

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Adriana Rosolia Costa Sabbag**

**PESQUISA DE SÍNDROMES DE MICRODELEÇÃO EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA  
INTELECTUAL POR MEIO DA TÉCNICA DE MLPA - AMPLIFICAÇÃO DE MÚLTIPLAS  
SONDAS DEPENDENTES DE LIGAÇÃO**

**São Carlos**  
**2012**

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**PESQUISA DE SÍNDROMES DE MICRODELEÇÃO EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA  
INTELECTUAL POR MEIO DA TÉCNICA DE MLPA - AMPLIFICAÇÃO DE MÚLTIPLAS  
SONDAS DEPENDENTES DE LIGAÇÃO**

**Adriana Rosolia Costa Sabbag**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São Carlos,  
para defesa de Mestrado junto ao  
PPG Biotecnologia.**

**Orientadores: Professora Dra. Débora Gusmão Melo - DMed - UFSCar  
Professor Dr. Euclides Matheucci Junior - DQ - UFSCar**

**São Carlos  
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S114ps

Sabbag, Adriana Rosolia Costa.

Pesquisa de síndromes de microdeleção em pacientes com deficiência intelectual por meio da técnica de MLPA - Amplificação de Múltiplas Sondas Dependentes de Ligação / Adriana Rosolia Costa Sabbag. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

169 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Deficiência intelectual. 3. Microdeleção. 4. Biologia molecular. 5. MLPA. I. Título.

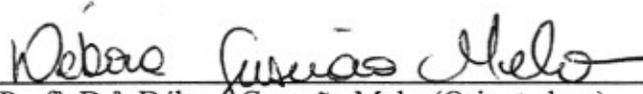
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Adriana Rosolia Costa Sabagg**

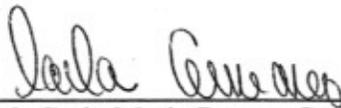
Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 21/09/2012**

**BANCA EXAMINADORA**



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Débora Gusmão Melo (Orientadora)  
(UFSCar)



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Carla Maria Ramos Germano (UFSCar)



Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz (USP)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desse trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

“Toda mulher é educada para ter filhos perfeitos, lindos e maravilhosos. Nunca estamos preparadas para lidar com o diferente e a diversidade das pessoas. Mas com o tempo aprendi muito com a frase: ‘As qualidades superam qualquer defeito das pessoas’. Quando descobri que tinha uma filha diferente me desesperei, tinha sonhado em ter uma filha doutora, modelo e perfeita. Hoje vejo que atingi meus objetivos. Minha filha é doutora em lição de vida, modelo em dignidade e perfeita em tudo.”

Depoimento de uma mãe de uma paciente com síndrome de Williams (retirado do web site oficial da Associação Brasileira da Síndrome de Williams, <http://www.swbrasil.org.br>).

*Ofereço este trabalho a minha família e ao meu marido Rogério, que me apoiaram em todos os momentos difíceis; e a todos os pacientes portadores de síndromes genéticas e suas famílias, especialmente aqueles que participaram deste projeto.*

## **Agradecimentos**

A Deus, que todos os dias me dá forças para não desistir apesar das dificuldades do caminho.

Aos meus pais, Ana Maria Rosolia Albuquerque Costa e Antônio Carlos Albuquerque Costa, responsáveis pela formação de meu caráter e personalidade, apoio moral e financeiro. À minha avó, Adair Aparecida Rosolia, à minha tia Maria Aparecida Rosolia e a Cremilda, por serem parte de todos os caminhos da minha vida.

Ao meu marido, Rogério Carlos Sabbag, pelo amor, carinho, compreensão e amizade; por ser paciente e perseverante em meus momentos de abnegação bem como pelo imenso apoio e companheirismo na minha vida profissional e pessoal.

Aos meus orientadores Débora Gusmão Melo e Euclides Mattheucci Junior pela orientação, ensinamentos e aprofundamento de conhecimentos científicos voltados para o trabalho e para a vida.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro, sem o qual seria muito difícil a conclusão do projeto.

Ao Professor Doutor Calógeras Antônio Albergaria Barbosa, pela indicação de pacientes que participaram do projeto.

À APAE da cidade de São Carlos, de onde vieram muitos dos pacientes que participaram desse trabalho.

À Dra. Adriana Medaglia, por suas valiosas sugestões e ensinamentos; e pelo apoio operacional.

Aos colegas de laboratório Milena de Júlio, Fábio e Lara, pela amizade, troca de ideias, ensinamentos e auxílio oferecidos; e, especialmente, ao Bruno Garcia Rocha pela ajuda com a parte prática do projeto.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar.

Aos funcionários do Centro Municipal de Especialidades em Saúde (CEME), especialmente às enfermeiras Cintia Martins Ruggiero, Kátia Maria Feltrin Góes e Daniela Maria Falcão de Oliveira, que auxiliaram nas coletas de sangue; e as Sras. Ângela Maria Alteia e Lourdes Maria Morasco, que auxiliaram nos levantamentos dos dados clínicos.

Aos alunos do curso de Medicina da UFSCar, Paulo Vitor Sola Gimenes e Letícia Maria de Amorim Storniolo, estagiários do Ambulatório de Genética na época que este trabalho foi desenvolvido.

Ao Sr. Daniel Rincon, que me auxiliou intensamente na análise dos resultados.

Aos meus amigos, pela paciência durante os meus momentos de impaciência.

Aos meus colegas de trabalho e à Prefeitura Municipal da Estância Climática de Caconde que permitiram que eu me ausentasse quando necessário para cumprimento dos compromissos de estudo, possibilitando conciliar a vida profissional com a vida acadêmica.

Aos portadores de síndromes genéticas e seus familiares, especialmente os que participaram deste projeto.

A todos os profissionais que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização desse projeto.

“Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa”.

*Mahatma Gandhi*

SABBAG, Adriana Rosolia Costa. *Pesquisa de síndromes de microdeleção em pacientes com deficiência intelectual por meio da técnica de MLPA – Amplificação de Múltiplas Sondas dependentes de Ligação*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2012.

## Resumo

Deficiência intelectual (DI) é sinal manifesto de mais de 2.000 condições clínicas diferentes e está presente em 5% da população. Por se tratar de um grupo heterogêneo de condições clínicas, com fatores causais distintos e simultaneamente envolvidos, cerca de 50% dos pacientes com DI não têm sua etiologia definida. Entre as possíveis causas de DI estão as microdeleções cromossômicas, situações nas quais há perda de um fragmento de até 5Mb do genoma, implicando na haploinsuficiência de um ou múltiplos genes. O objetivo desse trabalho foi padronizar testes genéticos fundamentados na técnica de MLPA (Amplificação de Múltiplas Sondas dependentes de Ligação) para investigar a presença de síndromes de microdeleção em uma amostra de pacientes com DI idiopática ou com hipótese diagnóstica ainda não confirmada por teste genético molecular. O kit de MLPA utilizado (SALSA® MLPA® P064-B2 MR1) detectava, simultaneamente, 11 síndromes de microdeleção: deleção 1p36, Sotos, Miller-Dieker, deleção 22q11.2, Saethre-Chotzen, Prader-Willi, Angelman, Williams, Alagille, Smith-Magenis e Canavan. Foram selecionados clinicamente 57 pacientes com DI e dismorfias faciais, com cariótipo convencional e exame de imagem de encéfalo normais. A presença de microdeleção foi identificada em 4 pacientes (7%), tendo sido detectados 3 pacientes com síndrome de Williams e 1 com deleção 22q11.2. Os resultados reforçam a utilidade da técnica de MLPA na investigação etiológica da DI, ajudando no manejo clínico dos pacientes e no aconselhamento genético familiar.

**Palavras-chave:** Síndromes de microdeleção. Deficiência intelectual. Diagnóstico. Biologia molecular. Amplificação de Múltiplas Sondas dependentes de Ligação (MLPA).

SABBAG, Adriana Rosolia Costa. *Pesquisa de síndromes de microdeleção em pacientes com deficiência intelectual por meio da técnica de MLPA – Amplificação de Múltiplas Sondas dependentes de Ligação*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2012.

### **Abstract**

Intellectual disability (ID) is manifest sign of more than 2,000 different clinical conditions and is present in 5% of the population. Because it is a heterogeneous group of clinical conditions, with different causal factors and simultaneously involved, about 50% of patients with ID have no defined etiology. Chromosomal microdeletions, situations in which there is loss of a fragment of up to 5Mb of the genome resulting in haploinsufficiency of one or multiple genes, are one of the possible causes of ID. The aim of this study was to standardize genetic testing with the technique of MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) to investigate the presence of microdeletion syndromes in a sample of patients with idiopathic DI or with diagnosis not yet confirmed by molecular genetic testing. The MLPA kit used (SALSA® MLPA® P064-B2 MR1) detected, at the same time, 11 microdeletion syndromes: 1p36 deletion, Sotos, Miller-Dieker, 22q11.2 deletion, Saethre-Chotzen, Prader-Willi, Angelman, Williams, Alagille, Smith-Magenis and Canavan. We selected 57 patients with idiopathic ID and facial dysmorphias, with normal conventional karyotyping and normal brain imaging studies. The presence of microdeletion was identified in 4 patients (7%), 3 patients had Williams syndrome and 1 had 22q11.2 deletion. The results reinforce the usefulness of MLPA in the etiologic research of ID, helping in the clinical management and familial genetic counseling.

**Key words:** Microdeletion syndromes. Intellectual disability. Diagnosis. Molecular Biology. Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA).

## Lista de Abreviaturas e Siglas

- ADNPM - Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor
- AG - Aconselhamento genético
- AMB - Associação Médica Brasileira
- ANS - Agência Nacional de Saúde Suplementar
- APAE - Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CFM - Conselho Federal de Medicina
- CGH - Hibridização genômica comparativa (*Comparative Genomic Hybridization*)
- CONASS - Conselho Nacional dos Secretários de Saúde
- DI - Deficiência intelectual
- DP - Desvio padrão
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- FISH - Hibridização in situ com fluorescência (*Fluorescence In Situ Hybridization*)
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- INSS - Instituto Nacional de Seguridade Social
- LCR - Repetições de cópias de poucas bases (*Low Copy Repeats*)
- MAPH - Hibridização de Sondas Múltiplas Amplificáveis (*Multiplex Amplifiable Probe Hybridization*)
- Mb - Megabases

- MLPA - Amplificação de Múltiplas Sondas dependentes de Ligação (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*)
- NAHR - Recombinação homóloga não alélica (*Non Allelic Homologous Recombination*)
- OMIM - Herança Mendeliana Humana on line (*Online Mendelian Inheritance in Man*)
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PCR - Reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
- SAS - Secretaria de Atenção a Saúde
- SBG - Sociedade Brasileira de Genética
- SIGTAP - Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos
- SMS - Secretaria Municipal de Saúde
- SNC - Sistema Nervoso Central
- SUS - Sistema Único de Saúde
- Taq - *Thermus aquaticus*
- TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TSH - Hormônio estimulante da tireoide (*Thyroid-Stimulating Hormone*)
- UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Exemplos de NAHR mediadas por sequências genômicas repetitivas entre cromossomos não-homólogos.....	21
<b>Figura 2.</b> Exemplos de NAHR mediadas por sequências genômicas repetitivas.....	22
<b>Figura 3.</b> Paciente com síndrome de deleção 22q11.2.....	26
<b>Figura 4.</b> Paciente com síndrome de Williams.....	29
<b>Figura 5.</b> Paciente com síndrome de Smith-Magenis .....	31
<b>Figura 6.</b> Paciente com síndrome de Miller-Dieker.....	33
<b>Figura 7.</b> Paciente com síndrome de Prader-Willi .....	35
<b>Figura 8.</b> Paciente com síndrome de Angelman.....	37
<b>Figura 9.</b> Paciente com síndrome de deleção 1p36 .....	38
<b>Figura 10.</b> Paciente com síndrome de Alagille .....	41
<b>Figura 11.</b> Paciente com síndrome de Saethre-Chotzen .....	43
<b>Figura 12.</b> Paciente com síndrome de Sotos.....	45
<b>Figura 13.</b> Paciente com doença de Canavan.....	47
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática da metodologia de MLPA. ....	53
<b>Figura 15.</b> Quantificação em gel de agarose de todas as amostras extraídas.....	60
<b>Figura 16.</b> Etapas da reação de MLPA no termociclador .....	63
<b>Figura 17.</b> Eletroforese capilar dos fragmentos obtidos pela técnica MLPA. ....	64
<b>Figura 18.</b> Análise do dados brutos gerados pelo equipamento de eletroforese capilar através do software Coffalyser®.....	66

<b>Figura 19.</b> Análise do dados brutos gerados pelo equipamento de eletroforese capilar através do software GeneMarker®. ....	67
<b>Figura 20.</b> Paciente 0208. ....	71
<b>Figura 21.</b> Diagrama do resultado do paciente 0208 no software Coffalyser®. ....	71
<b>Figura 22.</b> Diagrama do resultado do paciente 0208 no software GeneMarker®. ....	72
<b>Figura 23.</b> Paciente 0504. ....	75
<b>Figura 24.</b> Diagrama do resultado do paciente 0504 no software Coffalyser®. ....	75
<b>Figura 25.</b> Diagrama do resultado do paciente 0504 no software GeneMarker®. ....	76
<b>Figura 26.</b> Paciente 0910. ....	79
<b>Figura 27.</b> Diagrama do resultado do paciente 0910 no software Coffalyser®. ....	79
<b>Figura 28.</b> Diagrama do resultado do paciente 0910 no software GeneMarker®. ....	80
<b>Figura 29.</b> Paciente 2247. ....	83
<b>Figura 30.</b> Diagrama do resultado do paciente 2247 no software Coffalyser®. ....	84
<b>Figura 31.</b> Diagrama do resultado do paciente 2247 no software GeneMarker®. ....	84
<b>Figura 32.</b> Exemplo de uma amostra da primeira reação analisada com o software Coffalyser®. ....	86
<b>Figura 33.</b> Exemplo de uma amostra da primeira reação analisada com o software GeneMarker®. ....	86
<b>Figura 34.</b> Região genômica do cromossomo 7 envolvida na síndrome de Williams	101
<b>Figura 35.</b> Região genômica envolvida na síndrome de deleção 22q11.2. ....	106

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Listagem das 43 sondas do kit SALSA® MLPA® P064-B2 MR1 .....	58
<b>Tabela 2.</b> Genótipo/fenótipo relacionado à haploinsuficiência de alguns dos genes associados à síndrome de Williams.....	102
<b>Tabela 3.</b> Principais características da síndrome de Williams.....	103
<b>Tabela 4.</b> Genótipo/fenótipo relacionado à haploinsuficiência de alguns dos genes associados à síndrome de deleção 22q11.2.....	107
<b>Tabela 5.</b> Principais características da síndrome de deleção 22q11.2.....	108

## Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Deficiência intelectual .....	13
1.2. Etiologia da DI e as microdeleções .....	18
1.3. Síndromes de microdeleção.....	25
1.3.1. <i>Síndrome de deleção 22q11.2</i> .....	25
1.3.2. <i>Síndrome de Williams</i> .....	28
1.3.3. <i>Síndrome de Smith-Magenis</i> .....	30
1.3.4. <i>Síndrome de Miller-Dieker</i> .....	32
1.3.5. <i>Síndrome de Prader-Willi</i> .....	34
1.3.6. <i>Síndrome de Angelman</i> .....	36
1.3.7. <i>Síndrome de deleção 1p36</i> .....	38
1.3.8. <i>Síndrome de Alagille</i> .....	40
1.3.9. <i>Síndrome de Saethre-Chotzen</i> .....	42
1.3.10. <i>Síndrome de Sotos</i> .....	44
1.3.11. <i>Doença de Canavan</i> .....	46
1.4. Identificação de microdeleções e a técnica de MLPA.....	48
2. Objetivos.....	55
2.1. Objetivo Geral .....	55
2.2. Objetivos Específicos .....	55
3. Materiais e Métodos.....	56
3.1. Pacientes .....	56
3.2. Grupo de indivíduos controle .....	57
3.3. Pesquisa de microdeleções pela técnica de MLPA .....	57
3.3.1. <i>Extração do DNA</i> .....	59
3.3.2. <i>Quantificação do DNA</i> .....	60

3.3.3. Desnaturação e hibridização das sondas.....	61
3.3.4. Reação de ligação .....	61
3.3.5. Reação de PCR.....	62
3.3.6. Separação dos fragmentos amplificados.....	63
3.4. Análise dos resultados .....	64
4. Resultados.....	68
4.1. Os resultados do MLPA .....	68
4.2. Casos com resultados indicativos de síndromes de microdeleção .....	69
4.2.1. Paciente 0208.....	69
4.2.2. Paciente 0504.....	73
4.2.3. Paciente 0910.....	77
4.2.4. Paciente 2247 .....	81
5. Discussão .....	85
5.1. Dificuldades para padronizar os testes de MLPA .....	85
5.2. O MLPA como técnica adequada para rastreio de DI idiopática.....	87
5.3. Genética Médica e os testes genéticos no SUS.....	93
5.4. Considerações sobre o diagnóstico da síndrome de Williams.....	101
5.5. Considerações sobre o diagnóstico da síndrome de deleção 22q11.2.....	106
6. Conclusões.....	110
7. Referências bibliográficas.....	111
8. Anexos.....	133
8.1. Anexo 1.....	133
8.2. Anexo 2.....	135
8.3. Anexo 3.....	136
8.4. Anexo 4.....	138
8.5. Anexo 5.....	139
8.6. Anexo 6.....	166
8.7. Anexo 7.....	168

# 1. Introdução

## 1.1. Deficiência intelectual

Deficiência intelectual (DI)<sup>1</sup> é definida como sendo o resultado do funcionamento intelectual significativamente inferior à média, que aparece antes dos 18 anos de idade e é acompanhado de limitações importantes no funcionamento adaptativo. O funcionamento intelectual é objetivamente avaliado por meio de testes psicométricos de inteligência, conhecidos como testes de Quociente de Inteligência (QI). A inteligência é concebida como a capacidade geral, que inclui raciocínio, planejamento, solução de problemas, pensamento abstrato, compreensão de ideias complexas, aprendizagem por meio da experiência e rapidez de aprendizagem. As pontuações nos testes de QI têm distribuição Gaussiana e como ponto de definição de anormalidade se estabelece duas unidades de desvio-padrão abaixo da média dos resultados obtidos para a população considerada. Na prática, como não existem estudos de QI para todas as populações, considera-se, normalmente, o valor 70 como limite inferior de normalidade<sup>2</sup>. O comportamento adaptativo, por sua vez, é definido como o conjunto de habilidades conceituais, sociais e práticas adquiridas pela pessoa para corresponder às demandas da vida cotidiana. Essas habilidades podem ser divididas em áreas como: comunicação, autocuidados, vida doméstica, habilidades sociais/interpessoais, uso de recursos comunitários, autossuficiência, habilidades acadêmicas, trabalho, lazer, saúde e segurança. Limitações nessas habilidades podem prejudicar a pessoa nas relações com o ambiente e dificultar seu convívio no

---

<sup>1</sup> Na língua inglesa, a expressão “mental retardation” era usada para designar o que, em português, se traduz como “deficiência mental”. Contudo, em 2010, a *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (AAIDD), que até 2007 se chamava *American Association on Mental Retardation* (AAMR) propôs o uso da expressão “intellectual disability” no lugar de “mental retardation”. Em português, “intellectual disability” tem sido traduzido como “deficiência intelectual”. A nova nomenclatura é apontada como mais adequada pelas próprias pessoas com deficiência e por aqueles que advogam por elas, que consideram a expressão “mental retardation” como pejorativa.

<sup>2</sup> Este valor foi proposto inicialmente por Pearson, em 1931, a partir do estudo de crianças normais e de deficientes intelectuais de Estocolmo. Posteriormente, várias outras curvas de QI publicadas mostraram valores semelhantes.

dia a dia. Idealmente, deficiência intelectual é um diagnóstico clínico presumível a partir dos 5 anos, quando é possível mensurar a inteligência por meio de testes de QI. Em crianças menores, pode-se falar em atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) que pode ou não evoluir para DI (Schalock et al., 2010).

A DI pode ser classificada em leve, moderada, severa e profunda. A DI leve é caracterizada por QI entre 51 e 70, nível cognitivo, segundo Piaget, no período das operações concretas e idade mental correspondente a 7-12 anos. A DI moderada é caracterizada por QI entre 36 a 50, nível cognitivo, segundo Piaget, no período pré-operativo e idade mental correspondente a 2-7 anos. DI severa e profunda são igualmente caracterizadas como tendo nível cognitivo, segundo Piaget, no período sensório-motriz e idade mental correspondente a 0-2 anos; a diferença entre os dois graus é que na DI severa o QI está compreendido entre 21 e 35, enquanto na DI profunda o QI é inferior a 20 (Moog, 2005).

