX11</i>	Clinodactilia do quinto dedo	Instabilidade cromossômica Surdez Microcefalia Testa inclinada Pregas epicânticas Instabilidade cromossômica
	Anemia de Fanconi	>20 genes	Manchas café com leite	Polegares ausentes Microcefalia Anomalias radiais Risco de malignidade aumentado
	Síndrome Meier-Gorlin	<i>CDC45</i> <i>CDC6</i> <i>CDT1</i> <i>GMNN</i> <i>MCM5</i> <i>ORC1</i> <i>ORC4</i> <i>ORC6</i>	Bossa frontal	Palato ausente Microcefalia Microtia Boca pequena

Quadro 3 - Principais doenças que podem ser confundidas com SSR devido a clínica semelhante a esta síndrome. Adaptada de Saal et al, 2002. Conclusão.

	Doença	Gene(s)	Sinais clínicos adicionais desta doença	
			Semelhantes a SSR	Diferentes da SSR
Doenças monogênicas	Resistência ao fator de crescimento 1 semelhante a insulina	<i>IGF1R</i>	Clinodactilia Anomalias dentárias	Atrasos no desenvolvimento Microcefalia Sinofris
Anomalias Cromossômicas	Mixoploidia diploide/triploide		Assimetria de membros	Atrasos no desenvolvimento Microcefalia
	Síndrome Temple		Fenótipo muito semelhante Pequeno para idade gestacional	Difere por testes moleculares Microcefalia
Doenças teratogênicas	Síndrome fetal alcoólica		Crescimento pós-natal comprometido Clinodactilia do quinto dedo	Filtro hipoplásico História de exposição alcoólica na gravidez Pequenas fissuras palpebrais

A SSR é descrita como uma síndrome heterogênea por dois motivos: sua etiologia variada e até hoje não totalmente elucidada; e a diversidade de sinais clínicos descritos, que podem estar presentes em outras doenças. O diagnóstico molecular diferencial é uma ferramenta capaz de auxiliar no diagnóstico.

A perda de metilação de ICR1 no cromossomo 11p15 e a dissomia uniparental materna do cromossomo 7 são as principais causas da SSR, e explicam juntas cerca de 50% a 60% dos casos. Foram descritas alterações em outros genes que podem ajudar a explicar cerca de 1% dos casos restantes. Entretanto, em muitos pacientes a etiologia da SSR permanece indefinida.

CAPÍTULO 2.
OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi compilar dados de pacientes atendidos pelo serviço de genética do HUB-UnB que apresentam fenótipo sugestivo de SSR e relatar o progresso da investigação molecular.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a frequência de pacientes que apresentaram hipometilação do cromossomo 11p15 pela técnica MS-MLPA;

Identificar a frequência de pacientes que apresentaram dissomia uniparental materna do cromossomo 7 por genotipagem de microssatélites;

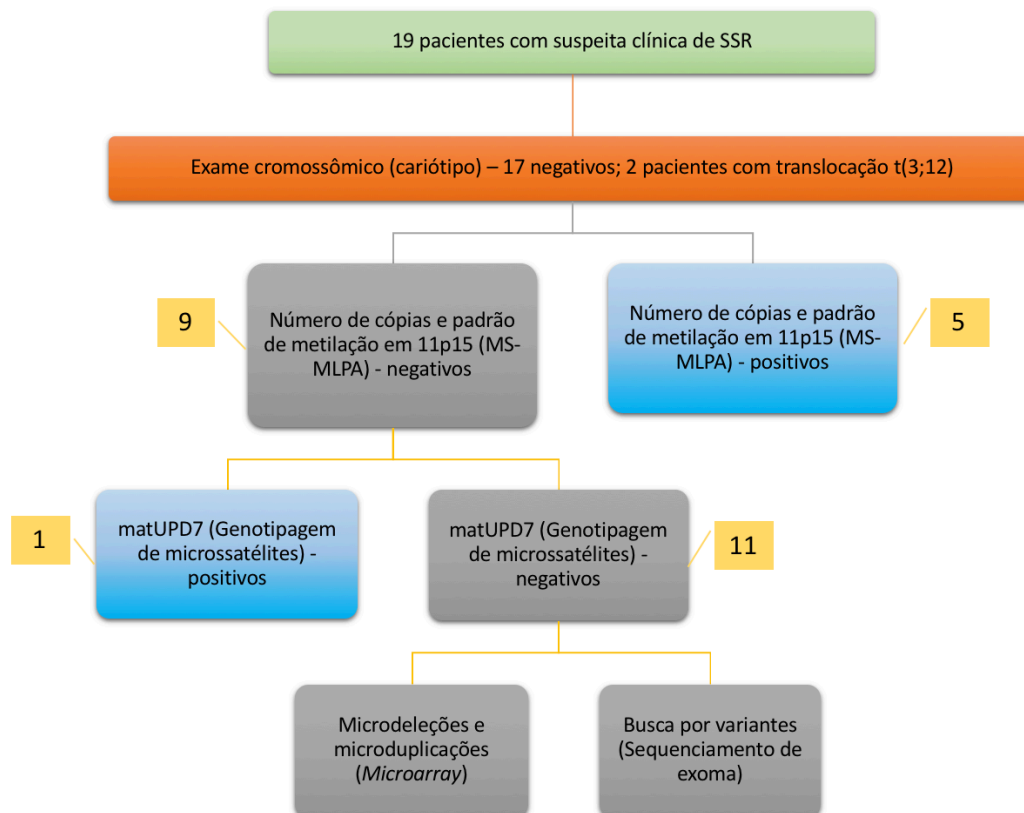
Utilizar metodologias de rastreamento como análise cromossômica por *microarray* e sequenciamento de exoma para determinação da etiologia em pacientes com quadro *SSR-like*.

CAPÍTULO 3.
PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

Para o presente trabalho foram selecionados pacientes com suspeita clínica de síndrome de Silver-Russell atendidos no Hospital Universitário de Brasília. Além de dados inéditos, o trabalho inclui dados que constituíram parte de duas teses de Doutorado (Formigli, LM; 2004 e Bonaldi, A; 2016).

3.1 PACIENTES



Fluxograma 2: Estratégia de realização dos testes moleculares realizados para a investigação de SSR ou síndromes SSR-like no estudo.

Foram selecionados para o estudo pacientes com suspeita clínica de síndrome de Silver-Russell. Foram incluídos dezenove pacientes (10 do sexo masculino e 9 do sexo feminino, sendo duas irmãs gêmeas monozigóticas) atendidos no Ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB - UnB). Os responsáveis legais pelos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética (CAAE nº 11511519.0.0000.5558) em etapas distintas, conforme documentação em anexo.

Indivíduos com suspeita clínica para SSR foram selecionados pela presença de retardo de crescimento intrauterino e pós-natal, face com dismorfias típicas e pelo menos mais um sinal característico. Amostras de 4 a 8 ml de sangue periférico foram coletadas em tubo heparinizado e em tubo contendo *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) como anticoagulante. Os estudos citogenéticos e moleculares foram realizados no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina – UnB e no Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas – UnB, além de outros laboratórios colaboradores.

O Fluxograma 2 apresenta a estratégia de realização dos testes moleculares realizados para a investigação de SSR ou síndromes SSR-*like* utilizada neste estudo.

3.2 MÉTODOS

As amostras de DNA foram extraídas a partir do sangue periférico dos pacientes e quantificadas. O cariótipo foi realizado conforme a rotina do laboratório. A investigação teve início com as buscas por alterações no cromossomo 11, por MS-MLPA e pela investigação de dissomia uniparental materna do cromossomo 7 por genotipagem de microssatélites. Resultados negativos para estas duas alterações frequentes impulsionaram a investigação por microdeleções ou microduplicações genômicas, realizadas por *microarray* ou em alguns casos, a análise por exoma.

3.2.1 Cultura de leucócitos e exame de cariótipo

A cultura de linfócitos de sangue periférico para o cariótipo foi realizada a partir de coleta de sangue em tubo heparinizado, segundo protocolo descrito por Moorhead et al. em 1960 (com modificações). Para o crescimento dos leucócitos, 1mL de sangue total fresco foi misturado a 8mL de meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI), 1,5mL de soro fetal bovino, 300µL de Fitohemaglutinina, 100µL de antibiótico penicilina/estreptomicina e 100 µL de L-Glutamina. Após cerca de 70h em estufa a 37° C foram adicionados 100 µL de Colchicina e a mistura foi levada para a estufa por mais 45 min a 37° C. Terminado o período de crescimento e feita a parada das células na metáfase, a fase de hipotonização foi realizada. O material da estufa foi transferido para dois tubos, deixando cada um com 5,5mL, que foram centrifugados por 6 min a 2000 rotações por minuto (rpm). Em seguida, o sobrenadante foi retirado e a solução de KCL foi acrescentada a 37° C até completar 12mL. Depois de homogeneizado, deixou-se 15 min em estufa a 37° C. Da estufa seguiu-se para a centrifuga por 6 min a 2000 rpm. Depois o sobrenadante foi retirado e deixou-se cerca de 2mL. Para a fixação, foi utilizada a solução fixadora 1:3 de ácido acético e metanol adicionada aos poucos com auxílio de vortex até completar 10mL. Homogeneizou-se bem e levou-se a centrifuga por 6 min a 2000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e o processo de fixação foi repetido por mais 4 vezes. O material pingado nas lâminas foi tratado para bandeamento G utilizando-se tripsina em solução salina e corado com Giemsa. Foram analisadas 30 metáfases de cada paciente. A análise foi realizada pela Dra. Iris Ferrari.

3.2.2 Extração de DNA genômico

A extração de DNA foi realizada segundo o método *Puregene* adaptado. Na etapa de lise celular colocou-se 3mL de sangue total com 9mL de solução de lise RBC (5mM MgCl₂ -1mM EDTA pH 8,0), inverteu-se e incubou-se por 10 min a temperatura ambiente.

Em seguida, a solução foi centrifugada por 10 min a 3400 rpm, o sobrenadante foi removido e vortexou-se o pellet para a ressuspensão. Foram adicionados ao tubo 3 mL de solução de lise celular (SLC) (10mM Tris pH 7,5 – 1mM EDTA pH 8,0 – 1% SDS) misturando-se bem com pipeta até ficar homogêneo. Na etapa de precipitação da proteína, foi adicionado 1mL da solução de precipitação de proteína (NH₄Ac 7,5 M) ao lisado celular. A mistura foi vortexada por 20 seg e centrifugada por 10min a 3400 rpm. Para a fase de precipitação do DNA transferiu-se o sobrenadante para outro tubo contendo 3mL de isopropanol 100%, nessa etapa pode-se observar o “novelo” de DNA. Centrifugou-se novamente por 3 min a 3400 rpm, e em seguida o sobrenadante foi removido. Adicionou-se 3 mL de etanol 70% invertendo-se o tubo para melhor homogeneizar, centrifugou-se por 1 min a 3400 rpm e o sobrenadante foi retirado mais uma vez. Deixou-se secando por 20 min e adicionou-se 200 µL de TE (Tris-HCL 10 mM - EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi armazenado em freezer de 2 a 8° C.

3.2.3 Busca por alterações epi(genéticas) no cromossomo 11

Foram testados por MS-MLPA catorze dos dezoito pacientes com o objetivo de analisar o padrão de metilação e o número de cópias da região 11p15.

As regiões reguladoras de *imprinting* ICR1 e ICR2 do cromossomo 11 foram analisadas quanto ao padrão de metilação por MS-MLPA, uma variante da técnica MLPA. Esta metodologia permite quantificar o número de cópias além de verificar o padrão de metilação das regiões de interesse através da utilização de enzimas de restrição sensíveis a metilação.

O kit SALSA MS-MLPA ME030- SBW/SSR foi utilizado. Este kit contém 42 sondas, sendo 26 para a região 11p15, 10 para prover informações sobre o estado de metilação e 2 específicas para o gene *NSD1*, além de sondas controle. Os experimentos de MS-MLPA foram realizados de acordo com as orientações do fabricante do kit. Para a análise foram utilizadas amostras teste (dos pacientes estudados) e amostras controle (indivíduos fenotipicamente normais).

Etapas das reações de MS-MLPA: 100 ng de DNA genômico foram diluídos em 5 μL de TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM) e desnaturados a 98° C por 10 minutos no termociclador. 1,5 μL de MLPA Buffer e 1,5 μL de SALSA probemix foram adicionados e em seguida, levou-se ao termociclador para nova desnaturação a 95° C por 1 minuto seguida por hibridização overnight a 60° C (durante 16 a 20 horas). No dia seguinte, foram adicionados 10 μL de H₂O e 3 μL de Ligase *Buffer A*, totalizando 20 μL em cada tubo. As amostras foram divididas em igual volume (10 μL), em que uma metade (tubo 1) seguiu para a etapa de ligação enquanto a outra parte (tubo 2) seguiu para a etapa de ligação e digestão com a enzima *Hha I*. Uma mistura de 1,5 μL de Ligase *Buffer B*, 8,25 μL de H₂O e 0,25 μL de enzima Ligase foi adicionada ao tubo 1, enquanto uma mistura de 1,5 μL de Ligase *Buffer B*, 7,75 μL de H₂O, 0,25 μL da enzima Ligase e 0,5 μL da enzima *Hha I* foi adicionada ao tubo 2. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 49° C e 5 minutos a 98° C. Uma amplificação por PCR foi então realizada. 5 μL da reação de ligação do tubo 1 ou do tubo 2, 2,2 μL de SALSA PCR Buffer, 1 μL de iniciadores SALSA PCR, 1 μL de SALSA Enzyme Dilution Buffer, 0,25 μL de SALSA polimerase e 15,75 μL de H₂O foram misturados para formar um volume final de 25 μL , que seguiu para o termociclador. Os tubos passaram por 35 ciclos de amplificação por 30 segundos a 95° C, hibridização a 60° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72° C por 20 minutos.

A eletroforese e análise dos produtos de PCR foi realizada da seguinte forma: cada 1 μL do produto de amplificação diluído em 7 μL de Tween a 0,1%, adicionando-se 0,25 μL do padrão de peso molecular MegaBACE™ ET 550-R *Size Standard*. Os fragmentos foram separados por meio de eletroforese capilar no aparelho MegaBACE™ 1000 (*Amersham Biosciences, GE, Healthcare, UK*) ou no aparelho ABI-3130 (*ThermoFisher Scientific, EUA*). A análise dos valores obtidos foi executada em uma planilha modificada do Excel, desenvolvida para a análise de MLPA ou pelo uso do software Coffalyser (*MRC-Holland*). Em ambos a análise se baseia na normalização dos valores obtidos das amostras teste e controle e a razão dos valores normalizados de cada amostra teste pelos valores normalizados das amostras controle. As análises de número de cópias e de metilação foram realizadas separadamente.

Resultado Coffalyser.Net

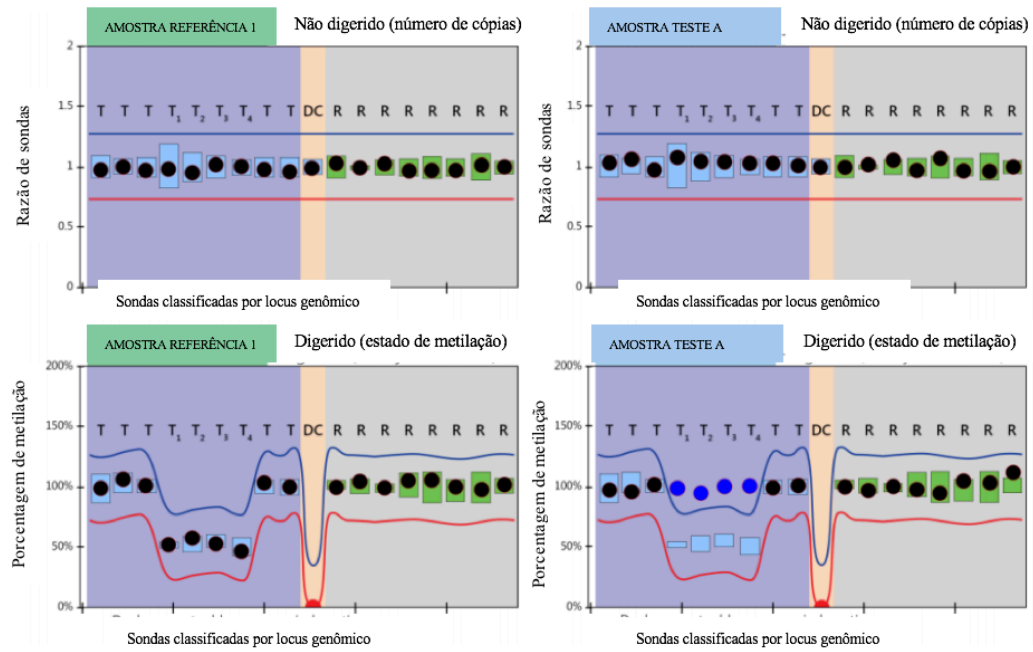


Figura 8: Modelo de análise de dados de MS-MLPA retirado do sítio do fornecedor, comparando o número de cópias (acima) de uma amostra referência (esquerda) com uma amostra teste (direita) e a porcentagem de metilação (abaixo) entre uma amostra referência e uma teste. Os alelos não metilados sofrem digestão pela enzima Hha1, enquanto os metilados continuam na reação e emitem picos. Fonte: Product Description SALSA® MS-MLPA® Probemix ME030-C3 SBW/SSR (74).

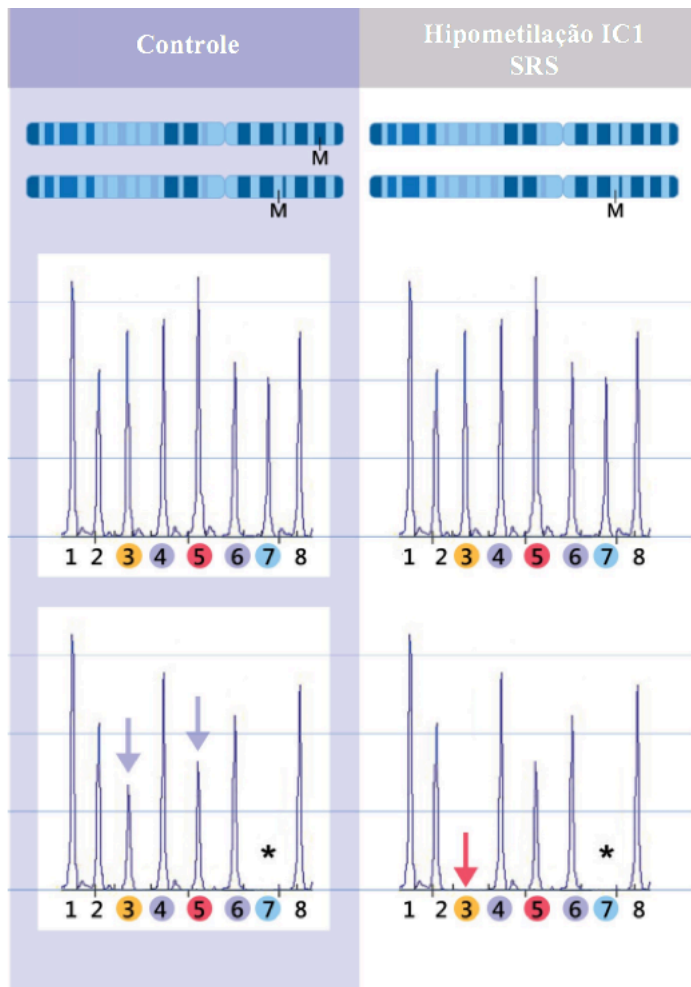


Figura 9: Representação de resultados que podem ser obtidos por eletroforese após MS-MLPA a partir de amostras de pacientes com SSR. Os M representam a metilação nas ICRs. A direita estão amostras controle e a esquerda amostras de pacientes que apresentam hipometilação de C11 (SSR). Acima estão as amostras que não passaram por digestão e são úteis para a análise do número de cópias. Abaixo, a seta vermelha (3) representa a ausência de pico devido a digestão pela enzima Hha1 pela hipometilação da sonda afetada, enquanto as setas lilás indicam a redução de 50% dos picos correspondentes a C11 (3) e C12 (5). O controle de digestão (7) está desmetilado, e não projeta um pico, sendo indicado por um *. Adaptado de: MS-MLPA General Protocol (75).

3.2.4 Busca por alterações no cromossomo 7

Para a investigação da dissomia uniparental materna do cromossomo 7, marcadores polimórficos neste cromossomo foram selecionados a partir de regiões cromossômicas homólogas de camundongo sujeitas a *imprinting* genômico. Os segmentos 7p11.2-p13 do braço curto e 7q21-qter do braço longo do cromossomo 7 foram escolhidos. Foram utilizados dois marcadores do tipo RFLP (Kv-2c e KM-19 - 7q31.2), e marcadores de microssatélite D7S493 (7p15.3), D7S507 (7p21) e D7S513 (7p13); os loci D7S506 (7p12.1), D7S519 (7p13), D7S1870 (7q11.23), D7S515 (7q22.1) e D7S486 (7q31.2) foram analisados de forma auxiliar quando os primeiros resultados não foram informativos. Pacientes que apresentaram um alelo materno e outro paterno em pelo menos um marcador de cada braço do cromossomo 7 foram considerados como tendo herança biparental.

Os marcadores Kv-2c e KM-19 foram analisados por PCR seguido de digestão enzimática com a enzima TaqI (Kv-2c) e Pst I (KM-19) (76). A análise foi feita em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo.

A genotipagem dos loci de microssatélites ocorreu conforme os seguintes passos: iniciadores fluorescentes do kit *ABI PRISM® Linkage Mapping Sets v2.5* (Applied Biosystems, California, USA) foram utilizados para a amplificação por PCR. O volume final de reação foi de 10 µL, contendo entre 50 ng e 100 ng de DNA genômico, 0,8 µL de uma mistura de iniciadores a 10 µM, 1,5 U de Taq polimerase e 0,27 mM dCTP, 0,27 mM dTTP, 0,27 mM dGTP e 0,27 mM de dATP; 10% do volume final, constituído de tampão confeccionado no laboratório (FS-UnB) [300 mM Tris pH = 8,5, 100 mM Hepes (C₈H₁₈O₄S – Sulfato de 2-etil-1-hexanol), 25 mM MgCl₂, 100 mM KCL e 100 mM (NH₄)₂SO₄]. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 12 min a 95° C, 10 ciclos de 15s a 89° C, hibridização a 55° C ou 54° C por 1 s e extensão a 72° C por 30s, seguidos de extensão final a 72° C por 10 min.

A separação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese capilar no aparelho MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences, GE Healthcare), 2 µL de Tween a 0,1% e 0,25 µL do padrão de peso molecular MegaBACE™ ET 550-R Size Standard

foram adicionados a 2 μ L do produto de amplificação. A análise dos produtos de PCR foi feita utilizando o programa *Genetic Profiler* (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

3.2.5 Busca por alterações cromossômicas por *Microarray*

A análise cromossômica por *microarray* (CMA) foi realizada para pacientes com resultados normais por MS-MLPA e genotipagem de microssatélites do cromossomo 7, e que apresentavam casos clínicos complexos a fim de detectar possíveis microdeleções e microduplicações cromossômicas.

A CMA é uma técnica molecular utilizada para a triagem do genoma e a busca de alterações cromossômicas estruturais submicroscópicas (microdeleções e microduplicações). Através da técnica também é possível identificar a perda de heterozigose e elevado grau de mosaicismo. A plataforma CytoScan™ 750k (Affymetrix) foi utilizada.

A técnica consiste na utilização de sondas (oligonucleotídeos), de sequência previamente conhecida, dispostas em um *microchip*. Os chips CytoScan™ 750k apresentam cerca de 750 mil sondas: 550 mil não *polimórficas*, que permitem uma análise em alta resolução de CNVs; e 200 mil sondas *polimórficas*, o que proporciona a análise de SNPs.

O DNA genômico extraído foi normalizado para uma concentração de 50 ng/ μ L, para isso foi diluído em *Low EDTA TE buffer*. O DNA diluído passou uma etapa de digestão, com a enzima de restrição *Nsp I*, seguido da ligação de adaptadores pela enzima *T4 DNA Ligase*. Os primers universais se anelam aos adaptadores durante a etapa posterior de amplificação (PCR) dos fragmentos obtidos. Após a etapa de PCR, o produto amplificado foi capturado com o uso de esferas magnéticas e purificado com tampão de purificação. Em seguida as amostras amplificadas foram quantificadas no espectrofotômetro *Nanodrop® 2000* (Thermo Scientific, EUA), fragmentadas e marcadas com biotina. Posteriormente, para a etapa de hibridação, 200 μ L de cada amostra foram depositados no *GeneChip®*, e estes incubados a 50° C por 16-18h à 60 rpm. Após a

hibridização os chips foram lavados em na estação automatizada *Fluidics Station 450* (Affymetrix, EUA) e marcados com fluoróforo. Os chips foram analisados utilizando o scanner GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) e os dados obtidos foram analisados utilizando o Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software (Affymetrix).

3.2.6 Busca de alterações por Sequenciamento de Exoma

A análise por sequenciamento de exoma foi utilizada em dois casos em que não foi possível detectar alterações que explicassem o quadro clínico utilizando as técnicas anteriores e que apresentavam microcefalia, sinal clínico não sugestivo de SSR.

As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas utilizando-se o kit *SureSelect Human All Exon V6* (Agilent Technologies) e sequenciadas pela *Macrogen Inc.* na plataforma *Illumina HiSeq 4000* com cobertura média de 50 vezes e comprimento de leitura de 2 x 100 pb.

A técnica de sequenciamento de exoma vem sendo cada vez mais utilizada por sua capacidade de detectar diversas alterações no genoma. O sequenciamento de nova geração é aplicado para a detecção de alteração em variantes, permitindo a aplicação de filtros de análise que auxiliam na busca por variantes correlacionadas a alterações patológicas já descritas anteriormente. A Tabela 1 resume os principais critérios a serem utilizados em uma análise de exoma e seu impacto para a predição de evidências patológicas ou benignas. A análise foi realizada de acordo com as orientações do *American College of Medical Genetics and Genomics* em conjunto com a *Association for Molecular Pathology*.

Tabela 1 – Organização dos critérios de classificação de variantes por tipo de evidência e pela força de impacto de cada critério para a classificação benigna ou patológica. Traduzido de Richards et al, 2015. Continua.

	Benigna		Patogênica			
	Forte	de suporte	de suporte	Moderada	Forte	Muito forte
Dados Populacionais	Frequência alélica menor é muito alta para doenças ou observação nos controles é inconsistente com a penetrância de doenças.			Ausente em bases de dados populacionais.	Prevalência estatisticamente maior em afetados do que em controles.	
Dados Computacionais e preditivos		Várias linhas de evidência computacional não sugerem impacto no gene ou sem seu produto. Variante <i>missense</i> em gene em que apenas truncamento ocasiona doença. Variante silenciada sem impactos de <i>splice</i> preditos.	Várias linhas de evidência computacional sugerem um efeito deletério no gene ou em seu produto.	Mudança original <i>missense</i> em um resíduo de aminoácido em que uma mudança patogênica <i>missense</i> já foi reportada. Variante de alteração de comprimento de proteína.	Mesma mudança de aminoácido que a estabelecida em variante patogênica.	Variante nula em gene cuja perda de função é um mecanismo conhecido de doença.
Dados funcionais	Estudos funcionais bem estabelecidos não mostram efeitos deletérios.		<i>Missense</i> em gene com baixa taxa de variantes benignas <i>missense</i> e patogênicas <i>missense</i> comuns.	Ponto de acesso mutacional ou domínio funcional bem estudado sem alterações benignas.	Estudos funcionais bem estabelecidos mostram um efeito deletério.	
Dados de segregação	Sem segregação com doença.		Co-segregação com doença em vários membros afetados em uma família	Aumento dos dados de segregação. Aumento dos dados de segregação.		