Na prática, muitas vezes é mais fácil utilizar como referência para avaliar o grau da DI, características relacionadas ao funcionamento adaptativo do indivíduo junto à comunidade. Assim, a DI leve é caracterizada clinicamente, principalmente em pacientes que não se beneficiam da instrução que recebem para um maior desempenho na sua vida acadêmica e laboral, que têm falhas nos processos de conceituação abstrata e atenção oscilante, mas têm autonomia nas atividades da vida diária (alimentar-se, realizar medidas de cuidado e higiene pessoal, deslocar-se dentro e fora do domicílio e tomar decisões). Pacientes com DI moderada caracterizam-se por possuir falhas importantes de atenção, fluxo lento de ideias, pobreza de associações, dificuldade para realizar abstração e síntese, comportamento variável (ora dócil, ora turbulento), erros perceptivos, falhas na coordenação motora e semi-dependência nas atividades da vida diária. Pacientes com DI severa têm déficit significativo na comunicação (que pode ser realizada através de palavras simples), atraso acentuado no desenvolvimento psicomotor, alteração acentuada no padrão de

marcha (dispraxia) e necessitam de rigorosa supervisão para realizar medidas simples de autocuidado. Pacientes com DI profunda têm grave atraso na fala e linguagem (com comunicação eventual por meio de fala estereotipada e rudimentar), retardo psicomotor com grave restrição de mobilidade (incapacidade motora para locomoção), frequentemente apresentam comportamento de automutilação e são incapazes de atender às suas necessidades básicas autonomamente (Van Schrojenstein Lantman-de Valk e Walsh, 2008; Katz e Lazcano-Ponce, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 10% da população de qualquer país em tempo de paz é portadora de algum tipo de deficiência (intelectual, física, auditiva ou visual), da qual 5% é portadora de DI (OMS, 1986). Dimensionar o problema da DI no Brasil, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos, é muito difícil. As informações do Censo Demográfico de 2000 apontavam a existência de 2,8 milhões de pessoas com DI no país (Brasil, IBGE, 2003). Dados do Censo de 2010 indicam que 23,9% da população brasileira (45.623.910 indivíduos) são portadores de alguma deficiência (auditiva, motora, visual e/ou mental) sendo que 5,7% dos deficientes e 1,4% da população total (2.617.025 indivíduos) foram declarados como possuidores de algum grau de DI (Brasil, IBGE, 2011).

Do ponto de vista clínico, a DI pode ser considerada um sinal/sintoma de mais de 2.000 condições diferentes, incluindo-se aqui muitas doenças genéticas (algumas muito raras). Em função da complexidade que envolve o cuidado integral à saúde do indivíduo com DI, o trabalho em equipe interdisciplinar comprometendo profissionais da área da saúde e da educação, é fundamental para a eficácia no tratamento e deve incluir medidas de promoção, prevenção e reabilitação (Brasil, Ministério da Ação Social, 1994).

A identificação do fator etiológico da DI é um dos aspectos importantes na atenção à saúde dos indivíduos afetados, pois pode ajudar no manejo do paciente e no aconselhamento genético. Para a equipe de saúde que realiza o acompanhamento

do paciente, o conhecimento do possível prognóstico da doença possibilita a realização de medidas antecipatórias de cuidado clínico específicas, evitando ou adiando certos problemas de saúde, promovendo a prevenção terciária e facilitando a reabilitação (Katz e Lazcano-Ponce, 2008). Além disso, um diagnóstico etiológico correto permite o estabelecimento do risco de recorrência e a realização do aconselhamento genético junto à família do paciente (Pina-Neto, 2008).

Para o esclarecimento da etiologia da DI e o adequado manejo da situação, estes pacientes precisam ser avaliados por profissionais de saúde capacitados e devem ter acesso aos serviços de complementação diagnóstica necessários. É imprescindível salientar que pessoas com deficiência intelectual constituem um grupo heterogêneo, que reúne em uma mesma condição clínica, indivíduos com vários problemas de saúde. Por conseguinte, as ações de saúde voltadas para esse segmento, têm que considerar um mosaico de diferentes necessidades individuais e familiares. Evidentemente, tal perspectiva está condicionada à alocação de recursos (humanos e físicos), o que exige reflexões e debates visando à fundamentação e planejamento de políticas públicas no setor (Bernardes et al., 2009). Em levantamento sobre a evolução das despesas federais com cuidados à pacientes com problemas mentais entre 2001 e 2009, foi verificado que o investimento aumentou 51,3% neste período, porém há um longo caminho a ser percorrido para que os programas de saúde oferecidos sejam satisfatórios (Gonçalves et al., 2012). Segundo Horovitz et al., 2006, menos de 30% da demanda assistencial em genética clínica é absorvida pelos serviços vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS).

O SUS é o sistema de saúde público brasileiro, criado pela constituição federal de 1988, tendo por finalidade beneficiar os brasileiros, para que tenham um atendimento de qualidade e resolução de seus problemas de saúde. Os serviços de saúde vinculados ao SUS devem se desenvolver com ampla participação comunitária e recursos alocados pelos governos municipal, estadual e federal. É regido por

princípios ideológicos: universalidade, integralidade e equidade; e organizacionais: hierarquização, descentralização, regionalização e participação popular (Paim, 2009).

Em 2002, o Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº 1.060/02, instituiu a Política Nacional de Atenção à Saúde da Pessoa com Deficiência, que visa ampliar e fortalecer o acesso à informação e aos bens e serviços, disponibilizados no SUS, para cidadãos com DI (Brasil. Ministério da Saúde, 2002). Em 2009, o Ministério da Saúde, por meio da Portaria nº 81/09, instituiu a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica, cujos objetivos são: (1) organizar uma linha de cuidados integrais, que compreenda promoção, prevenção, tratamento e reabilitação de pacientes, perpassando todos os níveis de atenção à saúde com atuação profissional interdisciplinar; (2) possibilitar a identificação dos determinantes e condicionantes dos principais problemas de saúde relacionados a anomalias congênitas e doenças genéticas, de forma a fornecer subsídios para ações e políticas públicas sem prejuízo da participação social; (3) definir critérios mínimos e monitoramento dos serviços que realizam procedimentos e técnicas em genética clínica; (4) incentivar projetos e pesquisas que avaliem a questão de custos, efetividade, qualidade e possibilidade de incorporação de tecnologias na área genética; e (5) promover educação continuada dos profissionais da saúde envolvidos na implementação da Política (Brasil. Ministério da Saúde, 2009a).

Estas duas Portarias são consideradas marcos políticos importantes acerca da questão do atendimento de pessoas com DI no âmbito do SUS. Mas, o estabelecimento e a implantação das suas diretrizes, na prática, é um processo em construção. Atualmente, tais iniciativas não asseguram que, de fato, os deficientes estejam protegidos. Vive-se, na genética médica, uma fase de grandes avanços técnicos e científicos, mas de pouca ênfase no cuidado clínico integral das pessoas afetadas. São necessárias ferramentas de ação social mais equânimes e justas no setor da assistência à saúde das pessoas com doenças genéticas e DI no país.

## 1.2. Etiologia da DI e as microdeleções

A deficiência intelectual é uma condição complexa. Seu diagnóstico envolve a compreensão da ação combinada de quatro grupos de fatores etiológicos: biomédicos, comportamentais, sociais e educacionais (Carvalho e Maciel, 2003). Esses fatores etiológicos podem ser ainda subdivididos em pré-natais, perinatais e pós-natais (Basel-Vanagaite, 2008). Entretanto, muitas vezes, o reconhecimento etiológico da DI em um paciente específico é difícil, por se tratar de um grupo de condições clínicas com fatores distintos, simultaneamente envolvidos (dificultando, inclusive, a determinação de quais são os primários e os secundários que corroboram com a deficiência) (Lao Villadóniga, 2001).

O diagnóstico etiológico da DI é feito, geralmente, em menos da metade dos indivíduos afetados (Curry et al., 1997; Battaglia e Carey, 2003; Van Karnebeek et al., 2005a). As frequências das categorias de diagnóstico são muito variáveis: 18,6 a 44,5% dos casos têm etiologia ambiental e em 17,4 a 47,1% fatores genéticos estão envolvidos (Stevenson et al., 1996; Hunter, 2000; Strømme, 2000; Van Karnebeek et al., 2005b). Essas variações podem ser explicadas em função de diferenças nas amostras estudadas em relação aos critérios de seleção dos pacientes, do grau da DI, dos protocolos de estudos e dos avanços diagnósticos ao longo do tempo (Shevell et al., 2000; Van Karnebeek et al., 2005a).

Em geral, entre os fatores ambientais associados à DI está a exposição a agentes teratogênicos, tais como álcool e outras drogas, hipertermia, radiação, infecções como rubéola, toxoplasmose, sífilis e citomegalovirose. Também se destacam a falta de assistência médica adequada durante gestação e parto, complicações peri e neonatais, como trabalho de parto prolongado, hipóxia, prematuridade e convulsões, privação sociocultural, desnutrição protéico-calórica, traumatismos cranianos, infecções do sistema nervoso central ou mesmo a

combinação de diversos desses fatores (Yeargin-Allsopp et al., 1997; Winnepeninckx et al., 2003; Muhle et al., 2004).

As causas genéticas mais comuns de DI são as alterações cromossômicas, responsáveis por cerca de 15% de todos os casos (Rauch et al., 2006). Curry et al. (1997), em revisão sistemática de nove artigos<sup>3</sup>, encontraram frequência de 4% a 28% de alterações cromossômicas (numéricas e estruturais) como causa de DI. Em abrangente metanálise, na qual 219 artigos sobre investigação diagnóstica de pacientes com DI foram revisados, demonstrou-se que, em média, 9,5% dos indivíduos com DI têm aberrações cromossômicas, e este número sobe para 13,3% quando os pacientes estão institucionalizados (Van Karnebeek, 2005b).

A síndrome de Down ou trissomia do cromossomo 21 é o mais frequente e conhecido dos distúrbios cromossômicos e a causa genética mais comum de DI. Foi descrita clinicamente pela primeira vez em 1866, por Sir John Langdon Down, porém sua origem genética só foi estabelecida em 1959 por Lejeune e colaboradores. Ocorre em cerca de 1:600 a 1:1000 neonatos, de ambos os sexos e em todas as etnias, regiões geográficas e classes sociais. Em cerca de 95% dos pacientes é determinada por trissomia livre do cromossomo 21; aproximadamente 4% apresentam uma translocação Robertsoniana entre o braço longo do cromossomo 21 e o de um dos outros cromossomos acrocêntricos (geralmente o 14); uma pequena porcentagem de pacientes apresenta mosaïcismo, com uma linhagem célula trissômica e outra normal (Turleau e Vekemans, 2010). Outras alterações cromossômicas numéricas, como a trissomia do cromossomo 18 (síndrome de Edwards) e a trissomia do cromossomo 13 (síndrome de Patau) são mais raras e têm prognóstico pior, sendo que dificilmente pacientes com estas alterações sobrevivem até os 5 anos de idade (Ruggieri e Arberas, 2009; Anderlid e Bui, 2011). As grandes alterações cromossômicas estruturais mais comumente associadas a DI são a deleção do braço curto do

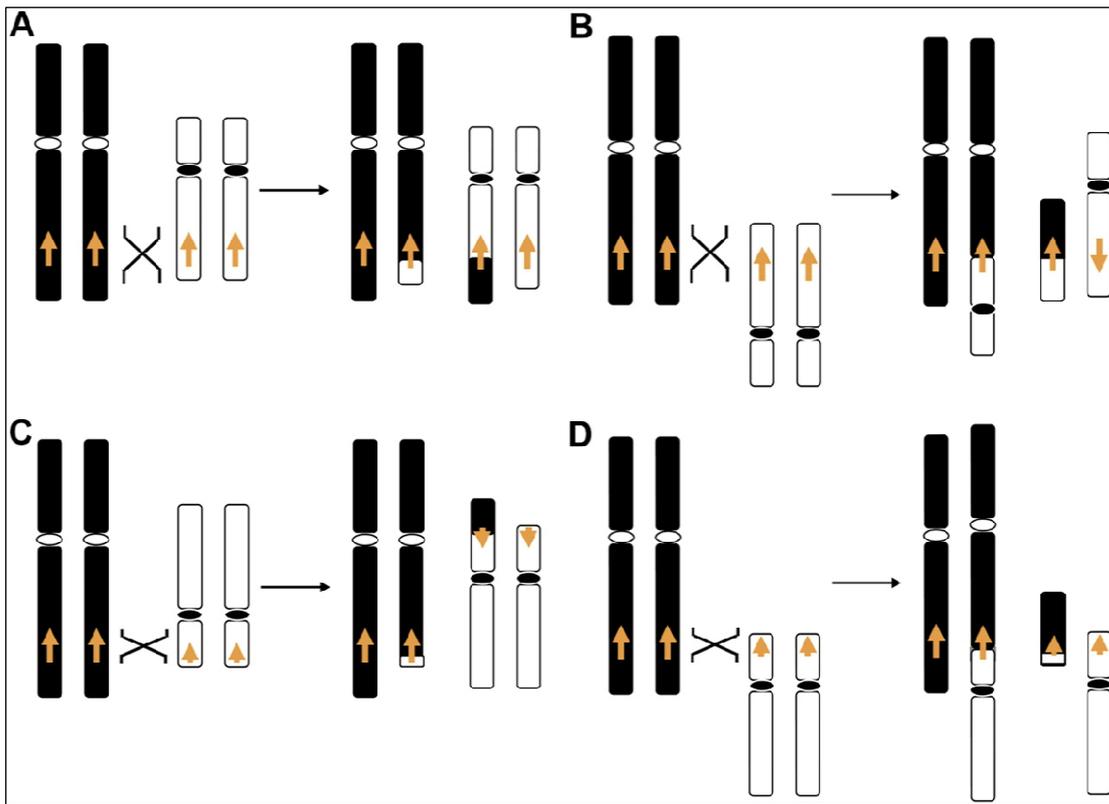
---

<sup>3</sup> Laxova et al., 1977; Opitz et al., 1982; Fryns et al., 1986, McQueen et al., 1986; Wellesley et al., 1991; Schaefer e Bodensteiner, 1992; Majnemer e Shevell, 1995; Curry et al., 1996; Anderson et al., 1996.

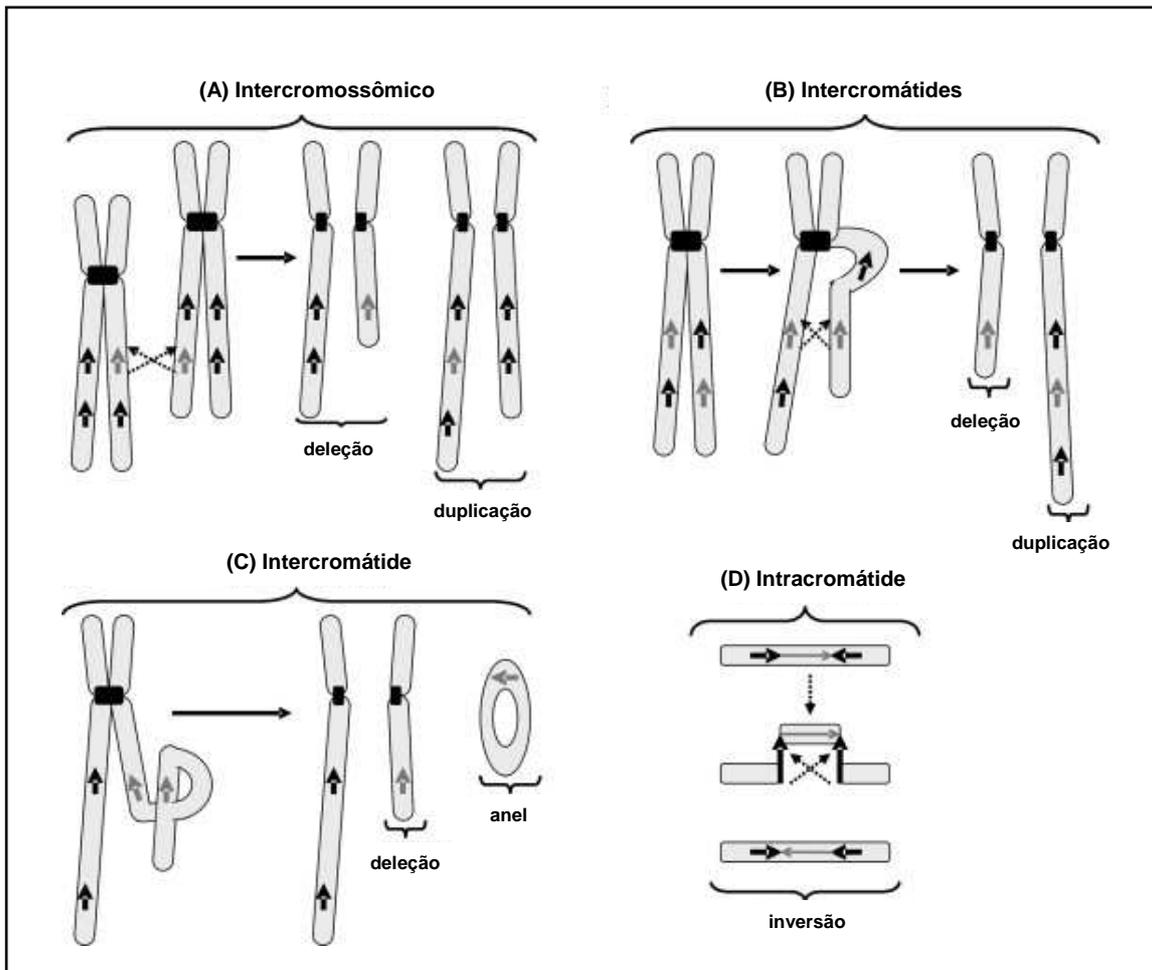
cromossomo 4 (síndrome de Wolf-Hirschhorn) e a deleção do braço curto do cromossomo 5 (síndrome de Cri-Du-Chat), ambas com incidência estimada em torno de 1 para cada 50.000 recém-nascidos (Strømme, 2000).

Pequenas alterações cromossômicas estruturais envolvendo segmentos menores que 5Mb são muito mais comuns, e ocorrem como resultado de quebras nas fitas duplas de DNA reparadas erroneamente por meio das recombinações homólogas não alélicas (*Non Allelic Homologous Recombination*, NAHR) durante a fase S das meioses I materna ou paterna (Lupski, 1998).

Condição para que ocorra NAHR é que haja quebra cromossômica e posterior rearranjo físico entre duas cadeias de DNA que possuem homologia suficiente entre suas sequências de base (normalmente, possuem pelo menos 100pb homólogas) para permitir o pareamento, embora as regiões não sejam alélicas (Shaffer e Lupski, 2000; Lieber et al., 2010). As NAHR podem envolver segmentos de DNA de dois cromossomos diferentes (não-homólogos), resultando em translocações (**Figura 1**); ou podem ocorrer em cromossomos homólogos, envolvendo cromossomos diferentes de um mesmo par (rearranjo intercromossômico), cromátides diferentes de um mesmo cromossomo (rearranjo intercromátide), ou uma mesma cromátide (rearranjo intracromátide), resultando em deleções, duplicações, cromossomos marcadores e inversões (**Figura 2**) (Gu et al., 2008; Ou et al., 2011).



**Figura 1.** Exemplos de NAHR mediadas por seqüências genômicas repetitivas entre  **cromossomos não-homólogos**, resultando em diversos tipos de translocações (Ou et al., 2011).



**Figura 2.** Exemplos de NAHR mediadas por seqüências genômicas repetitivas entre cromossomos diferentes de um mesmo par (**cromossomos homólogos**) (A), entre cromátides diferentes de um mesmo cromossomo (B), e entre segmentos de uma mesma cromátide (C e D), resultando em deleções, duplicações, formação de cromossômico em anel e inversões (figura modificada de Colnaghi et al., 2011).

A maneira como o genoma humano está organizado explica o aparecimento de NAHR. Durante a evolução do genoma dos mamíferos e a especiação dos primatas houve frequente duplicação de genes, segmentos gênicos e grupos de genes repetidos, que são chamados *duplicons* (ou *low copy repeats*, LCR), representando trechos de DNA repetitivo, que habitualmente têm mais de 300kb e similaridade de seqüência superior a 90%, localizados preferencialmente próximos aos centrômeros e

telômeros. Pelo fato dessas sequências se constituírem em regiões com alta similaridade, elas fornecem substrato e permitem que as NAHR não sejam reconhecidas como erro pela maquinaria celular (Gu et al., 2008; Ou et al., 2011).

As NAHR são um dos principais mecanismos de origem de doenças genéticas, predominantemente, de síndromes de microdeleções e microduplicações cromossômicas intersticiais (Shaw e Lupski 2004; Lupski e Stankewicz, 2005). As microdeleções e as microduplicações são frequentes e coletivamente têm incidência superior a 1 em 1.000 recém-nascidos (Emanuel e Shaikh, 2001).

A maioria dos rearranjos submicroscópicos está associada com as regiões pericentroméricas e subteloméricas dos cromossomos, provavelmente refletindo a propensão dessas regiões de acumularem *duplicons* (Emanuel e Shaikh, 2001; Rooms et al., 2005). Porém, existem regiões do genoma humano onde os rearranjos são mais frequentes, sugerindo que as NAHR não acontecem de forma aleatória. Por outro lado, existem determinadas regiões onde nunca houve relato de rearranjos, o que leva a dúvida se essas regiões são menos propícias ou se envolvem genes que em homozigose seriam incompatíveis com a vida (Shaffer e Lupski, 2000). Além disso, apesar das NAHR poderem causar vários tipos de rearranjos cromossômicos, as deleções causam um fenótipo mais severo e, por isso, são mais comumente identificadas que as duplicações e inversões (Ji et al., 2000).

Certos rearranjos ocorrem quase que exclusivamente na meiose paterna (por exemplo, duplicação CMT1A e inversão F8), enquanto outros acontecem igualmente em meioses feminina e masculina, apesar de recombinações normais (recombinação alélica ou *crossing over*) serem duas vezes mais frequentes na meiose I das mulheres que dos homens. Alguns autores sugerem que a produção continuada de espermatogônias a partir da puberdade é um fator de risco para recombinação homóloga anormal, ou seja, para NAHR, nos homens (Ji et al., 2000).