Tabela 1 – Organização dos critérios de classificação de variantes por tipo de evidência e pela força de impacto de cada critério para a classificação benigna ou patológica. Traduzido de Richards et al, 2015. Conclusão.

	Benigna		Patogênica			
	Forte	de suporte	Forte	de suporte	Forte	de suporte
Dados de novo				<i>De novo</i> (sem paternidade e maternidade confirmada).	<i>De novo</i> (paternidade e maternidade confirmada).	
Dados alélicos		Observada em trans com uma variante dominante. Observada em cis com uma variante patogênica.		Para doenças recessivas, detectadas em trans com uma variante patogênica.		
Outras bases de dados		Fonte respeitável reporta como benigna, mas não há compartilhamento de dados.	Fonte respeitável indica patogenicidade.			
Outros dados		Encontrada em casos com uma causa alternativa.	Fenótipo do paciente ou histórico familiar muito específico para um gene.			

A análise das variantes foi realizada utilizando a plataforma Franklin (www.genoox.com) para a análise dos dados (78). Durante a análise, foi possível importar os dados de sequenciamento para a ferramenta de análise padrão ou configurar nosso próprio *pipeline*. Uma série de filtros foi aplicada para obter um conjunto de variantes candidatas causadoras de doenças: (1) variantes removidas por filtragem com base na frequência populacional do alelo >1% no *HapMap 20* ou *1.000 Genomes*, ou populações de indivíduos com mais de 80 anos sem condições crônicas comuns sequenciadas na plataforma (*Complete Genomics*); (2) filtragem de predição agregada, reteve variantes com efeitos deletérios; (3) filtragem baseada em impacto funcional reteve apenas

variantes que fossem não sinônimas, *frameshift*, *nonsense*, ou que afetassem sítios canônicos doadores/aceptores de *splicing* (4) filtros de características fenotípicas dos probandos foram utilizados. Após a aplicação dos filtros, uma análise das variantes restantes foi realizada individualmente de acordo com o quadro clínico apresentado e a classificação do ACMG.

Em duas irmãs gêmeas com quadro de SSR portadoras de translocação equilibrada estudadas anteriormente foi realizado o sequenciamento de nova-geração do tipo *mate-pair* descrito em detalhes em Wawruk., 2019. Apenas os resultados finais serão discutidos aqui com o propósito de discutir a causa do quadro clínico nas pacientes.

CAPÍTULO 4.
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados dezenove pacientes com suspeita clínica para a SSR. Deste total, catorze foram investigados pela técnica de MS-MLPA para a busca por alterações no cromossomo 11; doze foram investigados por genotipagem de microssatélites do cromossomo 7; quatro foram investigados por análise cromossômica por *microarray* e dois foram analisados por sequenciamento de exoma.

A Tabela 2 resume o quadro clínico observado nos pacientes que compõem este estudo e apresenta a contagem dos critérios clínicos mais relevantes para o diagnóstico clínico da SSR de acordo com o sistema NH-CSS.

Apenas oito pacientes apresentavam os critérios considerados obrigatórios pelo sistema NH-CSS (macrocefalia relativa e testa proeminente). Três pacientes apresentavam um dos dois sinais e em cinco pacientes pelo menos um dos sinais não havia sido avaliado. Oito pacientes apresentavam três ou mais sinais optativos.

Tabela 2 - Sinais clínicos exibidos pelos pacientes e contagem de acordo com o *Netchine-Harbison Clinical Scoring System* (NH-CSS). Continua.

Paciente	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
Sinal clínico																			
RCIU	+	+	+	+	+	#	+	+	+	#	+	+	+	+	#	+	#	+	+
Atraso no fechamento de fontanelas	+	-	#	#	#	#	#	#	-	#	+	#	#	#	-	#	-	#	#
Macrocefalia relativa ao nascimento	+	-	+	+	+	-	+	#	-	#	-	+	+	+	+	#	#	-	#
Testa proeminente	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	#	+	-	-
Fronte abaulada	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	#	+	-	-
Face triangular	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Micrognatia/ queixo pequeno	+	+	+	-	+	-	+	+	+	#	-	#	#	#	-	#	-	#	-
Cantos da boca voltados para baixo	-	+	+	-	+	#	+	-	+	#	+	#	#	+	-	#	-	#	+
Déficit de crescimento	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NA	#	+	-	+	+
Assimetria de membros	+	+	#	+	-	-	-	+	+	+	+	#	#	+	-	-	+	-	-
Assimetria tronco	-	+	#	+	-	#	-	-	-	-	-	#	#	-	-	-	+	#	-
Clinodactilia	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Sindactilia	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Braquidactilia	-	+	+	#	-	#	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sudorese excessiva	+	+	#	+	-	-	#	#	-	#	+	-	-	-	-	+	-	#	-
Atraso na fala	-	-	#	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-	-
Atraso no desenvolvimento motor	#	-	#	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	#	-	-	-
Atraso cognitivo	-	-	#	-	-	+	-	#	+	#	-	-	-	-	-	#	-	-	-
Dificuldade de aprendizagem	-	-	#	-	-	+	-	#	+	#	#	-	-	-	-	#	-	-	-
Anomalias geniturinárias	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	#	-	#	-
Resistência à insulina	#	#	#	#	#	#	#	#	+	#	-	#	#	#	#	#	-	#	#
Dificuldades de alimentação	-	-	#	-	#	-	-	+	-	-	-	-	-	#	#	+	-	+	-
Hipoglicemia de Jejum	+	#	#	+	#	#	+	#	#	-	+	#	#	-	-	#	-	#	#
Voz aguda	-	-	#	NA	-	+	#	#	-	-	-	-	-	#	#	#	-	#	#
Apinhamento dental	-	+	#	NA	#	-	+	-	-	+	#	#	#	#	#	#	-	#	-

Tabela 2 - Sinais clínicos exibidos pelos pacientes e contagem de acordo com o *Netchine-Harison Clinical Scoring System* (NH-CSS). Conclusão.

Paciente	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
Sinal clínico																			
Escoliose	-	#	#	-	-	+	#	#	-	-	-	-	-	#	#	#	-	#	-
Puberdade precoce	NA	NA	NA	NA	-	#	#	NA	-	#	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-
Refluxo gastroesofágico	-	-	#	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	#	#	-	-	+	-
Vômitos	-	-	#	-	-	-	-	#	-	+	-	+	+	#	#		-	#	-
Constipação	-	-	#	-	-	-	-	#	-	-	-	-	-	#	#	+	-	+	-
Outros																			
Convulsões	-	+	#	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Hipertensão pulmonar	-	-	-	+	-	-	-	#	-	#	#	-	-	#	-	#	-	+	-
Cardiopatía	-	-	-	+	-	-	-	#	-	-	-	-	-	-	-	#	-	+	-
Mancha(s) café com leite	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	#	#	#	-
Microcefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	#	-	+	-
Deficiência intelectual	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doença policística renal	#	#	#	#	#	#	#	#	+	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
Tumor de Wilms	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	#	#
Diabetes	#	#	#	#	#	#	#	#	+	#	#	#	#	#	#	-	#	#	#
Pele enrugada	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-
Face progeroide	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	#	-	-
Lipoatrofia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	#	#	#
Insuficiência pancreática	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	#	-	-	-
Surdez	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sinais obrigatórios NH-CSS	2	1	2	2	2	1	2	1	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	0
Sinais optativos NH-CSS	3	3	2	3	2	1	2	4	3	1	3	2	2	2	0	3	1	3	2

Legenda: + presente; - ausente; # não avaliado; NA não se aplica; em amarelo: sinais obrigatórios (varia de 0 a 2), de acordo com o NH-CSS; em azul: sinais optativos (varia de 0 a 4), de acordo com o NH-CSS

4.1 BUSCA POR ALTERAÇÕES EPI(GENÉTICAS) NO CROMOSSOMO 11

As alterações no padrão de metilação e as variações do número de cópias nos centros de *imprinting* ICR1 e ICR2 em 11p15 foram investigadas por MS-MLPA. A Tabela 3 resume os resultados dos exames moleculares de cada paciente e a conclusão diagnóstica.

Na amostra de dezenove pacientes com suspeita de diagnóstico para SSR, catorze foram analisadas quanto ao padrão de metilação em 11p15. Detectamos hipometilação de ICR1 em cinco destes pacientes (35,71%). Nos demais pacientes testados, não identificamos alteração no número de cópias ou no padrão de metilação.

4.1.1 Hipometilação de ICR1

A frequência (35,71%) de pacientes com fenótipo de SSR em que a hipometilação de ICR1 em 11p15 foi identificada está de acordo com a literatura, que estima a frequência entre 35 a 50% (53). Os testes de MS-MLPA foram realizados somente em DNA genômico extraído de sangue periférico. Conforme alguns estudos já destacaram, as alterações de metilação ocorrem após a fertilização e podem resultar em uma distribuição em mosaico, ou seja, apenas alguns tecidos ou células poderiam apresentar padrões de metilação alterados (80). Desta forma, o número de pacientes que apresentou resultado positivo para hipometilação de ICR1 pode estar subestimado, já que apenas o sangue periférico foi analisado. Alguns pesquisadores sugerem que outros tecidos sejam testados quanto às alterações de metilação, no entanto, esses estudos não são realizados rotineiramente.

Tabela 3 – Resultados dos testes de genotipagem de microssatélites do cromossomo 7, MS-MLPA, análise cromossômica por *microarray*, sequenciamento de exoma e conclusão diagnóstica dos pacientes deste estudo.

Paciente	MatUPD7	Hipometilação ICR1 paterna	Microarray	Exoma	Sequenciamento <i>mate-pair</i>	Conclusão diagnóstica
A	+					SSR
B	-	+				SSR
C	-	+				SSR
D	-	+				SSR
E	-	-				Indefinido
F	-	-				Indefinido
G	-	-				Indefinido
H	-	+				SSR
I				Alteração <i>PIK3R1</i>		Síndrome SHORT
J	-	-	Sem alterações			Indefinido
K	-	-				Indefinido
L	-		Sem alterações		Interrupção <i>HMGA2</i>	SSR
M	-		Sem alterações		Interrupção <i>HMGA2</i>	SSR
N	-	+				SSR
O	-	-	Sem alterações			Indefinido
P	-	-				Indefinido
Q		-				Indefinido
R				Alteração <i>POC1A</i>		Síndrome SOFT
S	-	-				Hipótese de SSR excluída clinicamente

Legenda: +, alteração presente; -, alteração ausente.

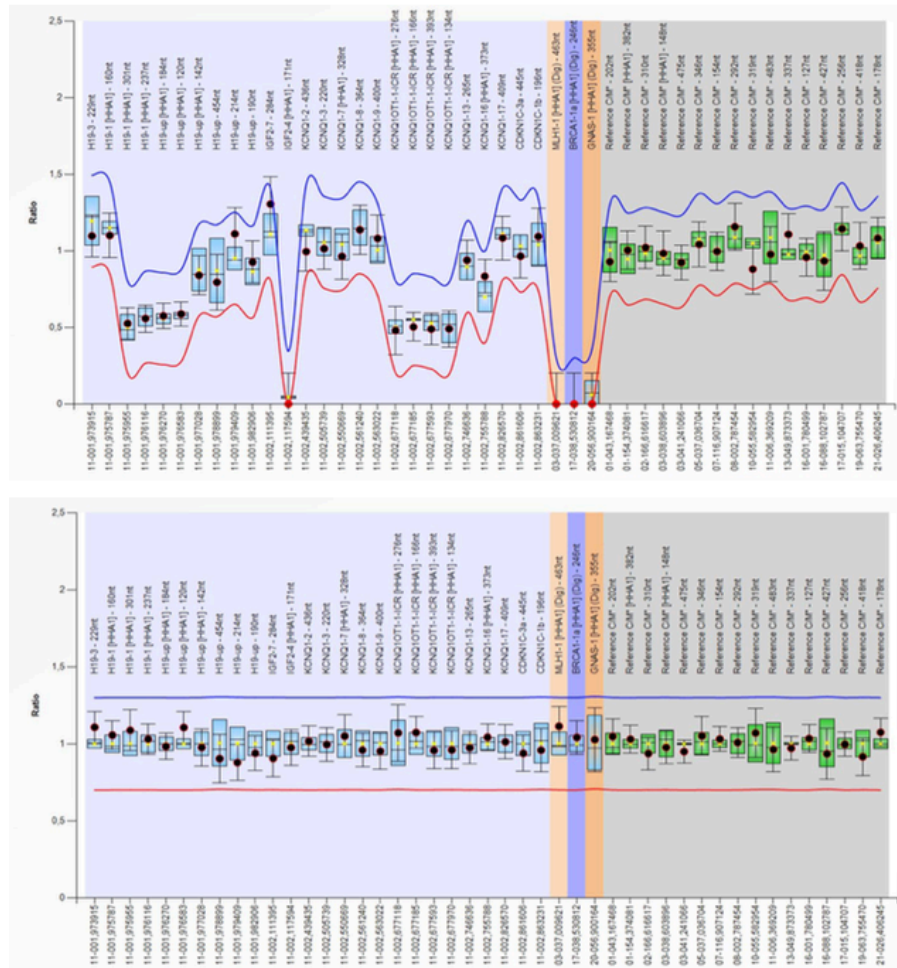


Figura 10: Resultado normal para o padrão de metilação em ICR1 (amostra digerida, acima) e número de cópias (amostra não digerida, abaixo).

4.2 BUSCA POR DISSOMIA UNIPARENTAL MATERNA

A análise por marcadores de microssatélites foi realizada de forma prévia (Formigli, 2004) ou simultânea à análise dos padrões de metilação do cromossomo 11, a partir do DNA genômico extraído do sangue periférico dos pacientes. Doze pacientes compuseram a amostra investigada por este método e apenas uma paciente desta amostra apresentou isodissomia uniparental materna do cromossomo 7. Os outros pacientes apresentaram resultados dos marcadores compatíveis com a herança

biparental. A Tabela 4 resume os resultados obtidos pela investigação de matUPD7 nos pacientes com SSR.

Tabela 4 – Resumo dos resultados da investigação de matUPD7 nos pacientes com SSR obtidos por genotipagem de microssatélites. O sinal + representa a presença do sítio para a enzima de restrição e o sinal – representa sua ausência. Os alelos apresentados referentes aos marcadores de microssatélites representam o tamanho dos mesmos em pares de bases. M- Mãe; C- Criança; P- Pai

Paciente	XV-2c 7q31.1	KM-19 7q31.2	D7S493 7p15.3	D7S507 7p21	D7S513 7p13	D7S506 7p12.1	D7S519 7p13	D7S1870 7q11.23	D7S515 7q22.1	D7S486 7q31.2	Resultado
A	M: +/+ C: +/+ P: +/-	M: +/- C: -/- P: +/+	M: 214/222 C: 222/222 P: 210/214	M: 153/157 C: 157/157 P: 155/165	M: 177/183 C: 177/177 P: 195/197						matUPD7
B	M: ∅ C: +/+ P: +/-	M: ∅ C: +/- P: +/-	M: ∅ C: 196/218 P: 195/195	M: ∅ C: 151/157 P: 155/157	M: ∅ C: 181/183 P: 181/191						Biparental
C	M: +/- C: -/- P: ∅	M: -/- C: -/- P: ∅	M: 203/214 C: 195/214 P: ∅	M: 153/159 C: 153/165 P: ∅	M: 183/191 C: 191/193 P: ∅						Biparental
D	M: -/- C: +/- P: +/-	M: +/- C: +/+ P: +/+	M: 203/214 C: 214/214 P: 196/214	M: 151/153 C: 151/153 P: 151/161	M: 185/199 C: 181/199 P: 181/193						Biparental
E	M: -/- C: +/- P: +/-	M: +/- C: +/+ P: +/+	M: 203/214 C: 214/214 P: 195/214	M: 151/153 C: 151/153 P: 151/161	M: 185/199 C: 181/199 P: 181/193						Biparental
F			M: 208/218 C: 195/218 P: 195/195	M: 155/161 C: 155/155 P: 155/155	M: 189/197 C: 195/197 P: 195/195						Biparental
G	M: +/+ C: +/+ P: +/+	M: ? C: -/- P: -/-	M: 195/208 C: 195/216 P: 209/216	M: 149/155 C: 155/165 P: 163/165	M: ? C: 199/199 P: 195/199						Biparental
H	M: +/- C: +/- P: +/-	M: ? C: +/+ P: +/-	M: 200/226 C: 221/226 P: 215/221	M: 147/151 C: 147/151 P: 151/157	M: 183/193 C: 193/195 P: 195/195						Biparental
J	M: +/+ C: +/+ P: +/+	M: -/- C: -/- P: ?	M: 199/214 C: 199/214 P: 214/220	M: 159/163 C: 159/161 P: 161/163	M: 195/199 C: 195/195 P: 193/195						Biparental
K	M: +/- C: +/+ P: +/-	M: ? C: ? P: +/-	M: 214/214 C: 209/214 P: 209/220	M: 153/165 C: 153/163 P: 163/163	M: 195/199 C: 195/197 P: 195/197						Biparental
N	M: ? C: +/+ P: +/+	M: -/- C: -/- P: +/-	M: 201/209 C: 207/209 P: 207/215	M: 151/161 C: 151/161 P: 151/151	M: 177/185 C: 177/185 P: 177/187						Biparental
S			M: 1-2 C: 1-3 P: 3-4			M: 2-3 C: 2-4 P: 1-4	M: 2-2 C: 1-2 P: 1-2	M: 1-2 C: 2-2 P: 2-3	M: 3-3 C: 1-3 P: 1-2	M: 2-3 C: 2-4 P: 1-4	Biparental

Foram testados para UPD7 doze dos dezoito pacientes com suspeita de SSR. Como uma paciente apresentou isodissomia uniparental materna no cromossomo 7, a frequência de dissomia uniparental foi de 8,33% em nossa amostra. Este dado é compatível com a frequência de casos relatados pela literatura (53).

A matUPD7 foi reportada pela primeira vez em 1994, em um estudo sobre uma paciente que apresentava deficiência de crescimento, tornando-se a primeira causa identificada de SSR (81). Por isso, muitos estudos de pacientes com SSR realizaram inicialmente a investigação para UPD e só posteriormente a análise de metilação em 11p15. O presente trabalho reúne dados de tese de Doutorado concluída em 2004 que realizou exclusivamente a análise da UPD7 e, por esse motivo alguns pacientes foram testados apenas para essa alteração (Formigli, 2004).

Atualmente, a hipometilação de ICR1 no cromossomo 11p15 é reconhecida como a causa mais comum de SSR. Ela foi descrita pela primeira vez em 2000, por Kosaki e posteriormente reforçada por Fisher em 2002 (revisado em Eggermann, 2005). Com base na frequência de alterações, hoje a análise de metilação 11p15 usualmente precede a pesquisa da UPD7. Além disso, para a pesquisa da UPD é necessário material dos genitores o que em alguns casos não é possível. Apesar de se utilizar marcadores de microssatélite altamente polimórficos esses podem ser não informativos e o resultado final ser inconclusivo.

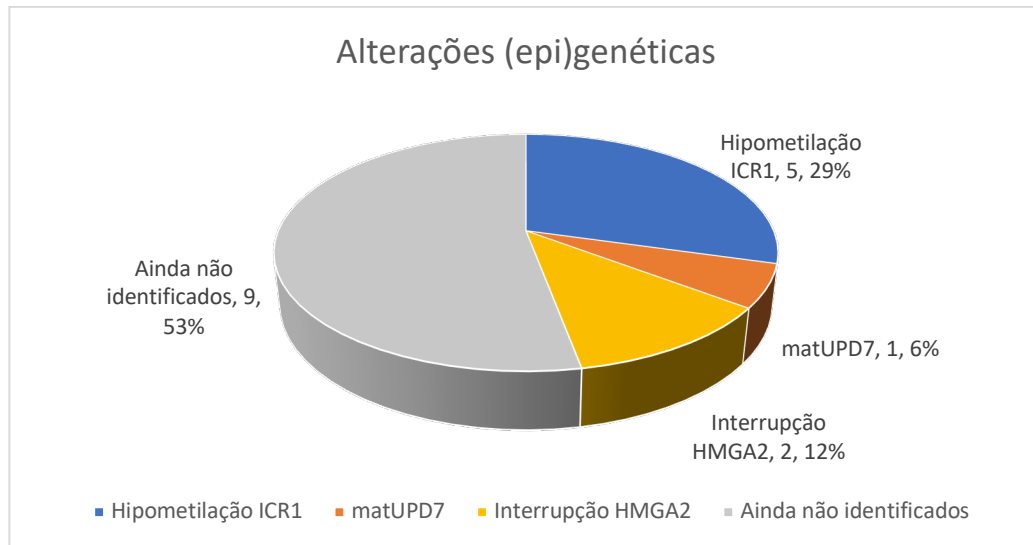


Gráfico 1: Alterações epigenéticas e genéticas encontradas nos pacientes com fenótipo sugestivo para SSR através dos resultados dos testes moleculares analisados. Note a frequência maior entre os casos de hipometilação de ICR1 no cromossomo 11p15.5 e os casos de dissomia uniparental materna no cromossomo 7.

4.3 PESQUISA DE MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES POR CMA

A técnica de análise cromossômica por *microarray* foi empregada na investigação de microduplicações e microdeleções cromossômicas submicrocópicas potencialmente relacionadas a SSR. As amostras dos pacientes analisadas por este método foram selecionadas a partir das que tiveram resultado negativo tanto nas análises do cromossomo 11p15 por MS-MLPA como na busca por dissomias uniparentais maternas do cromossomo 7 e que apresentavam quadros clínicos complexos.

Quatro pacientes foram investigadas por CMA, as pacientes J, L, M e O. Em nenhum dos casos testados foram detectadas alterações de número de cópias possivelmente patogênicas. O CMA não é o primeiro método de escolha para a busca por alterações causadoras da SSR. Entretanto, microdeleções envolvendo regiões relacionadas a etiologia de SSR, tais como ICR1 em 11p15 e 12q14.3 já foram descritas

(70, 83). Desta forma, o CMA pode ser utilizado como método de detecção para SSR de forma acessória, ou pode ser aplicado para o diagnóstico diferencial.

4.4 ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO DE EXOMA

Da nossa amostra de dezenove pacientes, duas foram estudadas por sequenciamento de exoma. As duas pacientes, apesar de portarem fenótipo similar ao descrito de pacientes com SSR, apresentavam microcefalia, sinal atípico da SSR.

O sequenciamento de exoma permite a detecção de variantes patogênicas em genes cuja função apresenta relação com o fenótipo observado no paciente. Nos dois casos foi possível identificar uma alteração patogênica associada ao fenótipo, como descrito abaixo.

4.4.1 Paciente I

A paciente I começou a ser acompanhada pelo serviço de genética do HUB-UnB aos 22 dias de vida. Durante o seguimento do caso, foi constatada a presença de deficiência intelectual leve, baixa estatura (sempre abaixo do 3º percentil), baixo peso (sempre abaixo do 3º percentil), microcefalia (sempre abaixo do 3º percentil), hirsutismo facial, esclera azulada, pequenas fissuras palpebrais, lábios superiores finos, orelhas grandes e displásicas e micrognatia.

Apresenta ainda prega palmar única na mão esquerda, dedos delgados, clinodactilia do quinto dedo, unhas hiperconvexas e pele enrugada, principalmente nas mãos. Seus dedos dos pés são curtos, com intervalo aumentado entre o primeiro e segundo pododáctilos e sindactilia do segundo e terceiro dedos. Ela também tem amenorreia primária. A avaliação oftalmológica não revelou alterações.

Alguns dos sinais clínicos apresentados pela paciente, tais como baixa estatura de início pré-natal, dismorfias faciais e clinodactilia de quinto dedo, direcionaram a investigação de alterações relacionadas a SSR. Porém, desde a primeira consulta foi notada uma aparência progeroide. Além disso, a paciente apresentava um achado atípico para a SSR: a microcefalia. Estes dois achados em conjunto com as outras características apresentadas pela paciente e os resultados negativos para SSR obtidos por testes moleculares de MS-MLPA sugeriam outro diagnóstico.

O sequenciamento de exoma revelou uma nova variante missense em heterozigose, c. 1456G> A (p.Ala486Thr) no gene *PIK3R1* (NM_181523.3), mapeado no cromossomo 5q13.1.

Variantes no gene *PIK3R1* estão associadas à síndrome SHORT, uma síndrome genética extremamente rara relatada em menos de cinquenta casos até o momento (84). SHORT é um acrônimo formado pelas iniciais de suas características mais comuns em inglês: baixa estatura (*Short stature*), hiperextensibilidade articular (*Hyperextensibility of joints*), depressão ocular (*Ocular depression*), anomalia de Rieger (*Rieger anomaly*) e atraso na dentição (*Teething delay*). A síndrome apresenta grande variabilidade clínica e vários outros sinais clínicos podem estar presentes nos afetados (85).

O gene *PIK3R1* codifica a subunidade reguladora de fosfatidilinositol 3-quinase alfa e produz três diferentes isoformas de proteínas regulatórias, que podem estar envolvidas na regulação hormonal e de fatores de crescimento. Além disso, este gene também contribui para a formação de uma subunidade enzimática conhecida como PI3K, responsável por sinalizar o crescimento celular, proliferação, migração, metabolismo, sobrevivência e apoptose (86).

A paciente apresenta resistência à insulina e diabetes. Os impactos no metabolismo celular envolvendo a enzima PI3K parecem englobar a atividade da insulina, o que pode explicar esta resistência seguida de emergência do diabetes. Variantes que afetam o gene *PIK3R1* podem prejudicar a via PI3K / AKT / mTOR, inibindo a proliferação celular e o crescimento. Essa via também sinaliza para receptores do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1), o que explica a presença de baixa estatura, RCIU e perda auditiva em muitos casos (87).