A análise citogenética por bandamento G convencional, com resolução de 400-550 bandas, é o método padrão de investigação de anormalidades cromossômicas, porém esta técnica não consegue detectar pequenas anomalias estruturais, menores que 4Mb. Uma parcela considerável dos pacientes com malformações congênitas e deficiência intelectual possui alterações cromossômicas pequenas, microdeleções com tamanho entre 2 e 5Mb, não identificadas pelo cariótipo comum (Shaffer et al., 2007; Slavotinek, 2008).

As microdeleções cromossômicas podem atingir apenas um ou uma sequência de genes; neste último caso, causam as chamadas síndromes de genes contíguos. Algumas regiões intersticiais do genoma humano são consideradas *hot spots* para recombinações, como por exemplo, as regiões 15q12, 17p11.2, 7q11.23 e 22q11.2, cujas deleções levam às síndromes de Prader-Willi/Angelman, Smith-Magenis, Williams e Velocardiofacial/DiGeorge, respectivamente. Atualmente, mais de 30 síndromes de microdeleção intersticial são conhecidas e elas têm em comum o fato de cursarem com DI e malformações não específicas. Embora, em alguns casos, o diagnóstico clínico destas síndromes possa ser suspeitado apenas pela anamnese e exame dismorfológico (ou seja, a partir de dados clínicos), em muitos pacientes, os sinais e sintomas não são suficientes para se estabelecer o diagnóstico genético específico. O diagnóstico genético é dificultado em função da plêiade de sinais e sintomas semelhantes entre diferentes síndromes (homologia fenotípica) e da diversidade de quadro clínico de uma mesma síndrome (heterogeneidade fenotípica). Nestes casos, a realização de um teste genético molecular pode auxiliar na elucidação diagnóstica do paciente. Ademais, mesmo em situações nas quais o diagnóstico genético é presumível pela clínica, o teste genético permite uma melhor caracterização etiológica, contribuindo para o aconselhamento genético (Schluth-Bolard et al., 2008).

### 1.3. Síndromes de microdeleção

#### 1.3.1. Síndrome de deleção 22q11.2 (síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial)

A síndrome de DiGeorge (OMIM #188400) e a síndrome Velocardiofacial ou de Shprintzen (#192430) foram inicialmente descritas como duas entidades clínicas distintas, porém hoje se considera que ambas representam espectros fenotípicos de uma mesma alteração genética, a microdeleção da região 22q11.2 (Rosa et al., 2009). Em um esforço para unificar estas duas doenças relacionadas à deleção 22q11.2, Wilson et al. (1993) propuseram o acrônimo CATCH22 (*conotruncal heart defect, abnormal face, T-cell deficiency, clefting, e hypocalcemia*).

Essa condição clínica se caracteriza por cardiopatia congênita, hipo ou aplasia do timo e glândulas paratireóides (mais comum no fenótipo da síndrome de DiGeorge), fenda do palato (mais comum no fenótipo da síndrome de Velocardiofacial) e dismorfias faciais particulares. Em função da hipo ou aplasia das glândulas paratireóides, os recém-nascidos podem apresentar hipocalcemia no período neonatal, manifestando tetania ou crises convulsivas. A alteração do timo ocasiona um déficit imunológico de células T, conferindo susceptibilidade a infecções. A cardiopatia habitualmente consiste em interrupção do arco aórtico, truncus arteriosus e/ou tetralogia de Fallot, mas também pode ser observada miocardiopatia. As dismorfias faciais incluem fenda palpebral oblíqua para cima ou para baixo, telecanto, blefarofimose (fendas palpebrais curtas), nariz bulboso com raiz nasal alta e quadrada, filtro nasolabial curto e boca relativamente pequena, micrognatia, orelhas baixo implantadas e com sobredobrimento de hélix (**Figura 3**). Nas crianças mais velhas pode haver presença de fala hipernasalada, associada ou não à fenda palatina (aparente ou submucosa). Normalmente os pacientes apresentam baixa estatura que varia de leve a moderada, ADNPM e dificuldade de aprendizagem, sendo que 50% dos casos são diagnosticados com DI. Uma variedade de transtornos psiquiátricos tem

sido descritos em uma proporção de pacientes adultos, incluindo esquizofrenia paranóide e depressão maior (Kobrynski e Sullivan, 2007; Gothelf et al., 2007; Gothelf et al., 2009).



**Figura 3.** Paciente com síndrome de deleção 22q11.2, com fenótipo típico (Shprintzen, 2008).

Estudos demonstram que a maior parte dos casos da síndrome é causada por NAHR intercromossômicos (Baumer et al., 1998). Em aproximadamente 10% dos casos a deleção ocorre devido ao pareamento entre as LCR de um mesmo cromossomo 22, por NAHR intercromátides ou intracromátide (Shprintzen, 2005). A região cromossômica correspondente possui três LCR, o que faz com que a síndrome possa ser causada por uma deleção de 1,5Mb ou 3,0Mb, levando a hemizigose de até 30 genes, entre eles o *TBX1* e o *COMT*. Cerca de 85% dos pacientes apresentam

uma deleção de 3Mb, 7% apresentam uma deleção de 1,5Mb e o restante possui deleções atípicas (Emanuel, 2008). A haploinsuficiência do gene *TBX1* (que codifica a proteína T-box 1, importante na formação de tecidos e órgãos durante a vida embrionária através da regulação de vários genes) é responsável por diversas malformações: cardiopatias, fendas palatais, disfunção paratireoidiana com consequente hipocalcemia, características faciais e hipoplasia do timo; enquanto a deleção do gene *COMT* (*catechol-O-methyltransferase*) é provavelmente responsável pela DI, como resultado da deficiência na produção de enzimas que participam do metabolismo das catecolaminas (Kobrynski e Sullivan, 2007; Gothelf et al., 2009).

A prevalência estimada da síndrome de deleção 22q11.2 é de 1:4.000 a 1:10.000 indivíduos (Schwinger et al., 2010), entretanto, a ocorrência de novos casos é provavelmente subestimada pela escassez diagnóstica e pela alta taxa de mortalidade fetal e neonatal em decorrência, principalmente, das alterações cardíacas, da deficiência imunológica e da hipocalcemia (Rosa et al., 2009).

A maioria dos casos acontece por mutação *de novo*, onde o risco de recorrência é muito baixo, exceto pela possível presença de mosaicismos germinativos. Há casos de transmissão parental com herança autossômica dominante e risco de recorrência de 50%, no caso de um dos pais apresentar a microdeleção o que faz com que frente a uma criança com diagnóstico de síndrome de deleção 22q11.2 possa ser necessário proceder com investigação dos pais (Rosa et al., 2009). Carelle-Calmels et al., 2009, realizaram um estudo nos progenitores de uma menina afetada e descobriram que seu pai possuía um rearranjo em ambos os alelos, um deletado e um duplicado, gerando uma situação de compensação genética com fenótipo normal. Relatos na literatura propõem que deleções no cromossomo materno têm sido mais frequentes, encontradas em aproximadamente 75% dos casos (Baumer et al., 1998). Há também relatos de pais com fenótipo da síndrome Velocardiofacial cujos filhos apresentaram fenótipo da síndrome de DiGeorge (Kobrynski e Sullivan, 2007).

### 1.3.2. Síndrome de Williams

A síndrome de Williams ou Williams-Beuren (OMIM #194050) é causada pela deleção hemizigótica da região 7q11.23. Habitualmente esta deleção tem de 1,5Mb a 1,8Mb e leva a perda de cerca de 26 a 28 genes contíguos, entre eles os genes *ELN* (da elastina) e o *CLIP2* (*cytoplasmic linker protein-2*) (Bayes et al., 2003). A região genômica envolvida na síndrome é flanqueada por três blocos de LCR. A deleção da região do cromossomo 7 ocorre por causa de NARH intercromossômico em 66% dos casos, enquanto 34% são causadas por rearranjos intracromossômicos (Antonell et al., 2006). A prevalência da síndrome na população geral é estimada entre 1:7.000 a 1:20.000 indivíduos (Schubert, 2008).

Clinicamente, a síndrome de Williams se caracteriza pela associação de diversas malformações, incluindo cardiopatia (geralmente estenose aórtica supra-valvular), alterações da coluna (normalmente escoliose) e dismorfias faciais típicas, que conferem à criança uma face élfica ou de gnomo, como estrabismo convergente, íris estrelada, nariz pequeno e com raiz baixa, lábios grandes, dentes pequenos e espaçados, bochechas proeminentes e micrognatia (**Figura 4**). Nos primeiros anos de vida pode-se verificar hipercalcemia transitória, provocando vômitos, dificuldades de alimentação e obstipação. Os pacientes apresentam ainda DI moderada, hipersensibilidade ao som (hiperacusia) e alterações típicas do comportamento caracterizado por QI verbal maior que o cognitivo, alta sociabilidade com empatia por pessoas, déficit de atenção e hiperatividade (Meyer-Lindenberg et al., 2006; Pober, 2010). Demonstrou-se que o tamanho médio do cérebro de um indivíduo portador da síndrome é menor em relação a um indivíduo saudável, especialmente nos lobos parietal e occipital, e no tronco cefálico, enquanto as estrutura límbicas, temporais e o cerebelo apresentam-se com tamanho relativamente conservado (Walter et al., 2009).



**Figura 4.** Paciente com síndrome de Williams, com fenótipo típico (Pober, 2010).

O gene *ELN* tem sido implicado nas malformações cardíacas e esqueléticas da síndrome; enquanto o gene *CLIP2* parece ser o responsável pelas alterações neurológicas e comportamentais, uma vez que as proteínas citoplasmáticas de ligação têm papel importante na interação entre organelas membranosas específicas e microtúbulos (Bayes et al., 2003).

Na maioria dos casos (95%) a síndrome de Williams ocorre em função de mutações *de novo*, mas em alguns casos a síndrome é herdada parentalmente, obedecendo a um padrão de herança autossômica dominante (Schubert, 2008).

### 1.3.3. Síndrome de Smith-Magenis

A síndrome de Smith-Magenis (OMIM #182290) é uma desordem multissistêmica que cursa com ADNPM e evolui para DI moderada a severa com comportamento autístico. Existem evidências de que as anormalidades no sistema nervoso central e os distúrbios comportamentais são resultado da inversão dos padrões de secreção da melatonina, hormônio que atua em processos regulatórios fisiológicos, mediando o ciclo circadiano pela percepção relacionada à claridade ou escuridão com atividades de vigília ou sono (Gropman et al., 2007). Habitualmente os pacientes apresentam ainda obesidade, anomalias esqueléticas (braquicefalia e braquidactilia), cardiopatias e dismorfias faciais como frontal amplo, fenda palpebral oblíqua para cima, sinofre, lábio superior proeminente em formato de arco e prognatismo (**Figura 5**). Mais raramente podem estar presentes neuropatia periférica, baixa estatura, déficit auditivo, anormalidades oculares, surdez e fenda palatina (Girirajan et al., 2006; Gropman et al., 2006; Gropman et al., 2007). Contudo, o fenótipo raramente é evidente antes da adolescência e, possivelmente, a maior parte dos pacientes permanece sem diagnóstico por toda a vida (Allanson et al., 1999). Durante a adolescência acentuam-se o distúrbio do sono e características comportamentais como onicotilomania e poliembolocoilomania (hábito de comer e/ou arrancar as unhas e de inserir objetos nos orifícios do corpo) (Finucane et al., 2001). A expectativa de vida pode ser alta, foram descritos casos de indivíduos com 88 anos de idade (Smith et al., 2001).

A grande maioria dos casos (mais de 90%) é causada por uma microdeleção intersticial de cerca de 3,7Mb em 17p11.2, compreendendo aproximadamente 20 genes e envolvendo a região do gene *RAI1* (*retinoic acid-induced 1*). O restante é causado por mutação pontual no gene *RAI1* (Elsea e Girirajan, 2008). A taxa estimada de prevalência dessa síndrome é de 1:25.000 indivíduos (Andrieux et al., 2007);

porém, Smith et al. (2005) acreditam que esta prevalência esteja subestimada e a taxa real de prevalência possa chegar a 1:15.000 indivíduos.

A maior parte dos casos ocorre por mutação *de novo*, onde o risco de recorrência é menor que 1%. Os poucos casos de transmissão parental ocorrem graças à possibilidade de mosaïcismo germinativo, encontrados em 3 a 5% dos casos; nesse caso a análise genética dos progenitores é normal (Elsea e Girirajan, 2008).



**Figura 5.** Paciente com síndrome de Smith-Magenis, com fenótipo típico (Allanson et al., 1999).

#### 1.3.4. Síndrome de Miller-Dieker

A síndrome de Miller-Dieker (OMIM #247200) envolve a deleção de genes contíguos na região 17p13.3. Suas características clínicas incluem DI severa com lisencefalia (diminuição ou ausência das circunvoluções cerebrais), microcefalia ou macrocefalia, malformações cardíacas, retardo no crescimento pré e pós-natal e algumas dismorfias faciais discretas: frontal amplo com pele da glabella levemente enrugada, fendas palpebrais oblíquas para baixo e narinas antevértidas (Herman e Siegel, 2008; Iglesias Escalera et al., 2009) (**Figura 6**).

A lisencefalia é decorrente de mutação no gene *LIS1* (*lissencephaly1 gene*). As outras anomalias são consequências da deleção de genes adicionais, próximos ao *LIS1* (Cardoso et al., 2003; Matarese e Renaud, 2009).

A expectativa de vida é baixa, a morte pode ocorrer nos primeiros anos de vida, porém tratamentos específicos tendem a aumentar a sobrevida dos pacientes (Pilz, 2003).

Em sua maioria (cerca de 80%) a síndrome é causada por mutação esporádica com baixo risco de recorrência; o restante pode ocorrer quando um dos pais é portador de uma translocação equilibrada envolvendo o cromossomo 17, sendo que nesse caso há um maior risco de recorrência, geralmente por volta de 33%. Há casos em que a microdeleção é acompanhada de um cromossomo 17 em anel, com risco de recorrência desconhecido (Dobyns e Das, 2009).



**Figura 6.** Paciente com síndrome de Miller-Dieker, com fenótipo típico (Cardoso et al., 2003).

### 1.3.5. Síndrome de Prader-Willi

A síndrome de Prader-Willi (OMIM #176270) envolve genes contíguos e, junto com a síndrome de Angelman, representa o exemplo mais bem estudado do papel do *imprinting* genômico na doença humana. Tem incidência estimada de 1:25.000 indivíduos e caracteriza-se clinicamente por severa hipotonia e dificuldade de alimentação no período neonatal, que evolui com ADNPM. Por volta dos 2 a 5 anos os pacientes começam a apresentar hiperfagia e obesidade com possibilidade de desenvolvimento de diabetes mellitus; além disso, apresentam mãos e pés pequenos, baixa estatura, alterações comportamentais (birras, teimosia, comportamento manipulador e características obsessivas convulsivas), hipogonadismo hipogonadotrófico com desenvolvimento incompleto do sistema reprodutor (causando infertilidade em alguns casos), estrabismo, escoliose e DI moderada (Whittington e Holland, 2010; Buiting, 2010) (**Figura 7**).

Aproximadamente 70% dos pacientes com síndrome de Prader-Willi possuem uma microdeleção na região 15q11-q13 do cromossomo 15 herdado do pai, resultando na deleção da cópia paterna do gene *SNRPN* (*small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N* - um gene "imprimado") e de outros genes próximos. Aproximadamente 30% dos pacientes não possuem deleções citogeneticamente detectáveis, ao invés disto, possuem dois cromossomos 15 citogeneticamente normais, ambos herdados da mãe, configurando uma situação de dissomia uniparental materna. Poucos pacientes apresentam defeito no próprio centro de *imprinting* (Cassidy e Driscoll, 2009).

Nos casos de microdeleção *de novo* no cromossomo paterno e de dissomia uniparental materna o risco de recorrência é menor que 1%, mas se houver uma deleção no centro de *imprinting* e esta deleção também estiver presente no pai o risco de recorrência para os irmãos do paciente aumenta para 50% (Ramsden et al., 2010).



**Figura 7.** Paciente com síndrome de Prader-Willi, com fenótipo típico (Turnpenny e Ellard, 2011).

### 1.3.6. Síndrome de Angelman

A síndrome de Angelman (OMIM #105830) é caracterizada clinicamente por baixa estatura, DI severa, crises convulsivas de difícil controle, espasticidade, ataxia, ausência de fala, hiperatividade, risos imotivados, excitabilidade e microcefalia. Alguns pacientes apresentam ainda hipopigmentação cutânea e prognatismo mandibular (Buggenhout e Fryns, 2009) (**Figura 8**).

Esta síndrome possui quatro mecanismos genéticos conhecidos: 70% dos casos causados por microdeleção na região 15q11-q13 do cromossomo 15 herdado da mãe; 3% a 5% por dissomia uniparental paterna do cromossomo 15; 2% a 3% por defeitos no centro de *imprinting*; e poucos casos por mutação no gene *UBE3A*, que codifica a proteína ubiquitina-ligase e tem expressão preferencial materna específica no cérebro (notadamente em neurônios e não em células gliais) (Dan, 2009).

A incidência estimada da síndrome é de 1:10.000 a 1:20.000 indivíduos. Geralmente pacientes com microdeleções têm um fenótipo mais severo que os portadores de mutações pontuais no gene *UBE3A*, enquanto os que apresentam dissomia uniparental possuem melhor desenvolvimento verbal (Cali et al., 2010).

Nos casos de microdeleção *de novo* no cromossomo materno, dissomia uniparental paterna e mutação nova em *UBE3A*, o risco de recorrência para os irmãos do paciente é menor que 1%; mas se houver deleção do centro de *imprinting* e esta deleção também estiver presente na mãe ou no caso de uma mutação no gene *UBE3A* herdada, o risco de recorrência aumenta para 50% (Ramsden et al., 2010).



**Figura 8.** Paciente com síndrome de Angelman, com fenótipo típico (Turnpenny e Ellard, 2011).

### 1.3.7. Síndrome de deleção 1p36

A síndrome da deleção 1p36 (OMIM #607872) é uma síndrome de genes contíguos, cuja microdeleção tem normalmente cerca de 2Mb a 3Mb. É relativamente frequente, com incidência estimada em 1:5.000 nascimentos, consistindo na deleção terminal mais comum encontrada em humanos. Clinicamente se caracteriza por ADNPM que evolui para DI moderada a severa, déficit auditivo, convulsões, defeitos cardíacos, dificuldade de fala, dificuldade de locomoção, distúrbios de comportamento, hipotonia, malformações renais, problemas oculares e alterações faciais, como sobrancelhas retas, olhos fundos, hipoplasia de face média, queixo proeminente, orelhas baixo implantadas e raiz nasal deprimida (Gajecka et al., 2007; Battaglia et al., 2008). A presença de obesidade e hiperfagia são características clínicas que exigem diagnóstico diferencial com a síndrome de Prader-Willi (Tsuyusaki et al., 2010) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Paciente com síndrome de deleção 1p36, com fenótipo típico (Battaglia et al., 2008).

Aproximadamente 52% dos indivíduos apresentam uma deleção terminal, 29% deleção intersticial, 12% rearranjos complexos e 7% uma junção de sequências terminais de um ou mais cromossomos à região terminal de 1p36. A maioria dos casos é consequência de eventos aleatórios ocorridos em células germinativas ou durante a fase inicial do desenvolvimento do embrião (Battaglia et al., 2008). Heilstedt et al. (2003) determinaram em seu estudo que 60% dos casos de alteração genética *de novo* são de origem materna, enquanto as microdeleções de origem paterna, embora menos frequentes, costumam ser maiores (maiores que 5Mb), o que geralmente provoca um prognóstico pior. Em estudo recente Gajecka et al. (2007) encontraram portadores de pequenas deleções com grande variedade fenotípica, sugerindo que a deleção de genes próximos possa causar fenótipos mais graves ou modificar a expressão das características clínicas.

### 1.3.8. Síndrome de Alagille

A síndrome de Alagille (OMIM #118450) é uma desordem multissistêmica que cursa com colestase intra-hepática crônica em função da escassez de ductos biliares, evoluindo com icterícia e insuficiência hepática. Os pacientes apresentam cardiopatia, estenose pulmonar, displasia renal, anomalias esqueléticas e oculares, hipogonadismo, DI, problemas digestivos, má absorção de nutrientes, hipercolesterolemia, e dismorfias faciais como frontal amplo, fendas palpebrais oblíquas para cima, hipertelorismo ocular, raiz nasal longa e queixo pontiagudo (Hofmann et al., 2010) (**Figura 10**).

Em 94% dos casos a síndrome é causada por mutações (normalmente deleções) do gene *JAG-1* (*jagged 1*), um gene de 36kb, localizado em 20p12, que tem 26 éxons e está envolvido em processos de sinalização entre células adjacentes, principalmente durante o desenvolvimento embrionário, e na manutenção de tecidos e células tronco em adultos. O gene *JAG-1* codifica um ligante do receptor Notch, responsável pelo controle da diferenciação celular: quando há a junção do ligante com o seu receptor, a diferenciação na célula vizinha é inibida (Hofmann et al., 2010). A sinalização no receptor Notch é determinante na diferenciação de células precursoras mesenquimais, o que interfere no desenvolvimento de diversos tecidos conectivos como o tecido ósseo, o conjuntivo, o cartilaginoso e o hematopoiético. A baixa expressão de Notch no tecido ósseo provoca inibição do desenvolvimento e diferenciação dos osteoblastos provocando grave osteopenia (Zanotti e Canalis, 2010). A progressiva escassez de ductos biliares em pacientes com a síndrome de Alagille sugere a importância do gene *JAG-1* também na manutenção dos ductos durante o desenvolvimento pós-natal (Sparks et al., 2011; Zong et al., 2009).