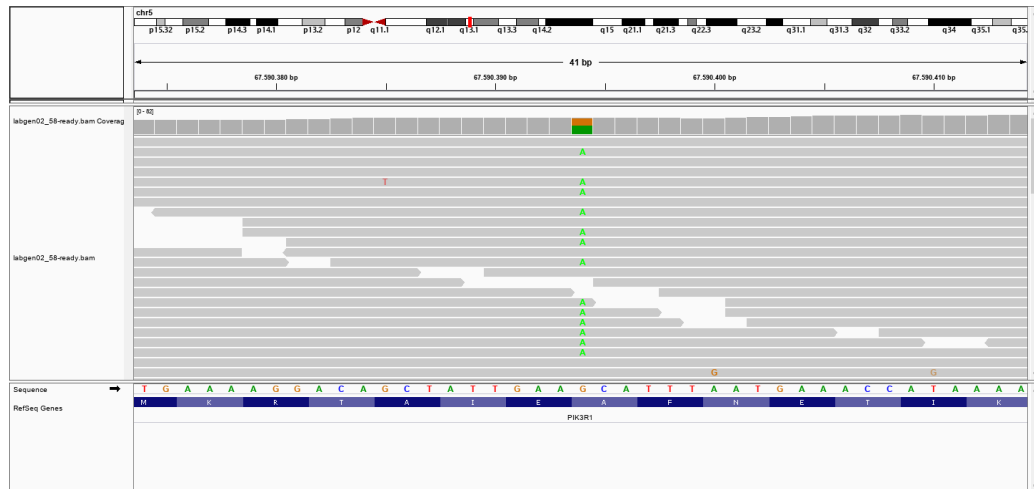


Figura 11: Imagem obtida pelo programa IGV após análise por sequenciamento de exoma da paciente I mostrando a variante identificada na paciente (verde).

4.4.2 Paciente R

A paciente R apresenta restrição do crescimento intrauterino, microcefalia, baixa estatura, e baixo peso. Além disso, foi constatada a presença de clinodactilia do quinto dedo, cardiopatia congênita, cifose dorsal, lordose lombar e falha de fusão óssea na região lombar.

A análise de exoma revelou uma alteração em homozigose deletéria de significado incerto c.2T>C no gene *POC1A* nas regiões chr3:52,188,376-52,188,398 (NM_015426.4). Esta variante ainda não foi descrita na literatura, mas alterações no gene *POC1A* são responsáveis pela síndrome SOFT, compatível com o quadro clínico exibido pela paciente (88).

A síndrome SOFT é uma doença de herança autossômica recessiva caracterizada por redução grave do comprimento dos ossos longos, dismorfias faciais, cabelo esparsa e anomalias nas unhas. SOFT também é um acrônimo formado no inglês por **S**hort stature, **O**nychodysplasia, **F**acial dysmorphism, and **H**ypotrichosis. A ossificação carpal e vertebral é atrasada. Além disso, o crescimento pré e pós-natal, assim como na SSR, é

prejudicado. Outras características em comum entre as duas síndromes são: testa proeminente, face triangular, clinodactilia, braquidactilia e voz aguda (89).

Em relação a circunferência craniana, a microcefalia apresentada pela paciente R está no rol dos sinais clínicos já descritos para a síndrome SOFT, embora alguns pacientes apresentem macrocefalia durante a infância ou dolicocefalia. O gene *POC1A*, mapeado na região 3p21.2, codifica a proteína POC1, importante para a formação dos cílios e de corpos basais (89).

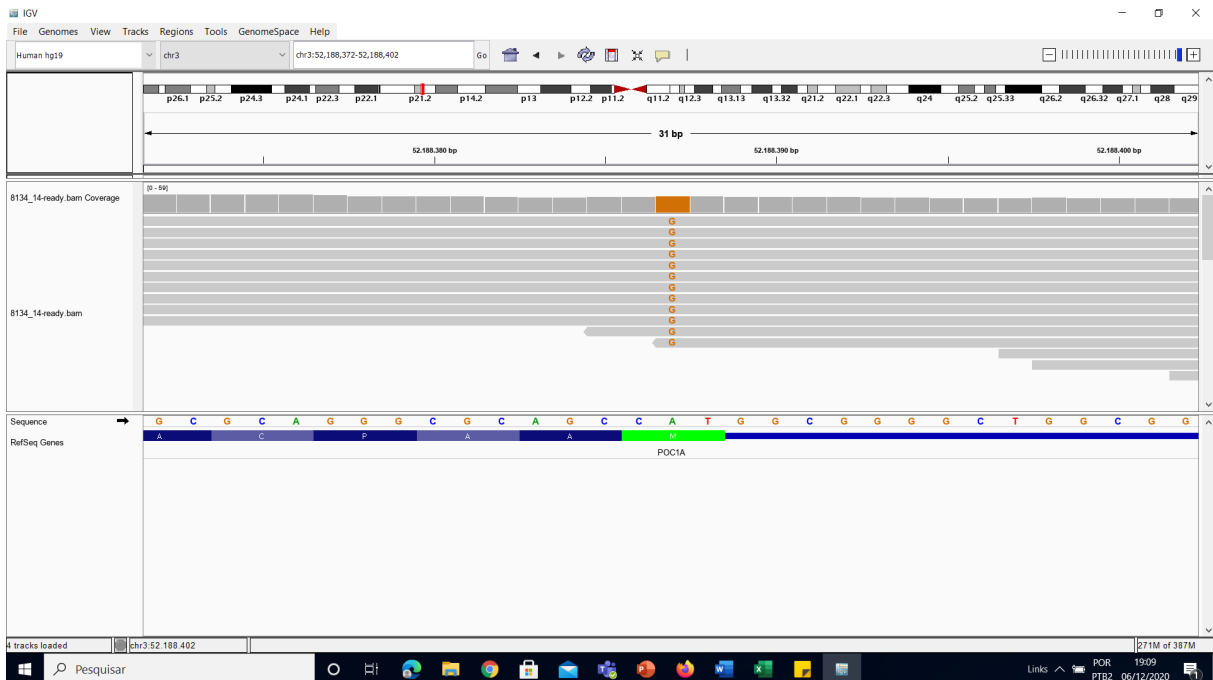


Figura 12: Imagem obtida pelo programa IGV após análise por sequenciamento de exoma da paciente R, mostrando a variante identificada na paciente (verde).

4.5 TRANSLOCAÇÃO ENTRE CROMOSSOMO 3 E CROMOSSOMO 12

As pacientes L e M são irmãs gêmeas monozigóticas, filhas de pais não consanguíneos, com quadro típico de SSR.

Ao exame de cariótipo, uma translocação entre os cromossomos 3 e 12 foi identificada nas duas irmãs. O resultado foi descrito como 46,XX,t(3;12)(q29;q14) *de novo*. Foi então realizado um sequenciamento mate-pair para identificação dos pontos de quebras nos dois cromossomos envolvidos.

O ponto de quebra no cromossomo 3 está localizado em chr3:174,961,172-174,963,250 (hg38). Essa região está dentro na banda 3q26.31 e interrompe o gene *N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase-Like 2 (NAALADL2)*. Já o ponto de quebra presente no cromossomo 12 tem sua posição na região cromossômica chr12:65,849,728-65,851,528 (hg38), que faz parte da banda 12q14.3 e interrompe o gene *High Mobility Group At-Hook 2 (HMGA2)* (90).

O gene *NAALADL2* tem importante papel no sistema nervoso central atuando na liberação de glutamato na fenda sináptica. Por outro lado, o gene *HMGA2* codifica um fator de transcrição arquitetônico altamente expresso no desenvolvimento embrionário envolvido no crescimento e proliferação celular. O *HMGA2* regula a expressão de *IGF2*, um gene causador da SSR. Perda de função e grandes deleções em *HMGA2* já foram relatadas em alguns pacientes com fenótipo de SSR (91, 92).

O gene *HMGA2* é um gene causador de SSR e, em pacientes sem UPD7 e defeitos de metilação em 11p15, deve-se considerar a pesquisa de variantes em *HMGA2*.

O diagnóstico diferencial para SSR inclui todas as doenças que apresentam sinais clínicos em comum aos apresentados por pacientes com SSR, em especial as doenças capazes de gerar um quadro de RCIU e de baixa estatura. Sinais clínicos que contradizem os relatados na literatura de casos de SSR sinalizam que é provável se tratar de outra condição. Por exemplo, um indivíduo que apresenta baixa estatura desproporcional exclui a hipótese de SSR e sugere o diagnóstico para displasia óssea que imita a SSR. Uma investigação óssea deve ser realizada para confirmar o diagnóstico de displasia (93).

O quadro clínico de pacientes com SSR possui uma interseção com várias outras patologias, sendo necessária a aplicação do diagnóstico diferencial em alguns casos. O Quadro 3 foi adaptado de Saal et al., 2002 e apresenta apenas algumas destas doenças. Entretanto, quando um pesquisador se depara com a suspeita de que outra síndrome possa explicar o quadro apresentado pelo paciente, a consulta a literatura deve ser aprofundada, pois quadros como o apresentado não cobrem 100% das hipóteses diagnósticas. Isto pode ser facilmente percebido ao considerar o diagnóstico final das pacientes I e R. As duas tinham inicialmente uma hipótese diagnóstica de SSR e, após uma análise mais profunda de cada caso, foram testadas por sequenciamento de exoma e diagnosticadas com síndrome SHORT e síndrome SOFT, respectivamente. Nenhuma destas duas síndromes estava listada no Quadro 3.

A partir dos resultados obtidos por testes moleculares, fomos capazes de confirmar o diagnóstico de SSR de nove pacientes da nossa amostra inicial de dezenove pacientes. Duas pacientes foram diagnosticadas com outras síndromes. A confirmação molecular de nove dos dezesseis pacientes (56,25%) testados para SSR não foi possível, o que já é esperado e não significa que estes pacientes não apresentem SSR. Esta frequência sem causa identificada está próxima a relatada na literatura de casos de SSR com causa desconhecida (cerca de 40%). Deve-se levar em consideração que nem todos estes pacientes foram testados para hipometilação do cromossomo 11p15 por MS-MLPA e para matUPD7 por genotipagem de microssatélites.

A amostra de DNA do paciente Q não foi testada por genotipagem de microssatélites do cromossomo 7 para verificar se há dissomia uniparental. A amostra do paciente S deverá ser testada por sequenciamento de exoma após a hipótese de SSR ter sido descartada clinicamente. As amostras dos pacientes E, F, G, J, K e O também poderão ser analisadas por sequenciamento de exoma a depender da qualidade de DNA genômico verificada. Como algumas amostras já não apresentam concentração adequada para estes testes, o sangue periférico destes pacientes deverá ser coletado novamente, se possível, para permitir o prosseguimento das investigações.

É provável que esta porcentagem de pacientes sem diagnóstico molecular diminua a medida que os pacientes ainda não testados sigam o Fluxograma 2 de exames moleculares e que os pacientes cuja suspeita clínica persista, apesar dos resultados

negativos, passem por testes mais específicos. Além dos casos com causa não identificada, algumas limitações técnicas devem ser consideradas: os DNAs extraídos há mais tempo já não possuem a qualidade necessária para a performance de um sequenciamento de exoma, por exemplo.

Das nossas dezenove amostras testadas para SSR, três delas tiveram esta hipótese diagnóstica descartada, uma delas com base em dados clínicos. Das dezesseis amostras restantes, cinco apresentaram hipometilação na região de *imprinting* 11p15 e uma apresentou matUPD7, compatíveis com a etiologia de SSR.

Dos oito pacientes em que foi possível confirmar o diagnóstico por exame molecular, dois apresentavam apenas 1 dos sinais obrigatórios (B, N) e em um paciente (H) 1 dos sinais não havia sido avaliado. Três pacientes que apresentavam os sinais obrigatórios (E, G, O) não tiveram a hipótese de SSR confirmada pelos exames realizados.

Cada teste molecular tem suas vantagens e suas desvantagens, bem como seus próprios propósitos. Ao escolher o exame apropriado, o médico deve levar em conta vários aspectos, como por exemplo sua viabilidade, seu custo, as condições econômicas do paciente, etc. A suspeita clínica deve embasar também a sua escolha: se o fenótipo indica a presença da SSR o médico deve começar a investigar pelas causas clássicas com exames direcionados a encontrá-las, como o MS-MLPA para a região 11p15 seguido da genotipagem por microssatélites do cromossomo 7. A princípio, não há necessidade de pedir exames complexos ou mais elaborados. A partir dos resultados obtidos pode-se partir para uma busca ainda mais específica, conforme outras causas já descritas na literatura.

É indispensável esclarecer que o manejo clínico e o seguimento com equipe multidisciplinar devem ser realizados independentemente da confirmação molecular. Desta forma, é imprescindível acompanhar as curvas de crescimento, examinar os membros buscando alguma assimetria de comprimento, buscar anomalias geniturinárias e demais anormalidades e acompanhar o desenvolvimento neurocognitivo. (65).

O acompanhamento multidisciplinar se faz necessário devido ao grande espectro de sintomas associado a SSR, exigindo cuidados específicos de cada profissional da saúde. Normalmente o time é composto por endocrinologista pediátrico,

gastroenterologista, nutricionista ou nutrólogo, geneticista clínico, especialista craniofacial, ortopedista, neurologista, terapeuta ocupacional e psicólogo (65).

Crianças que apresentam SSR com a presença de baixa estatura ou de dismorfismos podem estar mais sensíveis à sua imagem corporal, o que pode impactar na autoestima e nas suas relações sociais, especialmente com outras crianças. Desta forma, além do acompanhamento psicológico, o seguimento com um endocrinologista é importante para a discussão sobre a possibilidade de introdução de hormônios do crescimento no tratamento (65).

O uso de hormônios do crescimento em crianças com crescimento intrauterino prejudicado tem demonstrado um aumento significativo no crescimento destas e na sua estatura final. Alguns estudos demonstraram que além de auxiliar no crescimento, estes hormônios são capazes de melhorar a composição corporal, ajudar no desenvolvimento psicomotor e reduzir os riscos de hipocalcemia, mas não têm impacto na desigualdade de comprimentos de membros (65).

Além do controle do crescimento, o endocrinologista pode detectar sinais de puberdade prematura e de resistência a insulina, que devem ser monitorados. A hipoglicemia deve ser prevenida ou remediada caso já esteja em curso. A atividade física regular e guiada é essencial para o controle de casos de hipotonia (65).

O risco de recorrência da SSR costuma ser baixo, principalmente quando a SSR é oriunda de hipometilação do cromossomo 11p15 ou de dissomia uniparental materna do cromossomo 7. Na maioria destas famílias, a SSR fica restrita a um indivíduo, que passou por uma alteração genética ou epigenética *de novo*. Variações no número de cópias do cromossomo 7 ou 11 ou variantes patogênicas intragênicas apresentam um risco aumentado de recorrência que pode chegar a 50%, a depender da natureza da mutação e do gênero parental de origem (65, 94). A determinação correta dos riscos está diretamente ligada a confirmação molecular do diagnóstico, mostrando assim a importância da realização desses testes.

4.6 CONCLUSÃO

Dos dezenove pacientes com fenótipo sugestivos de SSR, a confirmação molecular para SSR foi possível em oito pacientes. A frequência de hipometilação do cromossomo 11p15 (35,71%) e de dissomia uniparental (8,33%) em nossa amostra de pacientes está de acordo com as respectivas frequências relatada na literatura - 30 a 60% e 5 a 10%, respectivamente. Além disso, duas pacientes gêmeas apresentavam uma translocação cromossômica t(3;12) envolvendo o gene *HMGA2*, um dos genes causativos de SSR.

A análise por sequenciamento de exoma permitiu o correto diagnóstico diferencial de duas pacientes, uma diagnosticada com a síndrome SHORT e a outra com a síndrome SOFT, ressaltando a importância da análise clínica detalhada, da consulta à literatura e da utilização de métodos mais abrangentes em casos atípicos.

A etiologia da SSR é desconhecida em cerca de 40% dos casos da literatura. Em nove pacientes investigados molecularmente (47,37%), não foi possível a identificação de uma alteração que explicasse o quadro clínico. Deve ser considerado que nem todas as amostras foram testadas em relação ao padrão de metilação de 11p15 e genotipagem de microssatélites do cromossomo 7. Além disso, as técnicas de análise cromossômica por *microarray* e de sequenciamento de exoma ainda podem ser utilizadas em investigações futuras. Portanto, alguns pacientes com fenótipo suspeito para SSR seguem sem um diagnóstico definido.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pianka, Mark A et al. (2018) “Close yet so far away: a look into the management strategies of genetic imprinting disorders.” *American journal of stem cells*; vol. 7,4 72-81. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6261869/> [Acesso em: 14 outubro 2019]
2. Barlow, D. P., & Bartolomei, M. S. (2014). Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(2), a018382. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382> [Acesso em: 27 novembro 2019]
3. Elhamamsy, A. Role of DNA methylation in imprinting disorders: an updated review. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2017; vol. 34(5), 549–562. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5427654/> [Acesso em: 16 outubro 2019]
4. Jambhekar, A., Dhall, A., & Shi, Y. (2019). Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(10), 625–641. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1> [Acesso em: 07 agosto 2020]
5. Borchiellini, M., Ummarino, S., & Di Ruscio, A. (2019). The Bright and Dark Side of DNA Methylation: A Matter of Balance. *Cells*, 8(10), 1243. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8101243> [Acesso em: 23 setembro 2020]
6. Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., & Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 429(6994), 900–903. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature02633> [Acesso em: 07 novembro 2020]

7. Tucci, V., Isles, A. R., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A. C., & Erice Imprinting Group (2019). Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell*, 176(5), 952–965. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.043> [Acesso em: 16 dezembro 2020]

8. Seisenberger, S., Peat, J. R., & Reik, W. (2013). Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. *Current opinion in cell biology*, 25(3), 281–288. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.02.013> [Acesso em: 16 dezembro 2020]

9. Zeng, Y., & Chen, T. (2019). DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. *Genes*, 10(4), 257. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes10040257> [Acesso em: 16 dezembro 2020]

10. Hanna, C. W., Demond, H., & Kelsey, G. (2018). Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Human reproduction update*, 24(5), 556–576. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy021> [Acesso em: 16 dezembro 2020]

11. Agrawal, K., Das, V., Vyas, P., & Hajdúch, M. (2018). Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology & therapeutics*, 188, 45–79. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.006> [Acesso em: 02 dezembro 2020]

12. Li, E., & Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(5), a019133. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133> [Acesso em: 13 setembro 2020]

13. Farhadova, S., Gomez-Velazquez, M., & Feil, R. (2019). Stability and Lability of Parental Methylation Imprints in Development and Disease. *Genes*, 10(12), 999. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes10120999> [Acesso em: 14 setembro 2020]

14. Li, X., Li, M. J., Yang, Y., & Bai, Y. (2019). Effects of reprogramming on genomic imprinting and the application of pluripotent stem cells. *Stem cell research*, 41, 101655. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101655> [Acesso em: 12 novembro 2020]
15. Edwards, C. A., Takahashi, N., Corish, J. A., & Ferguson-Smith, A. C. (2019). The origins of genomic imprinting in mammals. *Reproduction, fertility, and development*, 31(7), 1203–1218. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD18176> [Acesso em: 23 julho 2020]
16. Ferguson-Smith, A. C., & Bourc'his, D. (2018). The discovery and importance of genomic imprinting. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.42368> [Acesso em: 04 novembro 2020]
17. Kalish, J. M., Jiang, C., & Bartolomei, M. S. (2014). Epigenetics and imprinting in human disease. *The International journal of developmental biology*, 58(2-4), 291–298. Disponível em: <https://doi.org/10.1387/ijdb.140077mb> [Acesso em: 30 setembro 2020]
18. Grafodatskaya, D., Choufani, S., Basran, R., & Weksberg, R. (2017). An Update on Molecular Diagnostic Testing of Human Imprinting Disorders. *Journal of pediatric genetics*, 6(1), 3–17. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1593840> [Acesso em: 20 outubro 2020]
19. Park, K. S., Mitra, A., Rahat, B., Kim, K., & Pfeifer, K. (2017). Loss of imprinting mutations define both distinct and overlapping roles for misexpression of IGF2 and of H19 lncRNA. *Nucleic acids research*, 45(22), 12766–12779. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx896> [Acesso em: 05 julho 2020]
20. Kalsner, L., & Chamberlain, S. J. (2015). Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 Duplication Syndromes. *Pediatric clinics of North America*, 62(3), 587–606. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.03.004> [Acesso em: 10 setembro 2020]

21. Negishi, Y., Ieda, D., Hori, I., Nozaki, Y., Yamagata, T., Komaki, H., Tohyama, J., Nagasaki, K., Tada, H., & Saitoh, S. (2019). Schaaf-Yang syndrome shows a Prader-Willi syndrome-like phenotype during infancy. *Orphanet journal of rare diseases*, 14(1), 277. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1249-4> [Acesso em: 13 outubro 2020]

22. Angulo, M. A., Butler, M. G., & Cataletto, M. E. (2015). Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. *Journal of endocrinological investigation*, 38(12), 1249–1263. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0312-9> [Acesso em: 17 setembro 2020]

23. Margolis, S. S., Sell, G. L., Zbinden, M. A., & Bird, L. M. (2015). Angelman Syndrome. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 12(3), 641–650. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0361-y> [Acesso em: 13 fevereiro 2020]

24. Bird L. M. (2014). Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *The application of clinical genetics*, 7, 93–104. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/TACG.S57386> [Acesso em: 09 abril 2020]

25. Carli, D., Riberi, E., Ferrero, G. B., & Mussa, A. (2020). Syndromic Disorders Caused by Disturbed Human Imprinting. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 12(1), 1–16. Disponível em: <https://doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2019.2018.0249> [Acesso em: 14 outubro 2020]

26. Kirioukhova, O., Shah, J. N., Larsen, D. S., Tayyab, M., Mueller, N. E., Govind, G., Baroux, C., Federer, M., Gheyselinck, J., Barrell, P. J., Ma, H., Sprunck, S., Huettel, B., Wallace, H., Grossniklaus, U., & Johnston, A. J. (2018). Aberrant imprinting may underlie evolution of parthenogenesis. *Scientific reports*, 8(1), 10626. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27863-7> [Acesso em: 10 novembro 2019]

27. Cassidy, S. B., Schwartz, S., Miller, J. L., & Driscoll, D. J. (2012). Prader-Willi syndrome. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 14(1), 10–26. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/gim.0b013e31822bead0> [Acesso em: 19 agosto 2019]

28. Wang, T. S., Tsai, W. H., Tsai, L. P., & Wong, S. B. (2019). Clinical characteristics and epilepsy in genomic imprinting disorders: Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome. *Ci ji yi xue za zhi = Tzu-chi medical journal*, 32(2), 137–144. Disponível em: https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_103_19 [Acesso em: 17 abril 2020]

29. Butler M. G. (2017). Clinical and genetic aspects of the 15q11.2 BP1-BP2 microdeletion disorder. *Journal of intellectual disability research: JIDR*, 61(6), 568–579. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jir.12382> [Acesso em: 08 abril 2020]

30. McCarthy, J., Lupo, P. J., Kovar, E., Rech, M., Bostwick, B., Scott, D., Kraft, K., Roscioli, T., Charrow, J., Schrier Vergano, S. A., Lose, E., Smiegel, R., Lacassie, Y., & Schaaf, C. P. (2018). Schaaf-Yang syndrome overview: Report of 78 individuals. *American journal of medical genetics. Part A*, 176(12), 2564–2574. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40650> [Acesso em: 28 novembro 2020]

31. Valadares, L. P., Meireles, C. G., De Toledo, I. P., Santarem de Oliveira, R., Gonçalves de Castro, L. C., Abreu, A. P., Carroll, R. S., Latronico, A. C., Kaiser, U. B., Guerra, E., & Lofrano-Porto, A. (2019). MKRN3 Mutations in Central Precocious Puberty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the Endocrine Society*, 3(5), 979–995. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/js.2019-00041> [Acesso em: 28 novembro 2020]

32. Touati, A., Errea-Dorronsoro, J., Nouri, S., Halleb, Y., Pereda, A., Mahdhaoui, N., Ghith, A., Saad, A., Perez de Nanclares, G., & H'mida Ben Brahim, D. (2019). Transient neonatal diabetes mellitus and hypomethylation at additional imprinted loci: novel ZFP57 mutation and review on the literature. *Acta diabetologica*, 56(3), 301–307. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1239-3> [Acesso em: 19 novembro 2020]

33. Temple, I. K., & Mackay, D. (2005). Diabetes Mellitus, 6q24-Related Transient Neonatal. In M. P. Adam, GeneReviews®. University of Washington, Seattle. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1534/> [Acesso em: 26 novembro 2020]

34. Zammit, M. A., Agius, S. M., & Calleja-Agius, J. (2017). Transient Neonatal Diabetes Mellitus: A Challenge and Opportunity for Specialized Nursing Care. *Neonatal network: NN*, 36(4), 196–205. Disponível em: <https://doi.org/10.1891/0730-0832.36.4.196> [Acesso em: 27 novembro 2020]

35. Iyigun, F., Ozcan, B., Kulali, F., Celik, I. H., Cetinkaya, S., Bas, A. Y., & Demirel, N. (2017). A Newborn with Transient Diabetes Mellitus Accompanied by Ketoacidosis Attributable to a ZFP57 Mutation. *Journal of tropical pediatrics*, 63(5), 399–401. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/tropej/fmx005> [Acesso em: 27 novembro 2020]

36. Eggermann, T., Oehl-Jaschkowitz, B., Dicks, S., Thomas, W., Kanber, D., Albrecht, B., Begemann, M., Kurth, I., Beygo, J., & Buiting, K. (2017). The maternal uniparental disomy of chromosome 6 (upd(6)mat) "phenotype": result of placental trisomy 6 mosaicism?. *Molecular genetics & genomic medicine*, 5(6), 668–677. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mgg3.324> [Acesso em: 27 novembro 2020]

37. Šedivá, M., Laššuthová, P., Zámečník, J., Sedláčková, L., Seeman, P., & Haberlová, J. (2020). Novel variant in the KCNK9 gene in a girl with Birk Barel syndrome. *European journal of medical genetics*, 63(1), 103619. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.01.009> [Acesso em: 28 novembro 2020]

38. Graham, J. M., Jr, Zadeh, N., Kelley, M., Tan, E. S., Liew, W., Tan, V., Deardorff, M. A., Wilson, G. N., Sagi-Dain, L., & Shalev, S. A. (2016). KCNK9 imprinting syndrome—further delineation of a possible treatable disorder. *American journal of medical genetics. Part A*, 170(10), 2632–2637. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37740> [Acesso em: 28 novembro 2020]

39. Beygo, J., Mertel, C., Kaya, S., Gillessen-Kaesbach, G., Eggermann, T., Horsthemke, B., & Buiting, K. (2018). The origin of imprinting defects in Temple syndrome and comparison with other imprinting disorders. *Epigenetics*, 13(8), 822–828. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1514233> [Acesso em: 28 novembro 2020]

40. Luk H. M. (2016). Temple syndrome misdiagnosed as Silver-Russell syndrome. *Clinical dysmorphology*, 25(2), 82–83. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MCD.0000000000000114> [Acesso em: 28 novembro 2020]

41. Ogata, T., & Kagami, M. (2016). Kagami-Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region. *Journal of human genetics*, 61(2), 87–94. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.113> [Acesso em: 28 novembro 2020]

42. Altmann, J., Horn, D., Korinth, D., Eggermann, T., Henrich, W., & Verlohren, S. (2020). Kagami-Ogata syndrome: an important differential diagnosis to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of clinical ultrasound: JCU*, 48(4), 240–243. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcu.22815> [Acesso em: 28 novembro 2020]

43. Linglart, A., Levine, M. A., & Jüppner, H. (2018). Pseudohypoparathyroidism. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 47(4), 865–888. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.07.011> [Acesso em: 26 novembro 2020]