**Figura 10.** Paciente com síndrome de Alagille, com fenótipo típico (Le Gloan et al., 2008).

Alguns poucos pacientes com síndrome de Alagille (cerca de 6%) possuem mutação no gene *NOTCH2*, localizado em 1p13-p11, envolvido no controle e diferenciação de tipos celulares diferentes em muitos tecidos; nestes casos normalmente as complicações renais e cardíacas são mais brandas (McElhinney et al., 2002).

A frequência da síndrome é estimada em 1:70.000 nascimentos. Em relação ao aconselhamento genético, aproximadamente 50% a 70% dos indivíduos afetados com deleção no gene *JAG-1* apresentam uma mutação *de novo*, conferindo um risco de recorrência baixo para seus irmãos. Os 50% a 30% pacientes restantes herdaram a mutação de um dos pais, já que a penetrância é incompleta e a expressividade clínica da síndrome muito variável (Spinner et al., 2001).

### 1.3.9. Síndrome de Saethre-Chotzen

A síndrome de Saethre-Chotzen (OMIM #101400) é uma síndrome de craniossinostose, caracterizada por sinostose da sutura coronal uni ou bilateral e distúrbios como implantação baixa de cabelo na fronte, assimetria facial, fendas palpebrais oblíquas para baixo, hipoplasia da face média, prognatismo mandibular, displasia de orelhas e alterações oculares. No entanto, o quadro clínico pode ser muito variável e existem pacientes com fenótipo acentuado e sem craniossinostose (Clauser et al., 2000) (**Figura 11**).

Esta síndrome é causada por mutações (normalmente deleções) no gene *TWIST1*, localizado em 7p21. Poucos casos devem-se à mutação no gene *TWISTNB*, que dista 592kb do gene *TWIST1* (Bonaventure e El Ghouzzi, 2003, Woods et al., 2009). O gene *TWIST1* codifica uma proteína fator de transcrição da família *helix-loop-helix*, expressa no período de embriogênese, e que tem sido relacionada com a diferenciação de diversas linhagens celulares presentes em tecidos musculares, cartilagosos, ósseos e nervosos (Funato et al., 2001, Funato et al., 2005). Usualmente, os portadores da síndrome não apresentam DI ou déficit de aprendizagem, essas características costumam estar presentes em casos de deleção no cromossomo 7 provavelmente por causa da deleção de outros genes adjacentes ao *TWIST1*; as mutações estão presentes em 64% a 80% dos casos (De Heer et al., 2005), enquanto Cai et al. (2003) encontraram deleções cromossômicas em aproximadamente 11% dos casos.

Aproximadamente 1/3 dos casos da síndrome associados a alterações no gene *TWIST* são causados por mutações *de novo*; quando a síndrome é herdada de um dos progenitores, o padrão de herança é autossômico dominante com alta penetrância, onde um indivíduo portador tem 50% de chance de transmitir a alteração para sua prole (Kress et al., 2006).



**Figura 11.** Paciente com síndrome de Saethre-Chotzen, com fenótipo típico (Woods et al., 2009).

### 1.3.10. Síndrome de Sotos

A síndrome de Sotos (OMIM #117550), conhecida também como síndrome do gigantismo cerebral, é caracterizada pela tríade macrossomia, macrocefalia e idade óssea adiantada; também cursa com hipotonia que evolui para DI leve a moderada, icterícia neonatal, defeitos cardíacos e renais, e predisposição a tumores, em especial a leucemia mieloide aguda (**Figura 12**). As características físicas incluem estrabismo convergente, fenda palpebral oblíqua para baixo, frontal amplo e queixo pontiagudo; porém tendem a melhorar com o avanço da idade, dificultando a identificação de adultos afetados (Melo et al., 2002).

Cerca de 60% dos pacientes têm uma mutação no gene *NSD1*, localizado em 5q35, responsável por mediar a atividade da enzima histona metiltransferase, implicada na regulação da cromatina; aproximadamente 10% dos casos são causados por microdeleções nesta região; enquanto o restante (cerca de 30%) permanece sem etiologia definida (Tatton-Brown et al., 2005). Existem variações de prevalência destas etiologias em relação aos diferentes grupos populacionais, sendo que a etiologia mais comum em japoneses é a microdeleção, enquanto em pacientes não japoneses a prevalência de mutações intragênicas é maior (Faravelli, 2005).

Pacientes portadores de mutações de ponto apresentaram crescimento e maturação avançados e DI leve a moderada, enquanto portadores de microdeleções possuem os padrões de crescimento mais atenuados e deficiência intelectual e ADNPM mais graves além de características autísticas (Rio et al., 2003).

A maior parte dos casos da síndrome surge de forma esporádica com risco de recorrência menor que 1%. O padrão de herança é autossômico dominante, sendo que nas famílias afetadas a probabilidade de progenitores afetados terem filhos com a síndrome é de 50% (Nagai et al., 2003).



**Figura 12.** Paciente com síndrome de Sotos, com fenótipo típico (Sogaard et al., 2005).

### 1.3.11. Doença de Canavan

A doença de Canavan (OMIM #271900) é uma leucodistrofia de etiologia genética, causada por mutação no gene *ASPA*, que codifica a enzima aspartoacilase, responsável por hidrolizar o aminoácido N-acetil-aspartato (NAA) atuante no sistema nervoso central. Sua fisiopatogenia inclui a formação anormal da mielina que culmina em atrofia cerebral progressiva (Kumar et al., 2006). Outras características clínicas incluem DI, macrocefalia, hipotonia dos músculos do pescoço, rigidez muscular, atraso no desenvolvimento motor e verbal, deficiência visual e dificuldade de alimentação. A doença pode ser detectada pelo aumento de NAA na urina e no sangue (**Figura 13**) (Bitto et al., 2007).

Apenas dois tipos de mutações são responsáveis por mais de 98% dos casos da doença em judeus Asquenazes, provenientes da Europa Central e Oriental, enquanto o restante da população pode apresentar diferentes tipos de mutações (Zeng et al., 2006). Normalmente a expectativa de vida de um paciente com doença de Canavan não ultrapassa os dez anos de idade (Mersmann et al., 2011). A doença apresenta um padrão de herança autossômico recessivo; um casal onde ambos sejam heterozigotos para a mutação apresenta um risco de 25% de transmitir a doença a sua prole, 50% de ter um filho que seja portador assintomático da mutação e 25% de chance de ter um filho não doente e não portador da mutação (Matalon e Michals-Matalon, 2011).



**Figura 13.** Paciente com doença de Canavan, com fenótipo típico (Matalon e Michals-Matalon, 2000).

#### **1.4. Identificação de microdeleções e a técnica de MLPA**

Vários novos métodos de teste de biologia molecular, baseados em hibridização e amplificação, têm sido desenvolvidos nos últimos anos, com o objetivo de aumentar a taxa diagnóstica em pacientes com rearranjos submicroscópicos (Rooms et al., 2005; Callier et al., 2008; González et al., 2008; Mandal et al., 2009; Liang et al., 2009).

Uma técnica de citogenética molecular bastante utilizada para detectar microdeleções com vantagem de ser relativamente rápida e possuir alta sensibilidade e alta especificidade é a técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), na qual sondas fluorescentes específicas são hibridizadas ao cromossomo-alvo (Basset et al., 2011). Com essa técnica é possível a identificação dos segmentos cromossômicos pela homologia entre as sequências do DNA e não mais pela similaridade das bandas visíveis no cariótipo convencional. Assim, pela ausência de sinal nos cromossomos, podem ser observados rearranjos cromossômicos e deleções submicroscópicas menores que 4Mb. No entanto, McDonald-McGinn e Sullivan, (2011) consideraram a técnica de FISH demasiadamente cara e apontaram outras desvantagens: requer treinamento intensivo e grande quantidade de material genético; é incapaz de detectar algumas deleções atípicas; possui uma limitação referente à especificidade do DNA-alvo, sendo que é locus específica, portanto pode falhar quando as deleções estão em regiões proximais ou distais às flanqueadas pelas sondas; não fornece informações sobre o comprimento da deleção; e não permite a realização de reações multiplex. A técnica de FISH é usada, notadamente, na detecção de alterações cromossômicas já conhecidas, haja vista a necessidade de confecção de sondas específicas para a região em questão. Por essa razão, o método não é apropriado se a condição clínica ainda não se encontra bem esclarecida quanto a sua origem genética ou se existem muitas dúvidas no diagnóstico clínico (Sellner e Taylor, 2004; Cho et al., 2009).

A técnica de aCGH (*array Comparative Genomic Hybridization*), também é capaz de detectar perdas e ganhos cromossômicos, e diferentemente da análise citogenética convencional e da técnica de FISH, dispensa a cultura celular para a obtenção de preparações metafásicas do indivíduo a ser examinado, utilizando, para tanto, o seu DNA. Além disso, não há desvio para a análise de uma região cromossômica específica, já que todo o genoma é analisado. Na técnica de aCGH, o DNA genômico do paciente a ser testado e de um indivíduo normal (um DNA de referência que servirá como controle) são marcados com fluorocromos distintos e, posteriormente, são misturados e aplicados sobre lâminas de array. O aCGH possui resolução de até alguns Kb, dependendo somente do tamanho e da distância entre as sondas, e permite a análise de ganhos e perdas genômicas relacionadas a doenças genéticas, incluindo as síndromes de microdeleção associadas à DI idiopática (Oostlander et al., 2004; Vissers et al., 2005; Mao e Pevsner, 2005; Lockwood et al., 2006). Revisão realizada por Stankiewicz e Beaudet (2007) contabiliza mais de 13 estudos envolvendo a técnica de aCGH em pacientes com DI de origem a esclarecer, sendo que a detecção de anormalidades cromossômicas está de acordo com as observadas por outros métodos. Com base nos resultados obtidos por esses estudos é possível estimar vantagens e desvantagens do uso dessa técnica. Entre as vantagens, está a de não ser necessária a obtenção de cromossomos metafásicos, a rapidez de finalização do experimento, a praticidade (todo um genoma é analisado em uma mesma reação) e a sensibilidade (é capaz de detectar qualquer rearranjo desbalanceado e genes candidatos para diversas condições), auxiliando na identificação de diversas síndromes novas. A grande desvantagem é o fato do aCGH não ser capaz de detectar rearranjos balanceados, além do custo alto, por vezes não condizente com a infraestrutura da instituição e a situação do sistema de saúde local, o que pode inviabilizar a sua aplicação nos países em desenvolvimento.

A reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) em tempo real, método de amplificação semi-quantitativo, permite análise de DNA ou RNA e foi testada com sucesso para diagnóstico de uma série de anomalias citogenéticas. A metodologia utiliza um par de sondas marcado com fluorescência para cada região de interesse, onde o produto de amplificação resultante é proporcional à quantidade inicial da sequência na amostra (Arya et al., 2005). A técnica tem um preço mais acessível que FISH e aCGH, mas também não é indicada para reações multiplex e permite a detecção de microdeleções e microduplicações com o uso concomitante de no máximo quatro pares de *primers* marcados com fluoróforos diferentes (Weksberg et al., 2005). Kariyazono et al. (2001) compararam a técnica PCR em tempo real com FISH para detectar deleção no locus 22q11.2 e chegaram a uma correlação de 99,7% entre as duas técnicas. Seu uso é restrito aos laboratórios que possuam a aparelhagem necessária (termociclador para PCR em tempo real) e que, atualmente, ainda tem um custo relativamente alto. Além disto, o material de consumo para análise tem um custo maior, quando comparado com a PCR convencional (Rooms et al., 2005).

Alternativas promissoras para o diagnóstico dos rearranjos submicroscópicos são as técnicas fundamentadas tanto na hibridização quanto na amplificação, como a MAPH (Hibridização de Sondas Múltiplas Amplificáveis - *Multiplex Amplifiable Probe Hybridization*) e a MLPA (Amplificação de Múltiplas Sondas dependentes de Ligação - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

A técnica de MAPH foi primeiramente descrita em 2000 por Armour e colaboradores (Armour et al., 2000), e possui como princípio uma combinação de sondas hibridizadas ao DNA genômico e amplificadas pela técnica de PCR, visando detectar variações no número de cópias gênicas, menores que 150pb. Nessa técnica, o DNA genômico é desnaturado e fixado em uma membrana de *nylon*, e então hibridizado a uma série de sondas, que podem ser desenhadas especificamente para

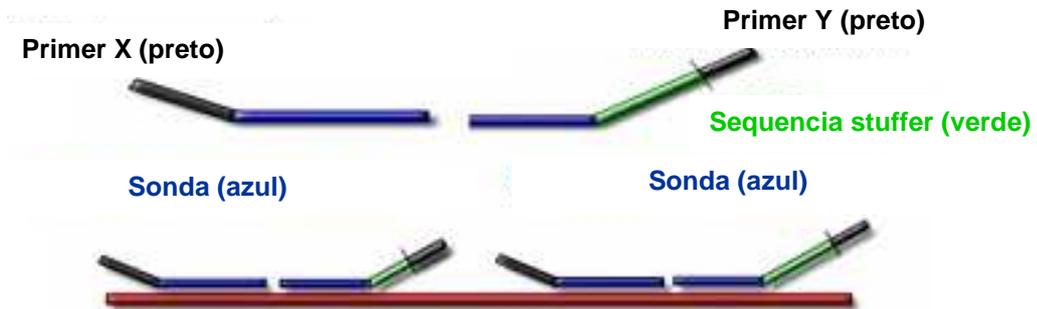
qualquer locus ou região cromossômica. Essas sondas são marcadas por radioatividade ou, mais recentemente, por fluorescência, e correspondem às sequências de interesse no estudo. Após a hibridização, a membrana é lavada para a retirada das sondas excedentes que não sofreram anelamento às regiões estudadas. Desse modo, as sondas restantes estarão presentes proporcionalmente à presença do número de cópias do segmento no genoma. Em seguida, as sondas são retiradas da membrana e amplificadas simultaneamente, por meio de um par de *primers* universais, pela técnica de PCR. Os produtos são separados por eletroforese (capilar ou por gel de poliacrilamida) e é realizada uma comparação relativa desses resultados com os de um DNA normal (de um indivíduo controle, sem alteração). A redução da intensidade da banda ou da área do pico comparada ao controle indica uma redução no número de cópias gênicas, enquanto que um aumento nessa intensidade indica uma duplicação (Sellner e Taylor, 2004; Patsalis et al., 2005). Mais recentemente, foi desenvolvida a técnica de *array*-MAPH, a partir de algumas modificações no protocolo original, determinando um ajuste do método de gel eletroforese capilar para o formato *array*. Os primeiros estudos envolvendo a técnica modificada apontam fatores limitantes para a aplicação clínica do *array*-MAPH, como a quantidade de DNA utilizada no ensaio e a possibilidade de falsos positivos; entretanto, a otimização do método pode aperfeiçoar a reprodutibilidade (Patsalis et al., 2007; Kousoulidou et al., 2010).

Na técnica de MLPA, existem duas sequências pertencentes a cada sonda específica, ambas adjacentes a *primers* universais. Essas sondas são hibridizadas à região genômica de interesse e depois são ligadas pela ação de uma enzima ligase; a partir daí o produto de ligação é amplificado por PCR utilizando-se os *primers* universais (Rooms et al., 2005). As técnicas de MAPH e MLPA são muito similares e permitem avaliar pequenas perdas ou ganhos de material genético com alta eficácia (Sellner e Taylor, 2004). Entretanto, apesar das semelhanças, a técnica de MAPH

exige maior quantidade de DNA genômico e há possibilidade de que as sondas que não sofreram hibridização, quando não retiradas completamente durante a lavagem da membrana de *nylon*, sejam amplificadas, levando a um resultado incorreto. Já na MLPA esta possibilidade não existe, pois a fase de ligação torna desnecessário o uso da membrana e a etapa de lavagem. Dessa forma, além de ser um tanto mais laboriosa, a técnica de MAPH é mais passível de sofrer contaminação quando comparada a MLPA, razão pela qual esta última técnica tem sido preferida nos estudos de rearranjos submicroscópicos (Hollox et al., 2002).

Na **Figura 14**, estão esquematizadas as etapas da técnica MLPA. Na primeira etapa (desnaturação e hibridização), observa-se os *primers* da PCR à montante e a jusante (*primers* X e Y - preto), unidos a uma sonda específica (azul), responsável por reconhecer e hibridizar na sequência do DNA de interesse. Contíguo ao *primer* Y encontra-se um segmento de DNA de tamanho variável, específico para cada sonda, denominado *stuffer* (verde), que faz com que os produtos amplificados no final tenham tamanhos diferentes, variando entre 130 e 480pb. É importante ressaltar que apenas as sondas se ligam à fita de DNA que será amplificada, os *primers* e a sequência *stuffer* não se ligam ao DNA, se ligam às sondas; isso possibilita que os *primers* utilizados para a amplificação por PCR sejam os mesmos para todos os segmentos gênicos estudados (*primers* universais). Um dos *primers* é marcado com um fluoróforo (normalmente o FAM, 6-Carboxifluoresceína), que permite que o produto da amplificação seja visualizado em equipamento de eletroforese capilar, e como esses produtos amplificados têm tamanhos diferentes (graças a sequência *stuffer*) é possível identificar diversos fragmentos simultaneamente.

### 1. Desnaturação e hibridização



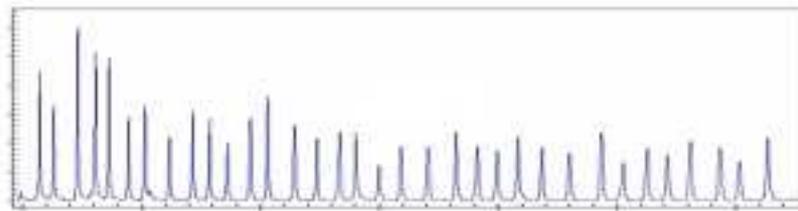
### 2. Ligação



### 3. PCR com primers universais X e Y



### 4. Análise dos fragmentos



**Figura 14.** Representação esquemática da metodologia de MLPA. Na etapa 1 (desnaturação e hibridização), observa-se hibridização das sondas (em azul). Na etapa 2 (ligação), observa-se ligação das sondas pela enzima DNA ligase (setas). Na etapa 3 (PCR), observa-se os produtos de amplificação com seus tamanhos distintos, variando de 130 a 480nt. Na etapa 4 observa-se a separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar (figura modificada de Schouten et al., 2002; <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVI/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGloqYwxaGF9Y>).

A técnica de MLPA necessita de pequenas quantidades de material genético (cerca de 20ng são suficientes) e é capaz de distinguir sequências que diferem em apenas um nucleotídeo, podendo ser utilizada para aplicações distintas, desde que se diferenciem as sondas utilizadas (Coudry, 2007). Ela permite investigar várias síndromes simultaneamente, pois mais de 50 sequências de DNA podem ser pesquisadas em uma amostra, em única reação. Portanto, há economia de recurso humano e material de consumo, e diminuição do tempo entre a coleta e o resultado do exame. O custo relativamente baixo, a simplicidade, a rapidez e a alta sensibilidade são apontados como vantagens da técnica (Rooms et al., 2005; Rooms et al., 2011).

Uma experiência nacional bem sucedida foi realizada na cidade de São Paulo, onde 261 pacientes com DI foram investigados por meio de MLPA. Nessa amostra, 87 pacientes (33,3%) apresentaram anomalias cromossômicas e em 57 pacientes (21,8%) estas anomalias foram consideradas a causa da DI. Este estudo demonstrou ainda que o custo da técnica de MLPA é pelo menos três vezes menor que as técnicas de rastreamento do genoma em larga escala, como o aCGH, o que justifica sua implantação em serviços de genética médica nos países em desenvolvimento (Jehee et al., 2011).

Nas situações de DI, a busca por um diagnóstico etiológico específico é um desafio que precisa ser enfrentado, pois pode ser essencial para o planejamento da atenção à saúde, para orientação antecipatória e para indicação das terapias de suporte em saúde e educação que, a despeito de não curativas, são fundamentais para que as pessoas com DI possam atingir o máximo de seu potencial. O esclarecimento da etiologia da DI também permite a realização do aconselhamento genético (AG) mais adequado, possibilitando explicar aos pacientes ou aos seus responsáveis, o que é a doença, como ela evolui, quais as opções de tratamento, qual o prognóstico a curto e longo prazo e qual é o risco de recorrência na prole ou na irmandade.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a presença de síndromes de microdeleção em uma amostra de pacientes com deficiência intelectual.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar clinicamente, por meio de consulta genética, uma amostra de pacientes com ADNPM ou DI de etiologia não esclarecida, investigando a história natural de seus agravos e selecionando-os para investigação molecular.
- ✓ Padronizar testes genéticos moleculares usando a técnica de MLPA.
- ✓ Utilizar a técnica de MLPA para diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção em pacientes diagnosticados clinicamente com ADNPM ou DI, sem etiologia definida ou com suspeita de síndrome de microdeleção não confirmada por teste genético molecular.
- ✓ Discutir a implantação de testes genéticos fundamentados na técnica de MLPA para rastreio de rearranjos cromossômicos em indivíduos com ADNPM ou DI idiopática no SUS.
- ✓ Contribuir para o aconselhamento genético não-diretivo nas famílias dos pacientes investigados.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Pacientes

A casuística desta pesquisa foi composta por 57 pacientes, de ambos os sexos (24 pacientes do sexo feminino e 33 pacientes do sexo masculino), com graus diferentes de ADNPM ou DI. As idades dos pacientes variaram entre 1 ano e 5 meses e 36 anos, com média geral de 12 anos e 5 meses (desvio padrão de  $\pm 7$  anos e 4 meses). A média do sexo feminino foi 12 anos e 3 meses (desvio padrão de  $\pm 7$  anos e 6 meses) e a média do sexo masculino foi 12 anos e 6 meses (desvio padrão de  $\pm 7$  anos e 4 meses). Todos os pacientes eram (e muitos ainda são) regularmente seguidos no Ambulatório de Genética Médica da UFSCar, em São Carlos. Foram incluídos na pesquisa pacientes cujos pais (ou responsáveis legais) concordaram com a participação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – **Anexo 1**), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSCar (CEP-UFSCar) – parecer N° 253/2010 – **Anexo 2**.