44. Cianferotti, L., & Brandi, M. L. (2018). Pseudohypoparathyroidism. *Minerva endocrinologica*, 43(2), 156–167. Disponível em: <https://doi.org/10.23736/S0391-1977.17.02768-7> [Acesso em: 26 novembro 2020]

45. Sarathi, V., & Wadhwa, R. (2020). Albright Hereditary Osteodystrophy. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559141/> [Acesso em: 26 novembro 2020]

46. Öunap K. (2016). Silver-Russell Syndrome and Beckwith-Wiedemann Syndrome: Opposite Phenotypes with Heterogeneous Molecular Etiology. *Molecular syndromology*, 7(3), 110–121. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000447413> [Acesso em: 23 setembro 2020]

47. Cabrera-Salcedo, C., Kumar, P., Hwa, V., & Dauber, A. (2017). IMAGE and Related Undergrowth Syndromes: The Complex Spectrum of Gain-of-Function CDKN1C Mutations. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 14(3), 289–297. Disponível em: <https://doi.org/10.17458/per.vol14.2017.SKHD.imageandrelatedundergrowth> [Acesso em: 20 julho 2020]

48. Brioude, F., Kalish, J. M., Mussa, A., Foster, A. C., Bliiek, J., Ferrero, G. B., Boonen, S. E., Cole, T., Baker, R., Bertolotti, M., Cocchi, G., Coze, C., De Pellegrin, M., Hussain, K., Ibrahim, A., Kilby, M. D., Krajewska-Walasek, M., Kratz, C. P., Ladusans, E. J., Lapunzina, P., Maher, E. R. et al. (2018). Expert consensus document: Clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith-Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(4), 229–249. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.166> [Acesso em: 14 julho 2020]

49. Weksberg, R., Shuman, C. & Beckwith, J. Beckwith–Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 18, 8–14 (2010). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.106> [Acesso em: 16 outubro 2020]

50. Silver-Russell Syndrome. Disponível em: <https://www.omim.org/entry/180860> [Acesso em: Nov 2019]

51. Xia, C. L. et al. Rare De Novo IGF2 Variant on the Paternal Allele in a Patient With Silver-Russell Syndrome. *Frontiers in genetics*, 2019; 10, 1161. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6872539/> [Acesso em: 08 janeiro 2020]

52. Russell-Silver syndrome. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/russell-silver-syndrome> [Acesso em: novembro 2019].

53. Saal, H., Harbison, M., Netchine, I. Silver-Russell Syndrome. *GeneReviews*, 2002; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1324/> [Acesso em: 05 dez 2019].

54. Marsaud, C., Rossignol, S., Tounian, P., Netchine, I., & Dubern, B. (2015). Prevalence and management of gastrointestinal manifestations in Silver-Russell syndrome. *Archives of disease in childhood*, 100(4), 353–358. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305864> [Acesso em: 28 outubro 2020]

55. Cammarata-Scalisi, F., Callea, M., Stock, F., Zambito, V., Sparago, Á., & Riccio, A. (2020). Silver-Russell syndrome. Clinical and etiopathological aspects of a model genomic imprinting entity. *Síndrome de Silver-Russell. Archivos argentinos de pediatría*, 118(3), e258–e264. Disponível em: <https://doi.org/10.5546/aap.2020.eng.e258> [Acesso em: 03 dezembro 2020]

56. Zhang, C., Hao, S., Zhang, Q., Liu, F., Zhou, B., Xuan, F., Xing, W., Chen, X., Wang, Y., Ma, P., Cao, Z., & Ma, X. (2020). Maternal UPD of chromosome 7 in a patient with Silver-Russell syndrome and Pendred syndrome. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34(9), e23407. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.23407> [Acesso em: 03 dezembro 2020]

57. Wakeling, E. L., Amero, S. A., Alders, M., Blik, J., Forsythe, E., Kumar, S., Lim, D. H., MacDonald, F., Mackay, D. J., Maher, E. R., Moore, G. E., Poole, R. L., Price, S. M., Tangeraas, T., Turner, C. L., Van Haelst, M. M., Willoughby, C., Temple, I. K., & Cobben, J. M. (2010). Epigenotype-phenotype correlations in Silver-Russell syndrome. *Journal of medical genetics*, 47(11), 760–768. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079111> [Acesso em: 17 outubro 2020]

58. Hannula-Jouppi, K., Muurinen, M., Lipsanen-Nyman, M., Reinius, L. E., Ezer, S., Greco, D., & Kere, J. (2014). Differentially methylated regions in maternal and paternal uniparental disomy for chromosome 7. *Epigenetics*, 9(3), 351–365. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/epi.27160> [Acesso em: 25 outubro 2020]

59. Ghafouri-Fard, S., Esmaeili, M., & Taheri, M. (2020). H19 lncRNA: Roles in tumorigenesis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 123, 109774. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109774> [Acesso em: 23 novembro 2020]

60. Simion, V., Haemmig, S., & Feinberg, M. W. (2019). LncRNAs in vascular biology and disease. *Vascular pharmacology*, 114, 145–156. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.01.003> [Acesso em: 23 novembro 2020]

61. Soellner, L., Kraft, F., Sauer, S., Begemann, M., Kurth, I., Elbracht, M., & Eggermann, T. (2019). Search for cis-acting factors and maternal effect variants in Silver-Russell patients with ICR1 hypomethylation and their mothers. *European journal of human genetics: EJHG*, 27(1), 42–48. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0269-1> [Acesso em: 28 novembro 2020]

62. Eggermann, Thomas et al. (2010) Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet journal of rare diseases* vol. 5 19. Disponível em: [doi:10.1186/1750-1172-5-19](https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-19) [Acesso em: 20 janeiro 2020]

63. Eggermann, T. et al. (2016). Prenatal molecular testing for Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: a challenge for molecular analysis and genetic counseling. *European journal of human genetics: EJHG*, 24(6), 784–793. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.224> [Acesso em: 27 janeiro 2020]

64. Russo, S., Calzari, et al. (2016). A multi-method approach to the molecular diagnosis of overt and borderline 11p15.5 defects underlying Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes. *Clinical epigenetics*, 8, 23. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0183-8> [Acesso em: 25 novembro 2020]

65. Kraft, F., Wessler, K., Begemann, M., Kurth, I., Elbracht, M., & Eggermann, T. (2019). Novel familial distal imprinting centre 1 (11p15.5) deletion provides further insights in imprinting regulation. *Clinical epigenetics*, 11(1), 30. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0629-x> [Acesso em: 23 outubro 2020]

66. Inoue T, Nakamura A, Iwahashi-Odano M, Tanase-Nakao K, Matsubara K, Nishioka J, Maruo Y, Hasegawa Y, Suzumura H, Sato S, Kobayashi Y, Murakami N, Nakabayashi K, Yamazawa K, Fuke T, Narumi S, Oka A, Ogata T, Fukami M, Kagami (2020) Phenotype of genetically confirmed Silver-Russell syndrome beyond childhood. *Journal of medical genetics*, 57(10), 683–691. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106561> [Acesso em: 04 dezembro 2020]

67. Suntharalingham, J. P., Ishida, M., Buonocore, F., Del Valle, I., Solanky, N., Demetriou, C., Regan, L., Moore, G. E., & Achermann, J. C. (2019). Analysis of CDKN1C in fetal growth restriction and pregnancy loss. *F1000Research*, 8, 90. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.15016.2> [Acesso em: 17 setembro 2020]

68. Liu, D., Wang, Y., Yang, X. A., & Liu, D. (2017). De Novo Mutation of Paternal IGF2 Gene Causing Silver-Russell Syndrome in a Sporadic Patient. *Frontiers in genetics*, 8, 105. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00105> [Acesso em: 25 novembro 2020]

69. HIGH MOBILITY GROUP AT-HOOK 2. Disponível em: <https://www.omim.org/entry/600698?search=hmga2&highlight=hmga2#mapping> [Acesso em: 20 março 2020]

70. Mercadante, F., Busè, M., Salzano, E., Fragapane, T., Palazzo, D., Malacarne, M., & Piccione, M. (2020). 12q14.3 microdeletion involving HMGA2 gene cause a Silver-Russell syndrome-like phenotype: a case report and review of the literature. *Italian journal of pediatrics*, 46(1), 108. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13052-020-00866-9> [Acesso em: 14 novembro 2020]

71. Vado, Y., Errea-Dorronsoro, J., Llano-Rivas, I., Gorria, N., Pereda, A., Gener, B., Garcia-Naveda, L., & Perez de Nanclares, G. (2018). Cri-du-chat syndrome mimics Silver-Russell syndrome depending on the size of the deletion: a case report. *BMC medical genomics*, 11(1), 124. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0441-z> [Acesso em: 15 novembro 2020]

72. Formigli, L. Análise citogenética e molecular em portadores de síndrome de Silver-Russell e seus progenitores [Doutorado]. Universidade de Brasília; 2004.

73. Bonaldi, A. Investigação de mecanismos genéticos e epigenéticos em distúrbios do crescimento humano [Doutorado]. Universidade de São Paulo; 2016.

74. MS-MLPA General Protocol, MRC Holland®. Disponível em: <https://www.mrcholland.com/product/ME030/419> [Acesso em: 10 novembro 2020]

75. Product Description SALSA® MS-MLPA® Probemix ME030-C3 BWS/RSS, MRC Holland®. Disponível em: <https://www.mrcholland.com/product/ME030/419> [Acesso em: 10 novembro 2020]

76. Repetto, G. M., Puga, A. R., & Delgado, I. (2007). XV-2c and KM.19 haplotype analysis in Chilean patients with cystic fibrosis and unknown CFTR gene mutations. *Biological research*, 40(2), 223–229. Disponível em: <https://doi.org/10.4067/s0716-97602007000200013> [Acesso em: 05 dezembro 2020]

77. Richards, S., Aziz, N., Bale, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–423 (2015). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30> [Acesso em: 28 julho 2020]

78. Einhorn, Y.; Kamshov, A., Lev, O.; Einhorn, M.; Paz-Yaacov, N.; Shami, K.; Lyon, E.; Gross, S. (2019) Implementation of Gene-specific ClinGen Variant Classification Recommendations using Artificial Intelligence: Frequency Thresholds. Disponível em: https://www.genoox.com/wp-content/uploads/2019/04/ACMG2019_Frequency_v4.pdf [Acesso em: 05 dezembro 2020]

79. Wawruk, H. Caracterização de rearranjos cromossômicos e sua relação com quadros clínicos [Doutorado]. Universidade de Brasília; 2019.

80. Schneider, E., Pliushch, G., El Hajj, N., Galetzka, D., Puhl, A., Schorsch, M., Frauenknecht, K., Riepert, T., Tresch, A., Müller, A. M., Coerdts, W., Zechner, U., & Haaf, T. (2010). Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns. *Nucleic acids research*, 38(12), 3880–3890. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq126> [Acesso em: 28 julho 2020]

81. Eggerding, F. A., Schonberg, S. A., Chehab, F. F., Norton, M. E., Cox, V. A., & Epstein, C. J. (1994). Uniparental isodisomy for paternal 7p and maternal 7q in a child with growth retardation. *American journal of human genetics*, 55(2), 253–265. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7913578/> [Acesso em: 05 dezembro 2020]

82. Eggermann, T., Meyer, E., Obermann, C., Heil, I., Schüler, H., Ranke, M. B., Eggermann, K., & Wollmann, H. A. (2005). Is maternal duplication of 11p15 associated with Silver-Russell syndrome. *Journal of medical genetics*, 42(5), e26. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.028936> [Acesso em: 05 dezembro 2020]

83. De Crescenzo, A., Sparago, A., Cerrato, F., Palumbo, O., Carella, M., Miceli, M., Bronshtein, M., Riccio, A., & Yaron, Y. (2013). Paternal deletion of the 11p15.5 centromeric-imprinting control region is associated with alteration of imprinted gene expression and recurrent severe intrauterine growth restriction. *Journal of medical genetics*, 50(2), 99–103. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101352/> [Acesso em: 26 setembro 2020]

84. Innes, A. M., & Dymont, D. A. (2014). SHORT Syndrome. In M. P. Adam (Eds.) et al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK201365/> [Acesso em: 19 setembro 2020]

85. Avila, M., Dymont, D. A., Sagen, J. V., St-Onge, J., Moog, U., Chung, B., Mo, S., Mansour, S., Albanese, A., Garcia, S., Martin, D. O., Lopez, A. A., Claudi, T., König, R., White, S. M., Sawyer, S. L., Bernstein, J. A., Slattery, L., Jobling, R. K., Yoon, G., Thauvin-Robinet, C. (2016). Clinical reappraisal of SHORT syndrome with PIK3R1 mutations: toward recommendation for molecular testing and management. *Clinical genetics*, 89(4), 501–506. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cge.12688> [Acesso em: 19 setembro 2020]

86. Cui, W., Cai, Y., Wang, W., Liu, Z., Wei, P., Bi, R., Chen, W., Sun, M., & Zhou, X. (2014). Frequent copy number variations of PI3K/AKT pathway and aberrant protein expressions of PI3K subunits are associated with inferior survival in diffuse large B cell lymphoma. *Journal of translational medicine*, 12, 10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-10>

87. Dymont, D. A., Smith, A. C., Alcantara, D., Schwartzenuber, J. A., Basel-Vanagaite, L., Curry, C. J., Temple, I. K., Reardon, W., Mansour, S., Haq, M. R., Gilbert, R., Lehmann, O. J., Vanstone, M. R., Beaulieu, C. L., FORGE Canada Consortium, Majewski, J., Bulman, D. E., O'Driscoll, M., Boycott, K. M., & Innes, A. M. (2013). Mutations in PIK3R1 cause SHORT syndrome. *American journal of human genetics*, 93(1), 158–166. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.005> [Acesso em: 20 setembro 2020]