A caracterização clínica dos pacientes foi feita por uma única examinadora (DGM), médica geneticista, coordenadora e responsável clínica pelo projeto. Após caracterização clínica, 2 pacientes receberam hipótese diagnóstica de síndrome de Williams.

Os critérios para inclusão dos pacientes no estudo foram: (1) possuírem ADNPM ou DI sem etiologia esclarecida mesmo após avaliação médica cuidadosa ou terem hipótese diagnóstica de síndrome de microdeleção, não confirmada por teste genético molecular; (2) possuírem cariótipo a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico, com resolução de 400-550 bandas, normal; e (3) possuírem estudo de imagem do encéfalo normal (tomografia computadorizada ou ressonância magnética nuclear). Foram considerados critério de exclusão: (1) história clínica sugestiva de causa ambiental para DI (exposição a teratógenos e história de hipóxia); (2) presença

de sinais sugestivos de hipóxia ou malformação em exame de tomografia computadorizada ou ressonância magnética nuclear do cérebro e (3) alteração no cariótipo convencional.

### **3.2. Grupo de indivíduos controle**

Do grupo controle participaram voluntariamente cinco indivíduos adultos sem qualquer indício de alterações genéticas, 03 do sexo feminino e 02 do sexo masculino. A forma de coleta de amostras e extração realizada nesse grupo foi exatamente igual à realizada no grupo de indivíduos analisados no projeto.

### **3.3. Pesquisa de microdeleções pela técnica de MLPA**

Foram utilizadas amostras de sangue periférico, colhidas em tubo *vacutainer* com EDTA, através de punção venosa. O kit de MLPA utilizado foi o do kit SALSA® MLPA® P064-B2 MR1 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), escolhido por possuir 43 sondas relacionadas às 11 síndromes de microdeleção mais comumente encontradas em pacientes com DI (relacionadas na **Tabela 1**). Os produtos de amplificação desse kit apresentam tamanhos que variam de 130 a 472 nucleotídeos, mas o kit também possui 07 sondas que servem como controle de amplificação, com produtos de amplificação menores que 120 nucleotídeos. As sequências de cada sonda estão especificadas no **Anexo 3**.

**Tabela 1.** Listagem das 43 sondas do kit SALSA® MLPA® P064-B2 MR1, com as suas posições cromossômicas, os genes detectados, os tamanhos dos produtos amplificados e as síndromes relacionadas.

Sonda	Posição cromossômica	Gene detectado	Tamanho do produto amplificado (nucleotídeos)	Síndrome relacionada
2269-L01761	1p36.33	TNFRSF4	130	Deleção 1p36
6778-L06730	1p36.33	SCNN1D	135	Deleção 1p36
2589-L11228	5q35.3	NSD1	142	Sotos
1472-L00946	17p13.3	TRPV1	148	Miller-Dieker
5465-L06731	22q11.21	ARVCF	154	DiGeorge
4620-L00863	15q12	UBE3A	160	Prader-Willi
1448-L00932	17p11.2	TNFRSF13B	166	Smith-Magenis
2020-L01539	15q11.2	MKRN3	172	Prader-Willi
2890-L07968	1p36.33	GNB1	178	Deleção 1p36
1435-L00945	17p13.3	HIC1	184	Miller-Dieker
5462-L05809	22q11.21	CLTCL1	191	DiGeorge
1218-L06270	22q11.21	CLDN5	196	DiGeorge
2146-L01642	7p21.2	TWISTNB	202	Saethre-Chotzen
1303-L00855	5q35.3	NSD1	211	Sotos
2024-L01542	15q11.2	NDN	220	Prader-Willi
1561-L01133	7q11.23	CYLN2	229	Williams
1443-L08394	17p13.3	PAFH1B1	238	Miller-Dieker
1122-L00680	1p36.33	PANK4	247	Deleção 1p36
1330-L00881	7q11.23	FZD9	256	Williams
1325-L07456	17p13.3	ASPA	265	Canavan
1452-L00936	17p11.2	LRRC48	274	Smith-Magenis
1925-L01477	17p13.3	PAFAH1B1	283	Miller-Dieker
1332-L00883	7q11.23	STX1A	292	Williams
1453-L00937	17p11.2	LLGL1	301	Smith-Magenis
1333-L00876	7q11.23	ELN	310	Williams

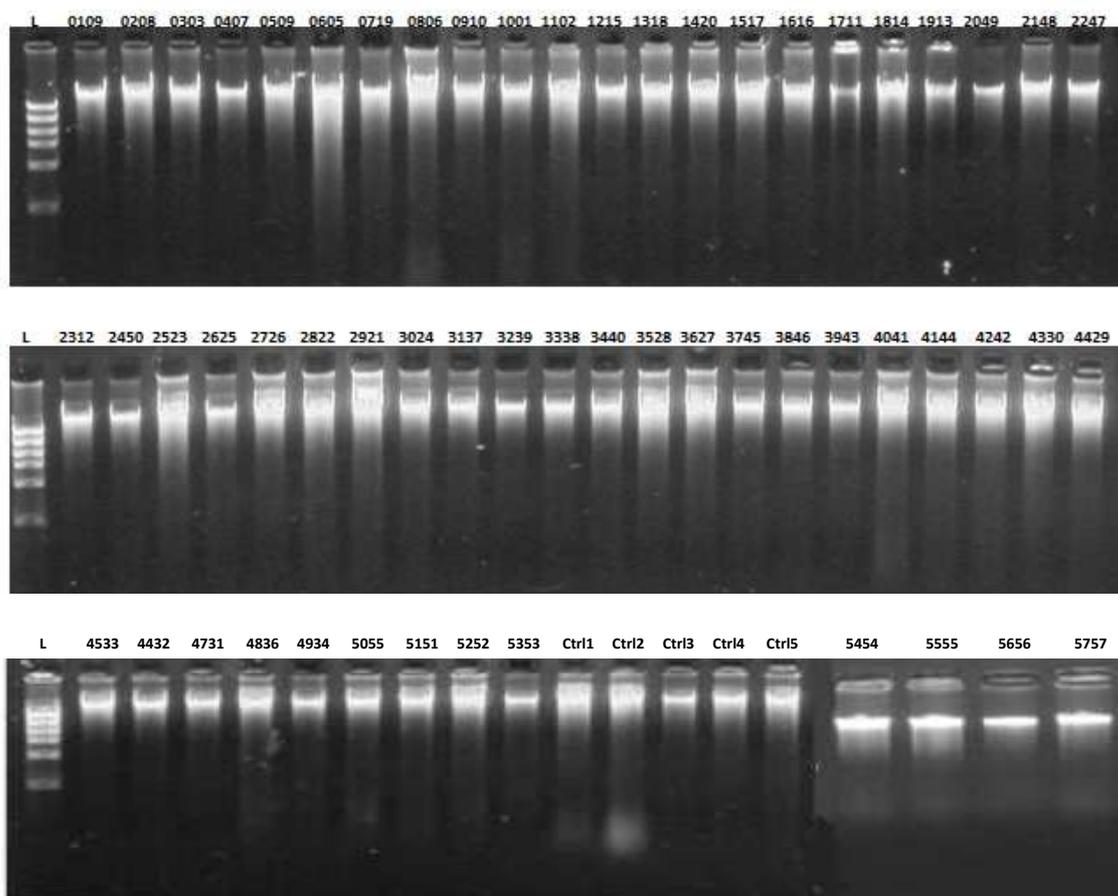
1969-L02364	7p21.2	TWIST	319	Saethre-Chotzen
1454-L00938	17p11.2	PRPSP2	329	Smith-Magenis
1682-L02331	1p36	TP73	336	Deleção 1p36
1697-L02329	20p12.2	JAG1	346	Alagille
1455-L00939	17p11.2	MFAP4	355	Smith-Magenis
1444-L02367	17p13.3	HIC1	364	Miller-Dieker
1235-L00773	22q11.21	SNAP29	373	DiGeorge
3050-L01762	1p36	TNFRSF18	382	Deleção 1p36
1337-L02333	7q11.23	LIMK1	391	Williams
9669-L00864	15q12	UBE3A	400	Prader-Willi
2038-L02330	15q12	GABRB3	409	Prader-Willi
1339-L00885	7q11.23	CYLN2	418	Williams
1924-L08393	17p13.3	METT10D	427	Miller-Dieker
2891-L02359	1p36	SKI	436	Deleção 1p36
2594-L02065	5q35.3	NSD1	445	Sotos
3069-L05815	22q11.21	FLJ14360	454	DiGeorge
5463-L05808	22q11.21	CDC45L	465	DiGeorge
3072-L02472	20p12.2	JAG1	472	Alagille

### 3.3.1. Extração do DNA

A extração e purificação das amostras do DNA foi realizada a partir das amostras de sangue total utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit, seguindo as instruções do fabricante.

### 3.3.2. Quantificação do DNA

As amostras de DNA purificadas foram quantificadas em gel de agarose 2% (Figura 15). Em seguida o DNA foi diluído em dH<sub>2</sub>O autoclavada até uma concentração entre 10 e 20ng/μL.



**Figura 15.** Quantificação em gel de agarose de todas as amostras extraídas, inclusive as amostras controles, onde a concentração de DNA presente na amostra é quantificada sua por intensidade em relação ao marcador High Mass -L (Invitrogen).

### **3.3.3. Desnaturação e hibridização das sondas**

A técnica MLPA foi realizada segundo o protocolo original do fabricante, com redução proporcional de reagentes e amostra. Para cada paciente que teve o seu DNA analisado foram realizados os seguintes experimentos: foi adicionado 2,5µL da amostra de DNA diluída em um tubo de 0,2ml, que foi centrifugado rapidamente. A amostra foi aquecida a 98°C/5min em um termociclador, depois foi resfriada a 25°C antes da tampa do termociclador ser aberta. O probemix e o tampão foram removidos do freezer, descongelados e seus tubos foram agitados e centrifugados rapidamente. Após a desnaturação foi preparada uma solução mestre com 0,75µL de SALSA probemix + 0,75µL de tampão MLPA (1,5M de KCl, 300mM de Tris-HCl pH 8,5, EDTA 1mM), para cada amostra. Foi adicionada 1,5µL da solução mestre (SALSA probemix + tampão MLPA) por tubo de amostra. A mistura foi homogeneizada com a pipeta e os tubos foram colocados no termociclador e incubados a 95°C/1min e em seguida foram incubados a 60°C por 18h (overnight).

### **3.3.4. Reação de ligação**

O tampão Ligase-65 A e o tampão Ligase-65 B foram removidos do freezer, seus tubos foram agitados em vórtex e centrifugados rapidamente. Foi preparado o mix do tampão de Ligase, contendo 1,5µL de tampão Ligase-65 A + 1,5µL de tampão Ligase-65 B + 12,5µL de dH<sub>2</sub>O para cada reação. Em seguida esta mistura foi agitada em vórtex. Foi adicionado 0,5µL da enzima Ligase-65 por amostra no mix de tampão Ligase e homogeneizado cuidadosamente com a pipeta. A temperatura do termociclador foi reduzida para 54°C, então foi adicionado 16µL da mistura Ligase-65 em cada tubo e homogeneizado cuidadosamente com a pipeta. As amostras foram incubadas a 54°C/15min e em seguida foram aquecidas a 98°C/5min para inativação da enzima 65-Ligase, com posterior resfriamento a 4°C∞.

### 3.3.5. Reação de PCR

O tampão SALSA PCR, os *primers* SALSA PCR e o tampão SALSA *Enzyme Dilution* foram descongelados e agitados em vórtex. Novos tubos para a reação de PCR foram identificados. Foi preparado um mix de tampão PCR, contendo para cada reação 2µL de tampão SALSA PCR + 13µL de dH<sub>2</sub>O ultrapura e autoclavada. Em cada tubo foi adicionado 15µL do mix e homogeneizado cuidadosamente com a pipeta. Foi transferido 5µL de cada produto de ligação no tubo de PCR correspondente à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas e armazenadas em gelo. Foi preparada a solução mestre do PCR, contendo, em cada reação 1µL de *primers* SALSA (10pmol) + 1µL de tampão SALSA *enzyme dilution* + 2,75µL de água ultrapura. Em cada amostra foi adicionado 0,25µL de SALSA *Polymerase* e homogeneizado cuidadosamente com a pipeta. O programa do termociclador foi continuado em 60°C e nessa temperatura foi adicionado em cada tubo 5µL do mix PCR. O programa de PCR foi iniciado imediatamente: 35 ciclos de 95°C/30s; 60°C/30s; 72°C/60s; 20min de incubação final a 72°C e 4°C∞. Todas as etapas da reação são observadas na **Figura 16**.

1) Desnaturação do DNA	
1. 98°C	5 minutos
2. 25°C	pausa
2) Reação de hibridização	
3. 95°C	1 minuto
4. 60°C	pausa
3) Reação de ligação	
5. 54°C	pausa
6. 54°C	15 minutos
7. 98°C	5 minutos
8. 4°C	pausa
4) Reação de PCR	
9. 60°C	pausa
35 ciclos:	· 95°C 30 segundos
	· 60°C 30 segundos
	· 72°C 60 segundos
10. 72°C	20 minutos
11. 4°C	pausa

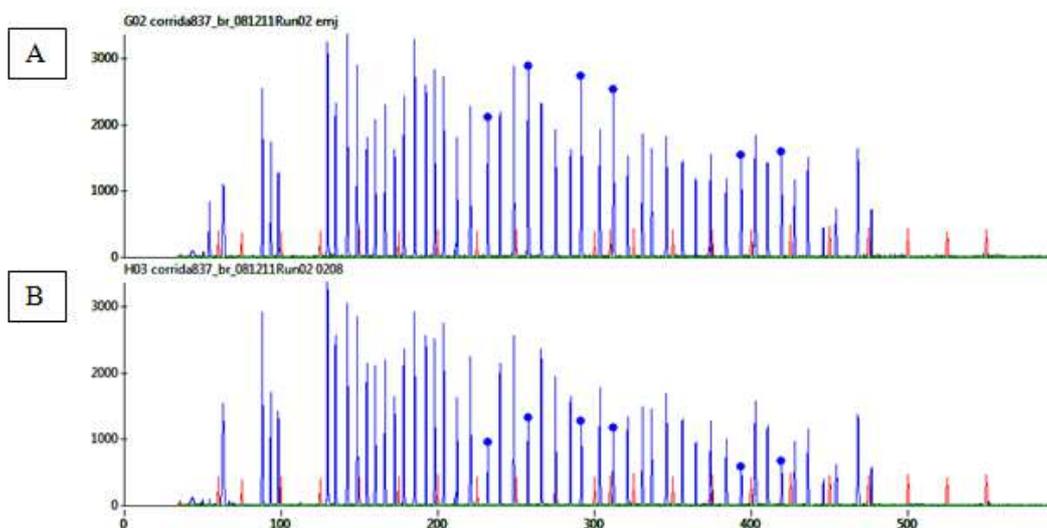
**Figura 16.** Etapas da reação de MLPA no termociclador (modificada de MRC-Holland, General MLPA Protocol for DNA Detection & Quantification - <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=wl2zCjilrCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo/xHPnTgcj>).

### 3.3.6. Separação dos fragmentos amplificados

A separação dos produtos de amplificação foi feita por eletroforese capilar em sequenciador automático. Foi preparada uma solução de aplicação contendo 7,75µL de Tween 20 a 1% + 0,25µL de MegaBACE Size Standards ET550-R. Distribuiu-se 8µL da mistura em cada poço utilizado para a análise com 2µL de cada amostra amplificada, diluída com água (5 a 10x) e desnaturada a 95°C/3min. O aparelho de eletroforese utilizado foi o MegaBACE 1000® *GE Healthcare Life Sciences*. A matriz espectral utilizada foi a ROX/ FAM/ HEX/ TET, com marcador de tamanho DNA ET Rox 550 (GE HealthCare).

### 3.4. Análise dos resultados

Após a eletroforese capilar os resultados foram visualizados em eletroferogramas através do software Fragment Profiler® (MegaBACE™ GE Healthcare Life Sciences) (**Figura 17**), onde a amostra de DNA genômico dos pacientes apresentou picos correspondentes a cada segmento de DNA amplificado, com áreas correspondentes aos fragmentos normais e deletados. A análise dos dados obtidos foi feita através da observação do tamanho dos fragmentos e sua semiquantificação foi realizada por comparação com uma média das amostras controle, sendo que uma deleção heterozigota apresentou uma diminuição de 35% a 50% na área do pico relativa ao produto de amplificação de cada sonda. Foi possível relacionar o tamanho do pico com os segmentos cromossômicos normal/normal e normal/deletado.



**Figura 17.** Eletroforese capilar dos fragmentos obtidos pela técnica MLPA. Cada pico representa a presença de um fragmento amplificado de determinado tamanho de pares de bases. A figura (A) representa o eletroferograma de um indivíduo controle enquanto a figura (B) representa um indivíduo portador de síndrome de Williams, onde os genes que estão marcados foram os que apresentaram deleção em relação ao controle A.

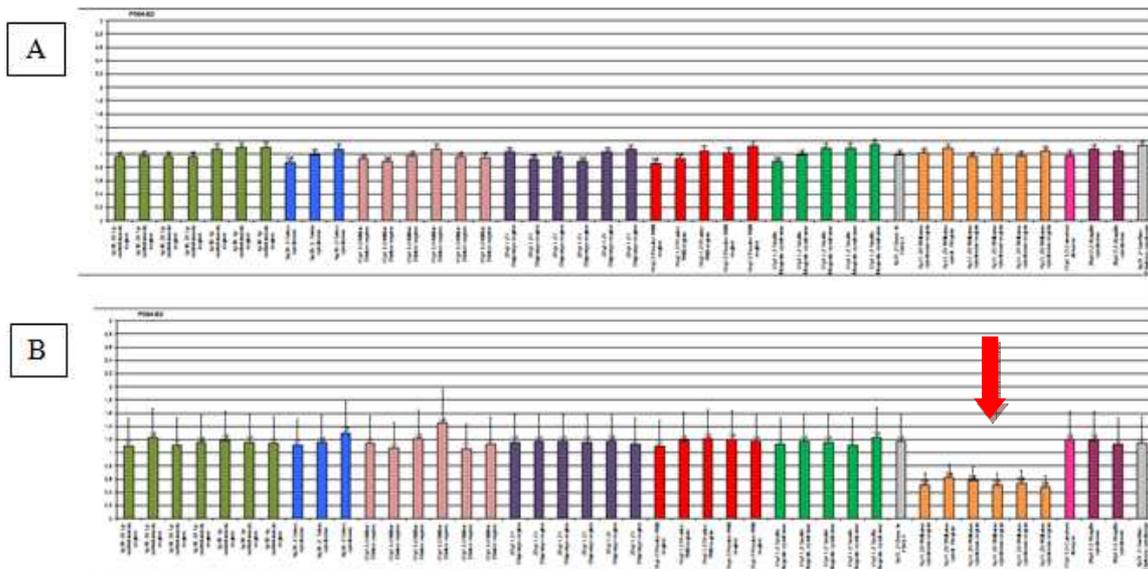
A análise comparativa dos fragmentos presentes no eletroferograma foi realizada com auxílio dos programas “Coffalyser®” (<http://old.mlpa.com/coffalyser/>) e “GeneMarker®” (*SoftGenetics LLC® genotyping software version 2.2.0*). Ambos os programas possuem duas etapas de normalização: normalização intra-amstral e inter-amstral. Na normalização intra-amstral cada sonda teste é comparada com a média dos valores de todas as outras sondas da mesma amostra, sendo essa normalização importante para corrigir oscilações da reação. Para chegar ao resultado final da análise, cada sonda do paciente já normalizada de forma intra-amstral, é dividida pela média de cada sonda correspondente nas amostras controle, o que gera a normalização inter-amstral. Nesse projeto, valores finais entre 0,75 e 1,25 foram considerados normais com duas cópias da sequência analisada (2n), enquanto valores inferiores a 0,75 indicavam deleção (n) e valores superiores a 1,25 indicavam duplicação (3n).

O programa Coffalyser MLPA® (recomendado pelo fabricante dos kits de MLPA e disponível para *download* gratuitamente no sítio web da empresa) é uma plataforma Excel e pode ser utilizado com a versão 2003 ou superior do *Microsoft Office*. Nesse programa existe uma planilha onde são adicionados os valores dos picos das amostras controle, é feita uma média e automaticamente esse valor é colocado em outra planilha e então são adicionados os valores dos picos de cada amostra teste, onde são realizadas as etapas de normalização e comparação entre amostras teste e controles, gerando os gráficos demonstrados na **Figura 18**. Os resultados são organizados de maneira que cada grupo de colunas com a mesma cor represente determinada síndrome.

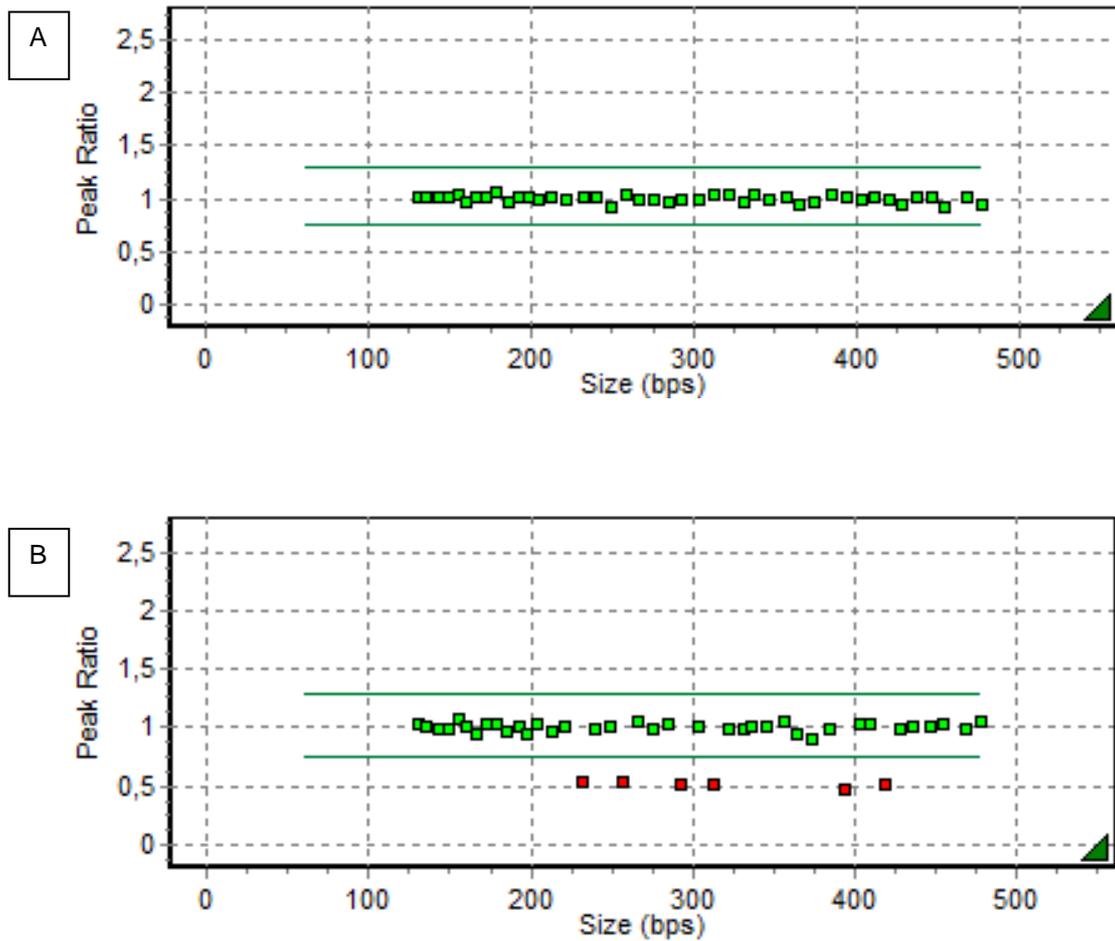
O programa GeneMarker® é mais rápido e prático. Nele são adicionados os dados brutos das corridas, sem necessidade do uso de valores dos picos obtidos pelo Fragment Profiler®. O programa é capaz de indicar quais corridas ficaram de boa qualidade, ou seja, onde as amostras passaram pelos capilares no tempo devido e foi

possível a realização adequada da normalização intra-amostal. Após a primeira fase de normalização pode-se escolher uma amostra, um grupo de amostras controle ou todas as amostras de indivíduos que não apresentaram alterações e participaram da mesma reação (chamada de normalização inter-amostal populacional), para que seja realizada a etapa de normalização inter-amostal.

As **Figuras 18 e 19** apresentam os resultados de uma amostra sem alteração detectada (A) e uma amostra com microdeleção (B) - a mesma apresentada na Figura 17.



**Figura 18.** Análise do dados brutos gerados pelo equipamento de eletroforese capilar através do software Coffalyser®. Na figura (A) não foi detectada microdeleções ou microduplicações na amostra analisada (cromossomos normal/normal), enquanto na figura (B) foi detectada microdeleção nos genes relacionados à síndrome de Williams (cromossomos normal/deletado - seta).



**Figura 19.** Análise do dados brutos gerados pelo equipamento de eletroforese capilar através do software GeneMarker®. Na figura (A) não foi detectada microdeleções ou microduplicações na amostra analisada (cromossomos normal/normal), enquanto na figura (B) foi detectada microdeleção nos genes relacionados à síndrome de Williams (cromossomos normal/deletado – quadrados vermelhos indicam genes deletados).

## 4. Resultados

### 4.1. Os resultados do MLPA

Foram detectados 4 pacientes com microdeleções em uma casuística de 57 indivíduos (7%). Entre os casos positivos foram detectados 3 pacientes com síndrome de Williams (5,3%) e 1 paciente com síndrome de deleção 22q11.2 (1,7%). Os resultados dos testes genéticos foram cuidadosamente analisados e correlacionados aos achados clínicos dos pacientes.

Os dados clínicos dos quatro pacientes positivos são apresentados após concordância e assinatura do “Consentimento do responsável para publicação de dados clínicos do paciente” (**Anexo 4**). Nas situações em que foram estabelecidas deleções, foi oferecido aconselhamento genético adequado aos pais e possibilidade de seguimento ambulatorial dos pacientes, de acordo com suas necessidades clínicas individuais, de forma a garantir um cuidado médico integral e longitudinal.

Os fenótipos dos 53 pacientes restantes, cujos resultados do MLPA foram negativos, estão resumidos no **Anexo 5**. Esses pacientes continuam em seguimento regular no Ambulatório de Genética da UFSCar, para acompanhamento da história natural das suas doenças, na tentativa de se estabelecer um diagnóstico, a partir da detecção de um novo sinal ou sintoma.

Todos os participantes receberam laudos com os resultados dos seus testes, conforme modelos disponíveis nos **Anexos 6 e 7**.

## **4.2. Casos com resultados indicativos de síndromes de microdeleção**

### **4.2.1. Paciente 0208**

Paciente do sexo masculino, no momento com 19 anos de idade. Pais não consanguíneos e jovens na época do nascimento. O paciente é o primeiro filho de uma prole de três, possuindo um casal de irmãos saudáveis. Mãe relata uma gestação tranquila, sem intercorrências, com movimentos fetais a partir do 4º mês. Nega uso de teratógenos. Paciente nasceu de parto normal, a termo com 2800g e 52cm. Recebeu alta da maternidade com 2 dias de vida, com a mãe.

Sempre foi um lactente agitado e irritado. Mamou no peito no primeiro mês de vida e como apresentou dificuldade para ganhar peso foi introduzida suplementação com leite artificial e logo a criança largou o peito. Com 3 meses de vida foi percebido sopro cardíaco, cuja avaliação mostrou tratar-se da manifestação clínica de uma malformação cardíaca congênita, a estenose da artéria pulmonar. Uma vez feito diagnóstico da estenose, passou a fazer seguimento regular com cardiologista. Não fez cirurgia cardíaca, o tratamento foi sempre conservador. Continua com seguimento cardiológico até hoje.

Durante a infância, apresentou discreto atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, mas com 1 ano e 9 meses andou sem apoio. Com 1 ano já tinha fala bem desenvolvida e nunca foi percebido atraso de linguagem. Durante a infância apresentou hipercalcemia idiopática e quadros de otite e sinusite de repetição. Sempre teve dificuldade para ganho pondero-estatural.

Estudou em escola regular e apresentou dificuldade em algumas disciplinas, notadamente matemática, mas concluiu o ensino fundamental. É alfabetizado, sabe lidar com dinheiro, tem autonomia nas tarefas da vida cotidiana, embora, segundo a mãe, necessite de supervisão. Tem comportamento agitado e se irrita com facilidade,

mas não usa medicação. Tem DI leve, atualmente trabalha como escriturário em uma empresa privada. Antes trabalhou como garçom.

Tem perda auditiva de condução moderada em ouvido esquerdo, provavelmente sequela dos quadros infecciosos de repetição. Tem distúrbio de refração e usa lentes corretivas (óculos). Faz seguimento médico anual, com avaliação das funções tireoidiana e renal, que se mantêm normais.

Ao exame antropométrico apresenta:

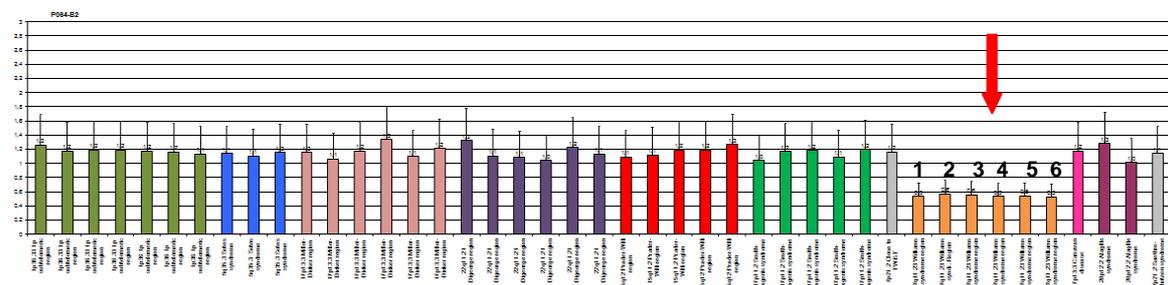
- Estatura 152cm (↓ P3)
- Peso 41.400g (↓ P3)
- Perímetro cefálico 54,5cm (P50±2DP)
- Índice cefálico 90
- Distância intercantal interna 3,2cm (P50-75)
- Distância intercantal externa 9,0cm (P75-97)
- Relação dedo médio/mão 40% (P3-10)

Ao exame dismorfológico apresenta baixa estatura proporcionada, frouxidão ligamentar, cubitus valgo, braquicefalia, fácies característica com lábios grossos e dentes espaçados, filtro nasolabial marcado, discreta hipoplasia de face média e sorriso frequente. (**Figura 20**).

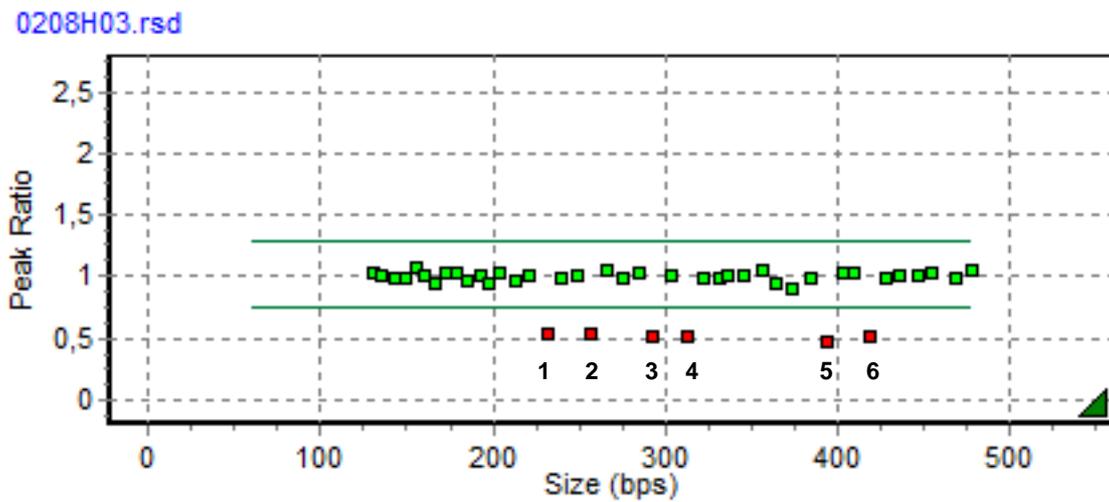
O MLPA confirmou tratar-se de síndrome de Williams, com deleção hemizigótica da região 7q11.23, em consonância com hipótese diagnóstica prévia, feita a partir da caracterização clínica do paciente, que já sugeria esse diagnóstico (**Figuras 21 e 22**).



**Figura 20.** Paciente 0208. Em (A) observar as dismorfias faciais: discreta hipoplasia de face média, filtro nasolabial marcado, lábios grossos e dentes espaçados. Em (B) observar baixa estatura proporcionada e cubitus valgo.



**Figura 21.** Diagrama do resultado do paciente 0208 em comparação com uma média de cinco controles no software Coffalyser®. Seta aponta a região deletada. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *CLYN2*; 2. *FZD9*; 3. *STX1A*; 4. *ELN*; 5. *LIMK1*; 6. *CLYN2*.



**Figura 22.** Diagrama do resultado do paciente 0208 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *CLYN2*; 2. *FZD9*; 3. *STX1A*; 4. *ELN*; 5. *LIMK1*; 6. *CLYN2*.

#### 4.2.2. Paciente 0504

Paciente do sexo masculino, no momento com 13 anos de idade. Mãe com 31 anos e pai com 29 anos na época do nascimento. Pais relatam uma consanguinidade distante, não especificada. É o terceiro filho de uma prole de três, possuindo duas irmãs saudáveis. Mãe relata que durante a gravidez teve doença hipertensiva específica da gestação e usou medicamentos, que não sabe especificar. Paciente nasceu de parto cesárea a termo com 4.000g. Recebeu alta da maternidade com 3 dias de vida, com a mãe.

Durante a lactância teve dificuldade para mamar no peito e foi diagnosticado com refluxo gastro-esofágico. Apresentou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, sendo que adquiriu sustento cefálico com 4 meses, sentou com 6 meses, com 1 ano falava frases simples e andou sem apoio com 2 anos. Com 1 ano foi diagnosticada malformação cardíaca, estenose aórtica supra-avalvar. Desde então faz seguimento regular com cardiologista. Não fez cirurgia cardíaca, o tratamento foi sempre conservador. Continua com seguimento cardiológico até hoje. Com 1 ano fez cirurgia para correção de hérnias umbilical e inguinal bilateral, e com 2 anos fez cirurgia para extração de adenoides.

Durante a infância apresentou quadros de rinite alérgica, asma, otite de repetição e infecções urinárias de repetição. Com 5 anos começou a frequentar escola regular, mas como não acompanhava a classe, aos 6 anos foi encaminhado para Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), onde estuda até hoje. Apresenta rendimento escolar regular, não sabe ler, escrever ou lidar com dinheiro. Tem autonomia nas atividades da vida diária, mas necessita de supervisão para tudo. Faz seguimento com psiquiatra e faz uso de periciazina (Neuleptil®), um neuroléptico que possui duas propriedades antidopaminérgicas responsáveis por um efeito antipsicótico. Tem DI moderada a severa.

Tem distúrbio de refração (miopia) e usa lentes corretivas (óculos). Apresenta pequena escoliose torácica dextroconvexa.

Aos 11 anos de idade desenvolveu câncer folicular de tireoide, característica ainda não relacionada à síndrome de Williams na literatura. Foi feita ressecção cirúrgica da glândula e hoje o paciente faz seguimento com endocrinologista pediátrico e repõe os hormônios tireoidianos diariamente.

Ao exame antropométrico apresenta:

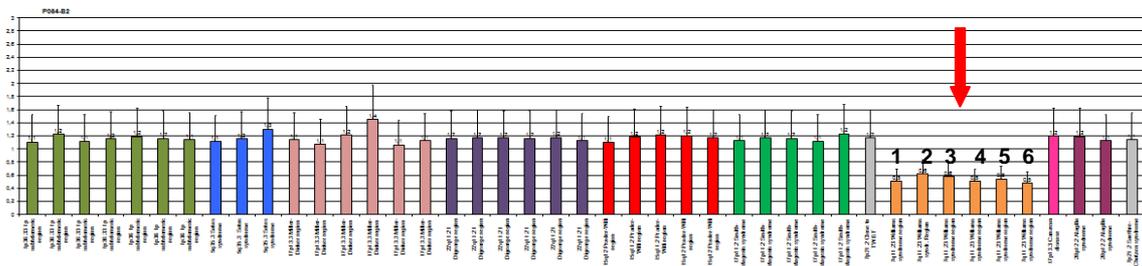
- Estatura 152cm (P50)
- Peso 42.700g (P50-75)
- Perímetro cefálico 54cm (P50±2DP)
- Índice cefálico 87
- Distância intercantal interna 3,8cm (P75-97)
- Distância intercantal externa 9,6cm (P75-97)
- Relação dedo médio/mão 43% (P25-50)

Ao exame dismorfológico apresenta frouxidão ligamentar, cubitus valgo, fácies característica com íris estrelada, discreta hipoplasia de face média, epicanto bilateral, orelhas baixo implantadas, lábios grossos e sorriso frequente (**Figura 23**).

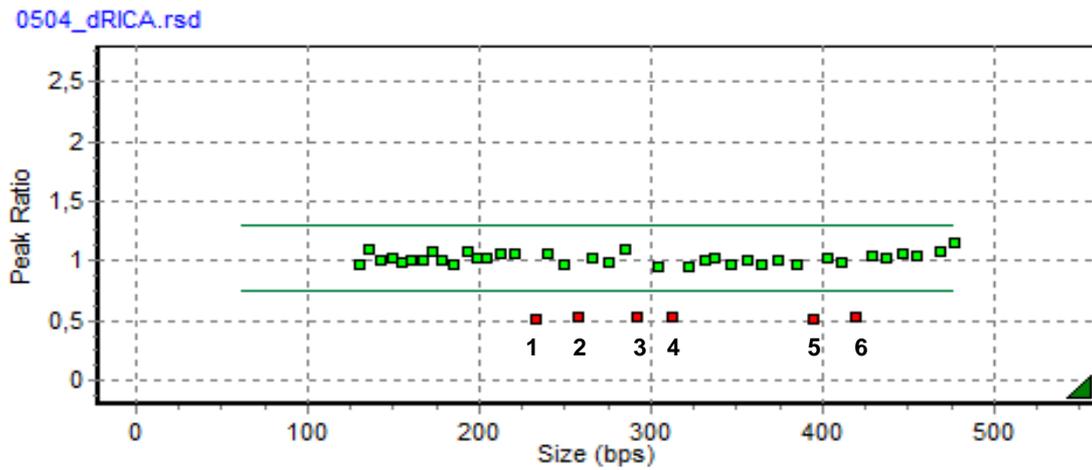
O MLPA confirmou tratar-se de síndrome de Williams, com deleção hemizigótica da região 7q11.23, em consonância com hipótese diagnóstica prévia, feita a partir da caracterização clínica do paciente, que já sugeria esse diagnóstico (**Figuras 24 e 25**).



**Figura 23.** Paciente 0504. Em (A) observar as dismorfias faciais: discreta hipoplasia de face média, orelhas baixo implantadas e lábios grossos. Em (B) observar cubitus valgo.



**Figura 24.** Diagrama do resultado do paciente 0504 em comparação com uma média de cinco controles no software Coffalyser®. Sete aponta região deletada. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *CLYN2*; 2. *FZD9*; 3. *STX1A*; 4. *ELN*; 5. *LIMK1*; 6. *CLYN2*.



**Figura 25.** Diagrama do resultado do paciente 0504 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *CLYN2*; 2. *FZD9*; 3. *STX1A*; 4. *ELN*; 5. *LIMK1*; 6. *CLYN2*.

### **4.2.3. Paciente 0910**

Paciente do sexo masculino, no momento com 14 anos de idade. Único filho de um casal não consanguíneo; mãe com 20 anos e pai com 25 anos na época do nascimento. Paciente possui meia irmã materna saudável. Mãe relata uma gestação tranquila, sem intercorrências, com movimentos fetais a partir do 4º mês. Nega uso de teratógenos. Paciente nasceu de parto normal, a termo com 2.640g e 49cm. Recebeu alta da maternidade com 2 dias de vida, com a mãe.

Não mamou no peito e logo foi introduzido aleitamento artificial. Foi um lactente tranquilo, mas apresentava gripes e amigdalites frequentes, e com 6 meses precisou ficar internado para tratamento de uma pneumonia. Durante o primeiro ano de vida foi percebido atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, tendo a criança andado sem apoio com 2 anos e 6 meses. Durante o primeiro ano de vida fez cirurgia para correção de hérnia inguinal bilateral. Aos 3 anos de idade foi diagnosticada malformação cardíaca: estenose aórtica supralvar e insuficiência mitral, sem repercussão clínica. Desde então faz seguimento anual com cardiologista. Não fez cirurgia cardíaca, o tratamento foi sempre conservador.

Entrou na escola regular com quatro anos, mas não acompanhou. Mudou de escola diversas vezes, estudou na APAE por um ano, mas mãe acha que houve piora de comportamento e retornou paciente para escola regular. No momento cursa a 4ª série do ensino fundamental. Aprendeu a ler, escrever e reconhecer números. Tem autonomia nas atividades cotidianas, embora necessite de supervisão. Tem comportamento agitado e se irrita com facilidade, mas não usa medicação. Tem DI leve a moderada.

Era muito constipado quando criança, mas atualmente não tem queixas quanto à diurese e evacuação. Mãe relata visão normal e audição sensível (se irrita com sons altos), Aos oito anos de idade realizou cirurgia para extração de adenoide.