88. Mostofizadeh, N., Gheidarloo, M., Hashemipour, M., & Dehkordi, E. H. (2018). SOFT Syndrome: The First Case in Iran. *Advanced biomedical research*, 7, 128. Disponível em: https://doi.org/10.4103/abr.abr_13_18 [Acesso em: 19 outubro 2020]

89. Gelsomino, L., Gu, G., Rechoum, Y., Beyer, A. R., Pejerrey, S. M., Tsimelzon, A., Wang, T., Huffman, K., Ludlow, A., Andò, S., & Fuqua, S. (2016). ESR1 mutations affect anti-proliferative responses to tamoxifen through enhanced cross-talk with IGF signaling. *Breast cancer research and treatment*, 157(2), 253–265. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3829-5> [Acesso em: 21 outubro 2020]

90. Abi Habib, W., Brioude, F., Edouard, T., Bennett, J. T., Lienhardt-Roussie, A., Tixier, F., Salem, J., Yuen, T., Azzi, S., Le Bouc, Y., Harbison, M. D., & Netchine, I. (2018). Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 20(2), 250–258. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/gim.2017.105> [Acesso em: 16 setembro 2019]

91. Simpson, B. S., Camacho, N., Luxton, H. J., Pye, H., Finn, R., Heavey, S., Pitt, J., Moore, C. M., & Whitaker, H. C. (2020). Genetic alterations in the 3q26.31-32 locus confer an aggressive prostate cancer phenotype. *Communications biology*, 3(1), 440. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01175-x> [Acesso em: 16 setembro 2019]

92. Fusco, I., Babu, D., Mellone, S., Barizzone, N., Prodam, F., Fanelli, A., Muniswamy, R., Petri, A., Bellone, S., Bona, G., & Giordano, M. (2016). Variations in the high-mobility group-A2 gene (HMGA2) are associated with idiopathic short stature. *Pediatric research*, 79(2), 258–261. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/pr.2015.225> [Acesso em: 16 setembro 2019]

93. Geoffron, S. et al. (2018). Chromosome 14q32.2 Imprinted Region Disruption as an Alternative Molecular Diagnosis of Silver-Russell Syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 103(7), 2436–2446. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02152> [Acesso em: 21 outubro 2020]

94. Bonaldi, A., Mazzeu, J. F., Costa, S. S., Honjo, R. S., Bertola, D. R., Albano, L. M., Furquim, I. M., Kim, C. A., & Vianna-Morgante, A. M. (2011). Microduplication of the ICR2 domain at chromosome 11p15 and familial Silver-Russell syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 155A(10), 2479–2483. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34023> [Acesso em: 30 outubro 2020]

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do padrão de metilação de genes sujeitos a imprinting em pacientes com síndromes genéticas.

Pesquisador: Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 11511519.0.0000.5558

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.295.465

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, sob orientação da Professora Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo, que pretende buscar alterações no padrão de metilação de genes em pacientes com síndromes genéticas relacionadas ao imprinting utilizando a técnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) em uma amostra composta por pelo menos 100 pacientes (a partir de 6 anos de idade) com suspeita de diagnóstico de síndromes causadas por defeitos de imprinting, atendidos no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário da Universidade de Brasília (HUB-UnB). Para tanto, será realizada revisão dos prontuários clínicos do HUB e do Ambulatório de Genética, além de coleta de 4 a 8 mL de sangue periférico dos participantes, em tubo heparinizado e em tubo contendo EDTA como anticoagulante. O cariótipo e a extração de DNA serão realizados conforme protocolo de rotina do laboratório. Para fins investigatórios poderão ser realizados testes moleculares, como MLPA ou PCR, que identifica a presença ou ausência de mutações genéticas.

Objetivo da Pesquisa:

Buscar alterações no padrão de metilação de genes em pacientes com síndromes genéticas relacionadas ao imprinting utilizando a técnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: cepfm@unb.br

Continuação do Parecer: 3.295.465

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como benefícios, tem-se que o diagnóstico de pacientes com síndromes genéticas é importante tanto para o aconselhamento genético da família como para a conduta terapêutica, visto que podem ter alguns sintomas controlados com o acompanhamento clínico correto.

O risco se caracteriza pela coleta de sangue mas os pesquisadores asseguram que ela será feita dentro dos padrões procedimentais vigentes por técnicos especializados em coleta de sangue do Laboratório do HUB.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, e não necessitará retenção de amostras de sangue coletadas para armazenamento em banco.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados, assim como o TCLE e o TALE para crianças entre 6 e 12 anos, e entre 13 e 17 anos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou necessidade de adequações, motivo pelo qual sou de parecer favorável à aprovação do referido projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na 4ª Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB-2019. Após apresentação do parecer do (a) Relator (a), aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado.

De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1. - 3.b. e XI. -2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa para o CEP -FM, através de Notificações submetidas pela Plataforma Brasil, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1176863.pdf	18/03/2019 14:55:09		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CL_BeatrizVersiani.pdf	18/02/2019 13:26:40	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CL_MaraCordoba.pdf	18/02/2019 13:24:41	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: cepfm@unb.br

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



Continuação do Parecer: 3.295.465

Declaração de Pesquisadores	CL_AnaCaroline.pdf	18/02/2019 13:22:21	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cl_JulianaMazzeu.pdf	18/02/2019 13:20:36	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Outros	termodeciencia_projeto.pdf	18/02/2019 13:16:26	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_projeto.pdf	18/02/2019 13:11:57	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Outros	HUB_projeto.pdf	18/02/2019 13:09:29	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Brochura Pesquisa	Resumo_projeto.docx	18/02/2019 13:06:08	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_projeto.doc	18/02/2019 00:34:14	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TLCE.doc	18/02/2019 00:22:29	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoimprinting.docx	18/02/2019 00:17:23	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Orçamento	Orcamento_detalhado_projeto.doc	17/02/2019 14:45:40	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito
Cronograma	cronograma_projeto.doc	17/02/2019 14:37:55	Juliana Forte Mazzeu de Araújo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 30 de Abril de 2019

**Assinado por:
Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))**

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



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

O seu dependente legal está sendo convidado a participar do projeto: **“Estudo do padrão de metilação de genes sujeitos a imprinting em pacientes com síndromes genéticas”**.

O objetivo desta pesquisa é estudar os aspectos clínicos e genéticos da deficiência intelectual síndrômica.

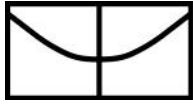
O (A) Senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome ou de seu dependente não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (a).

A sua participação ocorrerá por meio da realização de exames laboratoriais.

Os exames serão realizados a partir da coleta de sangue para extração de DNA. O procedimento de coleta de sangue por punção venosa será realizado com material estéril descartável de boa qualidade por profissional habilitado, podendo ocasionar um pouco de dor e formação de hematoma no local. É possível que o senhor (a) venha a se beneficiar dos resultados deste projeto, a partir dos resultados dos exames laboratoriais de forma a identificar os genes relacionados a sua condição, permitindo precisão no seu acompanhamento e de seus familiares, desde que consentido pelo senhor(a).

Informamos que o Senhor (a) poderá se recusar a responder qualquer questão (ou participar de qualquer procedimento) que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o (a) senhor(a) ou seu dependente e nenhum comprometimento em seu acompanhamento médico. Sua participação é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite e mediante comprovação, o senhor(a) poderá ser ressarcido(a) pelos gastos com deslocamento e alimentação devido à participação nessa pesquisa. Além disso, será garantido atendimento imediato e /ou indenização diante de eventuais danos **comprovadamente** decorrentes dessa pesquisa, vistas as medidas administrativas e judiciais cabíveis.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda do pesquisador.



Universidade de Brasília

Solicitamos também sua autorização para armazenamento de sua amostra biológica de sangue para possíveis outros estudos futuros em biorrepositório no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília. A amostra apresentará uma codificação alfanumérica e só poderá ser manuseada pelos indivíduos diretamente relacionados com o projeto.

Se o (a) Senhor (a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo, na Universidade de Brasília, telefone: (61) 3107-1744, em horário comercial.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

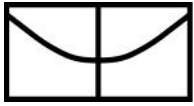
Nome do dependente

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Nome / assinatura do voluntário ou responsável legal

Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

_____, ____ de _____ de _____.



Universidade de Brasília

TERMO DE ASSENTIMENTO PARA CRIANÇAS DE 06 A 12 ANOS

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que estudará sua doença. Esta doença te afeta e é conhecida como “**Síndrome genética de imprinting**”.

Queremos descobrir informações sobre sua doença, e para isso, precisaremos de um pouco do seu sangue, e também iremos te examinar. Uma pessoa com experiência irá tirar um pouco de sangue do seu braço, correspondendo a uma ou duas colheres de sopa.

Seus pais concordaram que você participe, mas você não precisa participar da pesquisa se não quiser, e ninguém ficará bravo ou triste se você desistir.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa e nem daremos suas informações a estranhos.

Se você tiver alguma dúvida, você pode nos procurar pelo telefone (61) 3107-1744 e falar com a Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo.

Você receberá uma via deste Termo de Assentimento, e a outra via ficará conosco. Assinar este documento significa que você aceita participar da pesquisa.

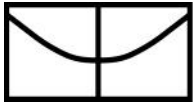
Brasília, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante de pesquisa

Assinatura do (a) pesquisador(a)



Para dúvidas sobre ética em pesquisa ou sobre a aprovação desta pesquisa, peça para seus pais ou responsáveis ligarem para (61) 3107-1918 ou enviarem um e-mail para cepfm@unb.br, durante o horário de atendimento de 8:00hs às 12:00hs e de 13:00hs às 16:00hs, de segunda a sexta-feira.

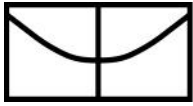


Universidade de Brasília

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PARTICIPANTES DE 13 A 17 ANOS DE IDADE

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto “**Estudo do padrão de metilação de genes sujeitos a imprinting em pacientes com síndromes genéticas**”. Queremos identificar as causas de algumas alterações encontradas no seu corpo e sua participação é muito importante. Abaixo estão algumas informações sobre a pesquisa:

- Serão feitas perguntas sobre seu estado de saúde geral e serão realizados exames clínicos, em consultas no Hospital Universitário de Brasília. Também iremos coletar 4 a 8 mL de sangue, o equivalente a uma ou duas colheres de sopa, usando seringa e agulha descartáveis. A coleta está prevista para uma única vez, mas poderão ser necessárias outras coletas a critério médico.
- Você e seus pais ou responsável não irão receber nada por sua colaboração e também não terão nenhum custo com sua participação. A participação na pesquisa é voluntária, isto é, não há qualquer tipo de pagamento por sua colaboração. Caso solicite, o participante poderá ser ressarcido pelos gastos com deslocamento e alimentação devido à participação nessa pesquisa. O ressarcimento só poderá ocorrer mediante comprovação.
- Você não precisa responder as questões que não quiser, pode se recusar a participar de qualquer procedimento e desistir de participar da pesquisa quando quiser, e isso não irá te prejudicar.
- O sangue coletado será utilizado para examinar muitos genes e serve para detectar alterações nos genes que são responsáveis pela ocorrência da sua doença. As informações serão usadas para melhorar o diagnóstico e aconselhamento de pessoas com sua doença genética.
- A coleta de sangue pode trazer algum desconforto, uma dor leve ou deixar a região do braço um pouco roxa por algum tempo, mas esse procedimento será feito por profissionais treinados, e a equipe médica do hospital sempre dará assistência, para que esses riscos sejam evitados ou diminuídos;
- Se você sofrer qualquer dano decorrente da participação na pesquisa, receberá assistência imediata e integral pelo tempo necessário, e será indenizado.
- Iremos oferecer consulta de aconselhamento genético no ambulatório de genética do Hospital Universitário de Brasília com a Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo e acompanhamento clínico nas devidas especialidades, sem custos para você, seus pais ou responsável.



Universidade de Brasília

- Os resultados serão divulgados na Universidade de Brasília, podendo ser publicados e/ou apresentados em eventos e/ou revistas científicas, mas não divulgaremos seu nome ou qualquer outra informação que permita identificá-lo. Garantimos seu sigilo, privacidade e anonimato.
- Após conclusão da pesquisa, seus dados serão armazenados e, caso sejam utilizados em uma pesquisa futura, entraremos em contato para que você autorize novamente. O material somente será utilizado se um novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.
- Somente os pesquisadores responsáveis terão acesso aos dados e materiais utilizados na pesquisa, como resultado de exames e prontuário. Não será permitido o acesso a outras pessoas que não fazem parte do projeto. A proteção dos seus dados evita que você seja discriminado com sua participação.
- Em qualquer momento, você poderá saber dos resultados e também poderá decidir se quer ou não ter conhecimento do seu resultado. Sempre que desejar receber esclarecimentos antes, durante e depois da pesquisa e quando desejar saber sobre os resultados, entre em contato com a pesquisadora responsável Profa Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo pelo telefone (61) 3107-1744.
- Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Você pode pedir esclarecimentos e conhecer seus direitos como participante quando desejar, por meio do telefone: (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br, horário de atendimento de 8:00hs às 12:00hs e de 13:00hs às 16:00hs, de segunda a sexta-feira. O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, além de identificar os riscos associados à pesquisa; verificar se foram tomadas as medidas necessárias para minimizar tais riscos (físicos, psíquicos, morais, intelectuais, sociais); identificar os prováveis benefícios que a pesquisa pode gerar e assegurar que os participantes receberão uma adequada descrição e informação dos riscos.
- Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com você.

_____ (Assinatura do participante)

_____ (Assinatura do pesquisador)

Brasília, ____ de _____ de _____