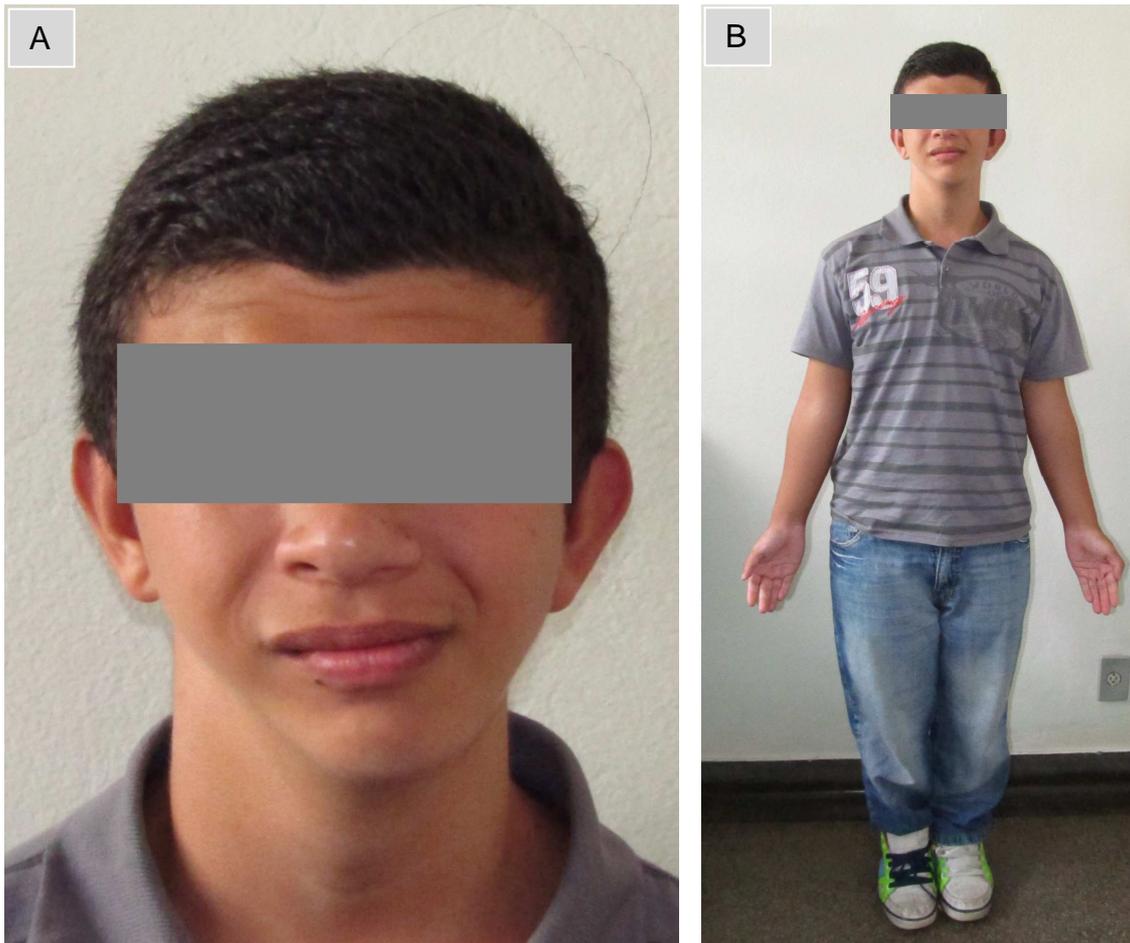
Apresentou enurese noturna até os 9 anos de idade. Atualmente, faz seguimento médico anual, com avaliação das funções tireoidiana e renal, que se mantêm normais.

Ao exame antropométrico apresenta:

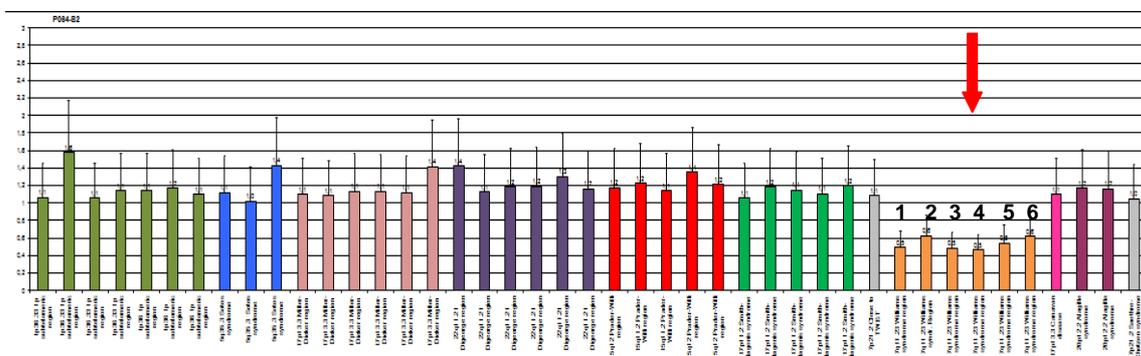
- Estatura 155,5cm (P75-90)
- Peso 63.100g (P90-97)
- Perímetro cefálico 54cm (P50±2DP)
- Índice cefálico 96
- Distância intercantal interna 3,5cm (P75-97)
- Distância intercantal externa 10,2cm (↑ P97)
- Relação dedo médio/mão 40% (P3-10)

Ao exame dismorfológico apresenta braquicefalia, assimetria de face, epicanto bilateral, orelhas baixo implantadas, lábios grossos e língua geográfica (**Figura 26**).

O MLPA confirmou tratar-se de síndrome de Williams, com deleção hemizigótica da região 7q11.23 (**Figuras 27 e 28**).

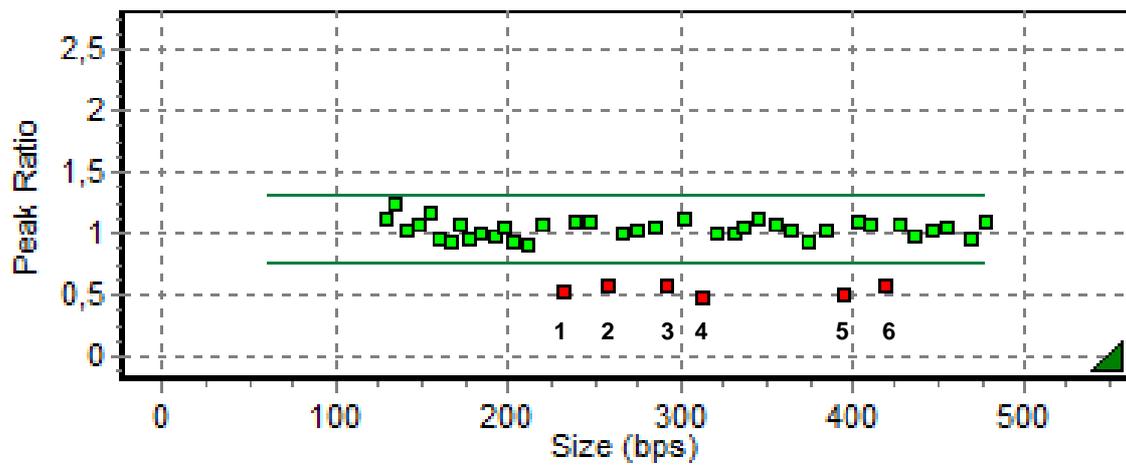


**Figura 26.** Paciente 0910. Em (A) observar as dismorfias faciais: assimetria de face, orelhas baixo implantadas e lábios grossos. Em (B) observar aspecto geral.



**Figura 27.** Diagrama do resultado do paciente 0910 em comparação com uma média de cinco controles no software Coffalyser®. Seta aponta região deletada. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *CLYN2*; 2. *FZD9*; 3. *STX1A*; 4. *ELN*; 5. *LIMK1*; 6. *CLYN2*.

0910F10.rsd



**Figura 28.** Diagrama do resultado do paciente 0910 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *CLYN2*; 2. *FZD9*; 3. *STX1A*; 4. *ELN*; 5. *LIMK1*; 6. *CLYN2*.

#### **4.2.4. Paciente 2247**

Paciente do sexo masculino, no momento com 12 anos de idade. Pais não consanguíneos; mãe com 31 e pai com 35 anos na época do nascimento. O paciente é o segundo filho de uma prole de três, possuindo um irmão mais velho (de pai e mãe) e uma meia irmã materna, ambos saudáveis. Mãe engravidou 4 vezes e teve um feto natimorto. Mãe relata uma gestação tranquila, sem intercorrências, com movimentos fetais a partir do 4º mês. Nega uso de teratógenos. Paciente nasceu de parto cesárea, a termo com 2600g, desconhece comprimento. Recebeu alta da maternidade com 2 dias de vida, com a mãe. Ao nascimento não foram observadas alterações.

Lactente mamou no peito até os 3 meses de idade, quando foi introduzido aleitamento artificial. Aos seis meses de idade a mãe percebeu hipotonia e criança foi encaminhada para fisioterapia. Mãe não sabe precisar os marcos do desenvolvimento neuropsicomotor, mas relata que paciente andou sem apoio com cerca de 3 anos de idade. No primeiro ano de vida foi percebido sopro cardíaco e durante investigação complementar realizou ecocardiograma que mostrou espessamento e prolapso dos folhetos da valva mitral com discreto refluxo e insuficiência tricúspide discreta.

Mãe nega que paciente tenha sido uma criança que ficava constantemente doente ou que tinha infecções de repetição. Relata que teve atraso de linguagem e começou a falar palavras com aproximadamente 4 anos de idade. Apresentou controle de esfíncter urinário diurno com cerca de 3 anos. Os primeiros dentes começaram a surgir com 1 ano de idade e aos 7 anos precisou fazer cirurgia odontológica para extração dentária, porque tinha problemas de mordida cruzada.

Com 5 anos começou a frequentar escola regular, mas como não acompanhava a classe aos 8 anos foi encaminhado para a APAE, onde estuda até hoje. Apresenta rendimento escolar ruim, não sabe ler nem escrever, não reconhece números, não sabe lidar com dinheiro, não reconhece cores. Não tem autonomia nas

tarefas da vida cotidiana, não sendo capaz de realizar as atividades de higiene pessoal autonomamente. Tem DI severa.

Ao exame antropométrico apresenta:

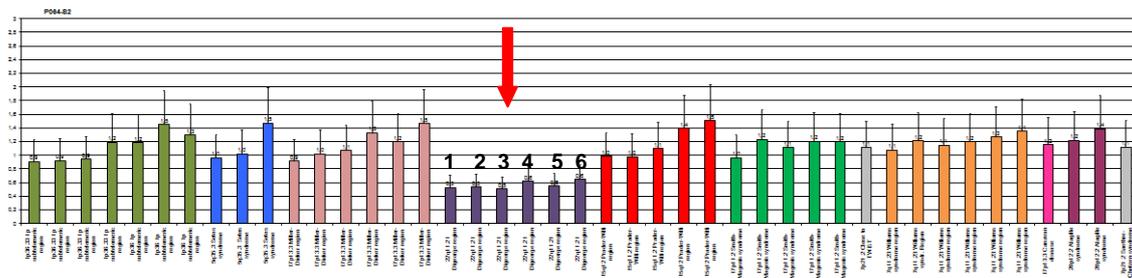
- Estatura 159cm (P50-75)
- Peso 49.200g (P50-75)
- Perímetro cefálico 54,5cm (P50±2DP)
- Índice cefálico 93
- Distância intercantal interna 4,2cm (↑ P97)
- Distância intercantal externa 10,6cm (↑ P97)
- Relação dedo médio/mão 46% (P75-97)

Ao exame dismorfológico apresenta braquicefalia, hipoplasia da face média, raiz nasal alta, hipertelorismo ocular, ptose palpebral bilateral, fenda palpebral oblíqua para baixo, orelhas baixo implantadas com displasia de pavilhão auricular e sobredobramento de hélix, palato muito alto, dentes apinhados e prognatismo mandibular. Apresenta ainda dificuldade para extensão dos cotovelos bilateralmente, mamilos invertidos, polegares digitalizado à esquerda e hipoplásico à direita (**Figura 29**).

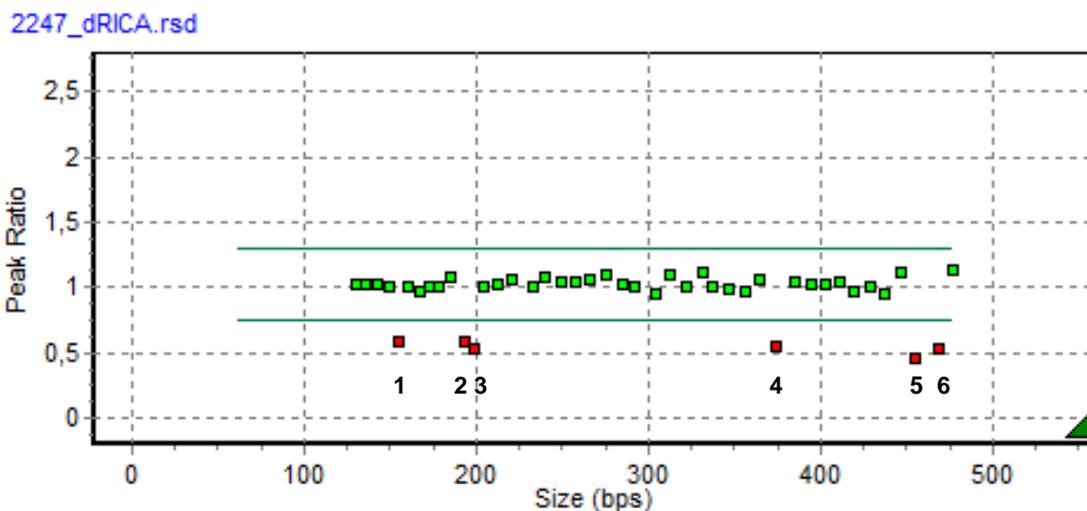
O MLPA confirmou tratar-se de síndrome de deleção 22q11.2 (**Figuras 30 e 31**).



**Figura 29.** Paciente 2247. Em (A) observar as dismorfias faciais: hipoplasia da face média, raiz nasal alta, orelhas baixo implantadas com displasia de pavilhão auricular e sobredobramento de hélix, dentes apinhados e prognatismo mandibular. Em (B) observar aspecto geral. Em (C) observar defeitos de eixo radial com polegares digitalizado à esquerda e hipoplásico à direita.



**Figura 30.** Diagrama do resultado do paciente 2247 em comparação com uma média de cinco controles no software Coffalyser®. Sete aponta região deletada. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *ARVCF*; 2. *CLTCL1*; 3. *CLDN5*; 4. *SNAP29*; 5. *FLJ14360 (KLHL22)*; 6. *CDC45L*.



**Figura 31.** Diagrama do resultado do paciente 2247 em comparação com uma média populacional no software GeneMarker®. As sondas deletadas correspondem aos seguintes genes: 1. *ARVCF*; 2. *CLTCL1*; 3. *CLDN5*; 4. *SNAP29*; 5. *FLJ14360 (KLHL22)*; 6. *CDC45L*.

## 5. Discussão

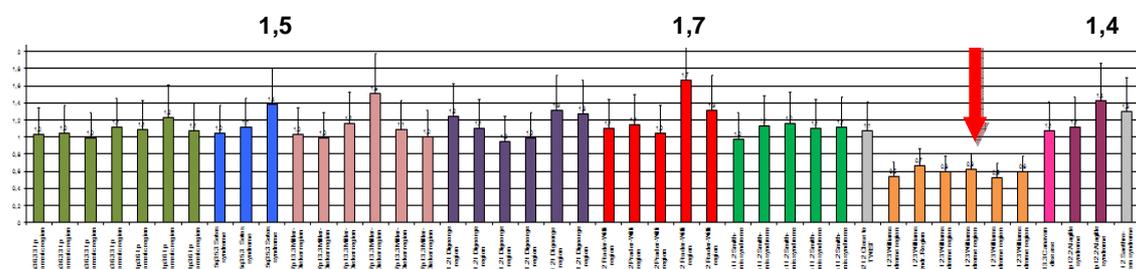
### 5.1. Dificuldades para padronizar os testes de MLPA

As principais dificuldades para padronização dos testes genéticos fundamentados no MLPA foram encontradas durante a análise dos resultados laboratoriais nos softwares. As primeiras reações foram analisadas apenas com o software Coffalyser®. Nas duas primeiras reações houve diferença significativa entre os picos das amostras teste e os picos das amostras controle, o que gerou resultados inconclusivos e tornou necessária a repetição da reação em diversas amostras. Em função disso, a quantidade de reagente não seria suficiente para a repetição e realização dos testes restantes em todos os pacientes, sendo necessário recorrer à redução proporcional de reagentes e amostras em cada reação.

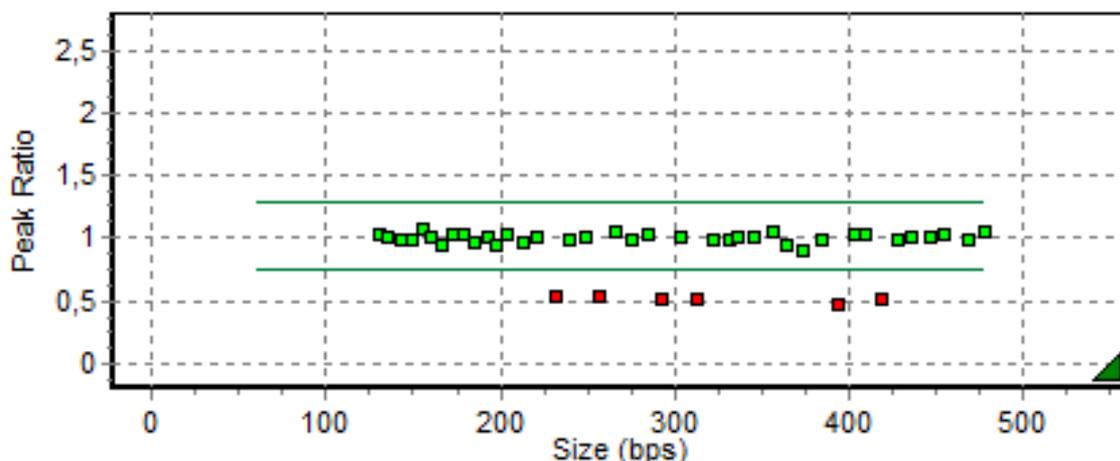
O software GeneMarker® foi considerado melhor que o Coffalyser® por sua capacidade de realizar dois tipos de normalização inter-amostral, onde a mais robusta e escolhida para análise das amostras nesse projeto foi a normalização inter-amostral populacional. Em três amostras, referentes aos pacientes 4144, 5656 e 5757, a análise dos resultados obtida pelo software Coffalyser® foi inconclusiva, pois essas amostras apresentaram diferentes picos anormais, sugerindo duplicações, em relação aos controles. Já no software GeneMarker® a análise comparativa dessas amostras com a população geral revelou resultados normais.

A **Figura 32** apresenta uma amostra analisada pelo software Coffalyser®, na qual é possível observar a região relacionada à síndrome de Williams deletada (seta); porém, na mesma amostra, aparecem também genes onde a comparação com os indivíduos controle sugere presença de duplicações. A **Figura 33** apresenta a mesma amostra, analisada pelo software GeneMarker®, através da normalização inter-amostral populacional as dúvidas relativas a possíveis duplicações gênicas foram

resolvidas e se observa que, ao contrário da **Figura 32**, há alteração exclusivamente dos genes relacionados à síndrome de Williams.



**Figura 32.** Exemplo de uma amostra da primeira reação analisada com o software *Coffalyser*®. Observa-se que além da deleção dos 6 genes correspondentes à síndrome de Williams (seta), há aparente duplicação de outros genes, relacionados a outras síndromes.



**Figura 33.** Exemplo de uma amostra da primeira reação analisada com o software *GeneMarker*® - mesma apresentada na Figura 32. Observa-se deleção unicamente dos 6 genes relacionados a síndrome de Williams.

## 5.2. O MLPA como técnica adequada para rastreio de DI idiopática

No que diz respeito ao diagnóstico de síndromes genéticas em pacientes com DI, algumas síndromes são mais facilmente reconhecidas pelo fenótipo do paciente, porém, outras possuem grande variedade fenotípica com um leque de características clínicas possíveis e não patognômicas, o que dificulta o diagnóstico genético preciso. É importante que seja feita uma análise de custo e benefício para avaliar a utilidade clínica de realização de testes genéticos de rastreio ou triagem que aumentem a taxa de diagnóstico nesses pacientes.

Vieira (2012), em seu projeto de doutorado, realizou um levantamento dos custos de testes genéticos fundamentados em diferentes técnicas visando o diagnóstico da síndrome DiGeorge. Considerando apenas insumos dos testes laboratoriais, o trabalho de Vieira (2012) revelou que o custo do cariótipo convencional com bandamento G foi R\$27,00; o custo de FISH com uma única sonda foi R\$197,48 e o custo de um teste de MLPA com várias sondas que flanqueiam a região 22q11.2 foi R\$100,00.

O cariótipo convencional está incluído na tabela de procedimentos do SUS com valor de R\$32,48 (SIGTAP - <http://sigtap.datasus.gov.br/>), sendo que este valor deve ser suficiente para cobertura de gastos de insumos laboratoriais, de infraestrutura e recursos humanos necessários para a realização do exame. Ademais, o cariótipo convencional é útil no diagnóstico de anomalias numéricas, porém é parcialmente eficaz no caso de anomalias estruturais. Essa técnica detecta alterações em aproximadamente 3% a 15% dos casos de pacientes com anomalias congênitas e DI, mas para detecção de pequenas alterações, como as microdeleções, outras técnicas são necessárias (Jehee et al., 2011).

Em indivíduos com DI de etiologia desconhecida é interessante a realização de testes de *screening* genético (também denominados testes de triagem ou rastreio). Recentemente, o aCGH tem sido indicado para a realização de uma triagem inicial,

pois é um teste com capacidade de ampla varredura, alta sensibilidade e especificidade, permitindo detecção de anomalias genéticas, rearranjos desbalanceados e genes relacionados à predisposição de inúmeras doenças, sendo a primeira opção diagnóstica em casos de pacientes com anomalias múltiplas e DI em países desenvolvidos (Miller et al., 2010; Mefford et al., 2012). Contudo, o aCGH é uma técnica de alto custo, geralmente incompatível com a realidade do sistema de saúde público brasileiro e com a renda familiar do paciente. Além disso, a interpretação de seus resultados pode ser bastante complexa, já que frequentemente são encontradas alterações sem importância clínica ou de significado desconhecido.

Alternativas diagnósticas foram propostas em diversos estudos (Pereira et al., 2003; Weksberg et al., 2005; Sandrin-Garcia et al., 2007). A técnica MLPA também funciona como um *screening*, que não promove uma varredura total no genoma, mas é útil para a realização de triagens por permitir análise de até 50 regiões genômicas simultaneamente em mais de 85 pacientes em uma única reação (isso considerando que um sequenciador automático permite a análise capilar de até 96 amostras, porém algumas devem ser reservadas para as amostras controle); os resultados podem ser liberados em poucos dias, com prazo médio de 48 horas; e requer pequena quantidade de DNA. Existe uma variedade de kits de MLPA, vendidos comercialmente pela empresa MRC-Holland, com capacidade de diagnosticar determinadas síndromes ou grupos de síndromes, porém não é necessária a utilização dos kits prontos, a técnica permite que sejam desenhadas sondas específicas para sequências genômicas de interesse, onde um profissional capacitado pode agrupar pacientes com características comuns a determinadas síndromes e realizar testes ainda mais específicos, a exemplo do estudo realizado por Vieira (2012), que selecionou pacientes com anomalias palatais e hipótese diagnóstica de deleção 22q11.2 determinada por geneticistas clínicos, e chegou à conclusão diagnóstica em 38% dos casos utilizando um kit de MLPA que continha 44 sondas específicas para região

22q11.2. A desvantagem de testes fundamentados na tecnologia de MLPA, assim como em outras técnicas, exceto na aCGH, é que o resultado negativo não exclui totalmente a possibilidade do indivíduo possuir alguma das síndromes pesquisadas, pois a alteração pode se encontrar em regiões não flanqueadas pelas sondas utilizadas ou a síndrome pode ter sido causada por outro mecanismo que não microdeleção/duplicação. Esta limitação do método foi devidamente esclarecida nos laudos fornecidos aos responsáveis pelos pacientes participantes deste projeto (Anexos 6 e 7). A técnica de MLPA também não permite detecção de rearranjos balanceados e tem dificuldade em detectar casos de mosaicismo com menos de 40% das células alteradas, assim como o aCGH (Kozlowski et al., 2008).

Uma série de estudos compararam testes genéticos fundamentados em diferentes técnicas e concluíram que MLPA é efetiva, fidedigna e reprodutiva, auxiliando o médico geneticista a chegar ao diagnóstico através do rastreio de determinados rearranjos cromossômicos (Fernandez et al., 2005). Van Hagen et al. (2007) compararam as técnicas FISH e MLPA em 63 pacientes com suspeita clínica de síndrome de Williams; nesse estudo todas as alterações detectadas em FISH também foram detectadas em MLPA, em apenas um paciente foi detectada uma deleção pequena atípica por MLPA que não havia sido previamente detectada por FISH, chegando à conclusão que MLPA é confiável na detecção da síndrome de Williams, além de ser mais rápida e capaz de detectar deleções menores e atípicas quando comparada ao FISH. Weksberg et al. (2005) também compararam FISH e MLPA em 51 pacientes positivos e 12 negativos para alterações em 22q11.2 pela técnica FISH; o MLPA foi capaz de detectar as 51 alterações já confirmadas e mais 2 em pacientes onde a alteração não havia sido detectada pelo FISH. Vorstman et al. (2006) aplicaram a técnica MLPA em amostras de mais de 50 pacientes com alterações em 22q11.2 confirmadas por outros métodos (deleções, deleções atípicas, duplicações e translocações não balanceadas); novamente os resultados do MLPA

foram reprodutíveis e compatíveis com os estudos de citogenética convencional e FISH. Palomares et al. (2006) compararam a eficácia da técnica de MLPA para detecção de rearranjos subteloméricos com o teste de FISH em 50 pacientes com DI idiopática; seus resultados mostraram alto grau de concordância entre as duas técnicas, levando os autores a concluir que o MLPA é mais adequado, por ser mais rápido e econômico. Cho et al. (2009) realizaram testes de MLPA em 12 pacientes com síndromes de microdeleção, já confirmadas por FISH, e encontraram resultados perfeitamente concordantes na detecção das síndromes de DiGeorge, Williams, Prader-Willi e Miller-Dieker. Estudo holandês, realizado com 63 crianças com síndrome de Williams, mostrou que nas situações onde a técnica de MLPA foi ineficaz, o FISH também não foi capaz de detectar alteração cromossômica (Van Hagen et al., 2007). Kirchhoff et al. (2007) realizaram investigação por MLPA em 258 pacientes com DI e suspeita clínica de síndromes de microdeleção, utilizando os kits comerciais MLPA® SALSA P064 e P023 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands); a análise indicou a presença de microdeleção em 5,8% dos pacientes. Estudo realizado na China, também por meio da técnica de MLPA, com 180 crianças com DI, mostrou 7% de frequência de rearranjo subtelomérico (Li et al., 2009). Outra pesquisa chinesa, incluindo 451 crianças com DI investigadas por MLPA, mostrou alteração subtelomérica (microdeleções e microduplicações) em 5,1% dos pacientes (Wu et al., 2010). Estudo recente, realizado com 120 pacientes belgas com DI idiopática investigados com MLPA, detectou rearranjos subteloméricos ou intersticiais em 5% dos pacientes (Rooms et al., 2011).

No presente trabalho, testes genéticos fundamentados na técnica de MLPA foram utilizados para detectar um conjunto de 11 síndromes de microdeleções em uma casuística de 57 pacientes com DI idiopática ou com hipótese diagnóstica ainda não confirmada por teste genético molecular. Foram detectados 7% de pacientes com microdeleção, frequência condizente com outros estudos relacionados à detecção de

síndromes genéticas em amostras de pacientes com DI selecionadas de forma semelhante (Kirchhoff et al., 2007; Li et al., 2009; Laczmanska et al., 2011). Koolen et al. (2004) realizaram um *screening* para pesquisa de deleções subteloméricas utilizando MLPA em 210 indivíduos e detectaram 6,7% de pacientes com alterações. Monfort et al. (2008), em uma amostra de 46 pacientes com DI e anormalidades congênitas, detectaram rearranjos patogênicos, incluindo deleções, duplicações e rearranjos subteloméricos, em 18% dos pacientes. Hryshchenko et al. (2012) analisaram 113 pacientes ucranianos detalhadamente através de métodos clínicos, citogenéticos e de genética molecular, encontrando 28 pacientes (24,78%) com alterações cromossômicas das quais 21 (18,58%) se mostraram patogênicas. O MLPA foi utilizado ainda em um estudo com 65 crianças indianas portadoras de DI idiopática, sendo detectadas alterações em 4,6% dos pacientes gerais e em 13% dos pacientes que além de DI tinham dismorfias faciais (Mandal et al., 2009).

O kit utilizado no presente trabalho custou R\$6.000 e foi suficiente para padronização da técnica e análise de 57 pacientes, sendo que o custo médio do teste para cada paciente foi R\$105,30 (considerando-se apenas o preço do kit). Sem a fase de padronização o kit permitiria análise de 85 pacientes, com custo médio de R\$70,60. Devido à possibilidade de realização do exame em muitos pacientes e por possuir preço relativamente baixo quando comparado a outras técnicas de biologia molecular, o MLPA tem-se mostrado uma ótima alternativa para rastreio de síndromes genéticas em portadores de DI.

Para a implantação de um laboratório capacitado para realizar testes de MLPA é necessário aquisição de alguns aparelhos que na atualidade têm os seguintes valores aproximados: termociclador R\$20.000,00, microcentrífuga R\$4.000,00, banho-maria seco R\$1.000,00 e sequenciador automático R\$300.000,00. Além disso, é preciso considerar a compra dos kits, que atualmente tem seu valor em torno de R\$5.000,00, os gastos com os recursos humanos e insumos básicos laboratoriais

(inclusive para extração do DNA). Cabe ressaltar que a aquisição destes equipamentos permite a realização de uma série de outros testes de biologia molecular, não apenas o MLPA. Além disso, os custos dos testes podem ser otimizados se forem juntadas amostras para que sejam realizadas análises laboratoriais de uma só vez, embora isso possa causar certo atraso na liberação de resultados.

É notório que para se montar tais estruturas laboratoriais, manter a realização dos testes genéticos e promover a assistência necessária aos pacientes haverá gastos, com treinamento de pessoal, aquisição de equipamento e estruturação de laboratórios. Mas esses gastos serão certamente compensados com a diminuição de exames e tratamentos desnecessários, assim como a possível diminuição na incidência das doenças genéticas. Além disso, deveria haver incentivo para produção de equipamentos e insumos no Brasil, o que certamente diminuiria ainda mais os custos com os testes.

### 5.3. Genética Médica e os testes genéticos no SUS

A genética médica lida, habitualmente, com doenças individualmente raras, mas que somadas constituem um grupo considerável, com frequência de 31,5 a 73,0 por cada 1.000 indivíduos (Jorde e Carey, 2004). Cerca de 5% dos nascidos vivos brasileiros apresentam algum defeito congênito, determinado total ou parcialmente por fatores genéticos (Horovitz et al., 2005). À medida que os indicadores de saúde da população melhoram e as doenças causadas por má nutrição, condições insalubres e patógenos externos são controladas, as doenças genéticas e as anomalias congênitas passam a ser responsáveis por uma proporção crescente das mortes entre as crianças (Marques-de-Faria et al., 2004; Horovitz et al., 2005). É o que acontece no Brasil onde, desde 2005, estas afecções (representadas pelo capítulo XVII do Código Internacional de Doenças - malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas) são a segunda causa de mortalidade infantil em todas as regiões do país (DATASUS; <http://www.datasus.gov.br/>).

Além disto, as doenças genéticas são responsáveis por boa parte das situações de internação em hospital pediátrico, deficiência intelectual, doenças neurodegenerativas e infertilidade, o que evidencia o considerável efeito que têm sobre a saúde e a qualidade de vida (Giugliani, 2002). Embora existam poucas estimativas sobre os custos da assistência às pessoas com doenças raras (como a maioria das doenças genéticas), sabe-se que estes custos são altos e incluem cuidados especiais nas áreas da saúde e da educação; além da perda parcial ou total de rendimentos para o principal cuidador do paciente, implicando em perdas econômicas para as famílias e para comunidade (Zurynski et al., 2008). No Brasil, não é incomum que pacientes com doenças genéticas, portadores de deficiências incapacitantes para o trabalho, sejam beneficiados pela Lei Orgânica da Assistência Social e recebam benefício do Instituto Nacional de Seguro Social (INSS), onerando

também o sistema previdenciário (Horovitz et al., 2005). Disso resulta a importância da assistência à saúde na área da genética médica.

No Brasil, os serviços de genética médica começaram a se desenvolver nos anos 60 e 70, quase sempre ligados a cursos de Pós-Graduação em Genética Humana e/ou Médica e com interesse maior na pesquisa de certas doenças ou grupos de doenças. Durante as décadas de 70 e 80, foram se estruturando serviços com maior capacidade assistencial, ligados a hospitais e/ou instituições universitárias públicas (Brunoni, 2002). O acesso dos pacientes aos especialistas em genética médica no Brasil é prejudicado, já que boa parte desses profissionais está localizada nas regiões Sul e Sudeste do país, e os profissionais não geneticistas muitas vezes encontram dificuldade em reconhecer sinais e sintomas das doenças genéticas ou, quando reconhecem têm dificuldades operacionais para encaminhar o paciente até um geneticista (Novoa e Burnham, 2011).

Cadastramento realizado pela Sociedade Brasileira de Genética Médica no ano de 2001 registrou a existência de 64 serviços assistenciais de genética médica: 37 (58%) na região Sudeste (75,7% no Estado de São Paulo), 17 (26%) na região Sul, 7 (11 %) na região Nordeste e 3 (5%) no Centro-Oeste. Na época, não foi identificado nenhum serviço na região Norte. Os tipos de serviços oferecidos eram bastante variáveis, sendo alguns muito abrangentes (atendimento clínico, laboratorial e pesquisa), enquanto em outros lugares era oferecido somente aconselhamento genético (Marques-de-Faria et al., 2004).

Dados da pesquisa “Demografia Médica no Brasil”, conduzida pelo Conselho Federal de Medicina (CFM), publicados em dezembro de 2011, apontam a existência de 156 médicos especialistas em genética distribuídos no território nacional (<http://portal.cfm.org.br/images/stories/pdf/demografiamedicanobrasil.pdf>). Além do número de profissionais insuficiente, existe grande disparidade em relação à distribuição desses especialistas, sendo que 87 (55,77%) residem no Sudeste, 33

(21,15%) no Sul, 17 (10,9%) no Nordeste, 16 (10,26%) no Centro-Oeste e apenas 3 (1,9%) na região Norte. A distribuição geográfica dos profissionais e serviços de genética médica relaciona-se com a densidade populacional e o índice de desenvolvimento humano das regiões, e nas áreas mais pobres e menos povoadas (em particular no Norte e Nordeste) há uma maior carência.

O número de procedimentos e pessoal envolvido na assistência em genética médica no Brasil é claramente insuficiente para atender à demanda, sendo que a maior parte dos pacientes e famílias que padecem com doenças genéticas não recebe cuidado adequado. Além disso, em função da concentração de profissionais da saúde e serviços nas regiões Sul e Sudeste, existe grande migração de pacientes (especialmente do Norte e Nordeste), em busca de atendimento especializado. A escassez de recursos humanos especializados é um entrave para inclusão da assistência em genética clínica no SUS (Novoa e Burnham, 2011).

A incorporação de recursos genéticos no sistema público do país começou a ser discutida em 2004, pelo Grupo de Trabalho de Genética Clínica (Portaria nº 2.380/GM de 28 de outubro de 2004; <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-2380.htm>), composto por membros da Sociedade Brasileira de Genética Médica, membros da Sociedade Brasileira de Genética e técnicos do Ministério da Saúde. Foi o trabalho desse grupo que resultou na publicação da Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica no SUS, em janeiro de 2009 (Brasil, Ministério da Saúde, 2009a). Essa Política foi aprovada pelo governo e publicada no Diário Oficial da União do Brasil, tornando-se assim em vigor imediatamente após sua publicação, no entanto, como muitas vezes acontece, ela deixou alguns aspectos práticos para serem regulamentados. A Secretaria de Atenção à Saúde (SAS) foi designada como responsável pela adoção das medidas necessárias à plena estruturação da Política, o que inclui a organização de diretrizes, protocolos de conduta, mecanismos de referência e contra referência, de

regulação, controle e avaliação; mas ainda não se sabe como e quando a Política será implantada de fato. Atualmente, um Grupo de Trabalho, criado no início de 2012 pelo Ministério da Saúde, se ocupa do assunto “Doenças Raras” e, dada grande interseção entre “doenças raras” e “doenças genéticas”<sup>4</sup> discute vários aspectos relacionados a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica no SUS, entre eles a necessidade de incorporação pelo SUS das tecnologias de biologia molecular vinculadas aos testes genéticos, especialmente os testes de diagnóstico em pacientes sintomáticos.

Em 2007, foi publicada uma nota técnica do Conselho Nacional dos Secretários de Saúde (CONASS) sobre a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica, que na época ainda não havia sido aprovada, mas estava sendo discutida pelo Grupo de Trabalho de Genética Clínica do MS. Quando a nota técnica do CONASS foi elaborada, o impacto financeiro apresentado pela equipe técnica do MS com a implantação da Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica no SUS foi de R\$ 3 milhões/ano; mas este custo não contemplava a necessidade de ampliação da oferta de procedimentos, especialmente na média complexidade. Não há dúvidas de que a implantação dos serviços aumentará a demanda para os procedimentos de diagnóstico, entre eles os testes genéticos, exigindo pesquisa e regulamentação do assunto.

A incorporação de tecnologias, por parte dos sistemas de saúde, seja o SUS, seja o sistema de saúde suplementar, é um aspecto que precisa ser pensado, pois representa um custo ainda não dimensionado e exige uma estrutura complexa e transdisciplinar com um longo caminho a ser percorrido, a começar por melhores investimentos para equipar laboratórios, educação continuada transdisciplinar e

---

<sup>4</sup> Conceitualmente, “doença rara” é aquela cuja incidência é menor que 1:2.000 indivíduos; cerca de 80% das doenças raras são doenças genéticas, os 20% restantes compreendem algumas doenças imunológicas, alguns cânceres e doenças infecto-contagiosas raras. Para as informações sobre doenças raras consultar: <http://www.orpha.net/>

aumento da capacidade do mercado de trabalho para absorver profissionais especializados.

A transferência efetiva da ciência e da tecnologia baseada no genoma, para os sistemas de saúde, foi objeto da Conferência de Bellagio, Itália, em 2005, na qual 18 especialistas do Canadá, França, Alemanha, Reino Unido e EUA discutiram como promover uma interação efetiva e responsável do conhecimento genético em benefício da saúde da população (Burke et al., 2006). No que se refere aos testes genéticos, alguns pontos são clarificados pela Convenção sobre os Direitos do Homem e a Biomedicina, conhecida como Convenção de Oviedo, assinada pela maioria dos Estados Europeus, que: (1) decreta a necessidade dos laboratórios de testes genéticos instalarem um sistema de garantia de qualidade e de o seu pessoal ter qualificações que estejam de acordo com as recomendações e os padrões das organizações internacionais, (2) estabelece que os testes genéticos devem obedecer a critérios de utilidade clínica e (3) determina que os testes genéticos para fins de saúde sejam realizados apenas sob supervisão médica individualizada e condicionados ao AG (Council of Europe, 1997).

No Brasil, uma diretriz do Conselho Federal de Medicina (CFM) e da Associação Médica Brasileira (AMB), de 2004, intitulada “Genética Médica: Teste Laboratorial para Diagnóstico de Doenças Sintomáticas”, estabelece que os testes genéticos para diagnóstico em pacientes sintomáticos devem ser indicados quando o resultado tiver o potencial de ser útil; no entanto, o julgamento sobre a utilidade do teste fica a critério do médico e do paciente, não havendo qualquer tipo de outra regulamentação sobre o assunto (Raskin et al., 2004).

Ao longo dessa pesquisa com acompanhamento individual dos casos, constatou-se uma realidade de descaso com o setor da saúde, principalmente quando se trata de doenças genéticas raras. Após três anos da implantação da Portaria nº 81/09, além dos anos que foram gastos para sua elaboração, a realidade pouco

mudou; e maior parte dos testes genéticos diagnósticos é realizada em contexto de pesquisa, em Instituições de Ensino Superiores, Hospitais Universitários e Programas de Pós-Graduação. A realização de exames na rede de saúde suplementar vem crescendo e se diversificando, porém os custos para a maior parte da população brasileira são demasiadamente altos e inacessíveis, em um país onde aproximadamente 80% da população utiliza o SUS (Castilla e Luquetti, 2009). Desde 2008, testes genéticos de diagnósticos fundamentados em técnicas de biologia molecular foram incluídos nos serviços prestados por planos de saúde, desde que tenha indicação de um geneticista clínico e que seja realizado em território nacional (ANS – Resolução normativa nº167 de 10 de janeiro de 2008).

A melhor maneira para implantação dos testes genéticos laboratoriais no SUS seria a estruturação de grupos de atendimento clínico e laboratórios regionais, organizados e geridos pelo Ministério da Saúde, onde cada um possa se especializar em determinadas técnicas e doenças, com adequada interligação entre os laboratórios e os demais profissionais envolvidos na busca de diagnóstico para os pacientes assistidos clinicamente (Horovitz et al., 2006).

A despeito das dificuldades para inserção da genética clínica no SUS, os testes genéticos já se encontram no mercado e são oferecidos aos pacientes dos sistemas de saúde público e suplementar. Um aspecto prático adicional à espera de ser regulamentado são os requisitos específicos para laboratórios de genética que ofertam testes genéticos, incluindo as normas em relação ao sistema de controle de qualidade e acreditação.

Sobre a regulamentação dos testes genéticos, existe um Projeto de Lei, tramitando na Câmara dos Deputados em Brasília (PL 4097/2004), que dispõe sobre as condições para a realização e análise de exames genéticos em seres humanos, cujo teor não é consensual entre os profissionais que atuam na área da Genética Médica no Brasil. Ademais, a Sociedade Brasileira de Genética (SBG) por meio da sua

Comissão sobre Legislação e Exercício Profissional e do seu Comitê de Normatização e Procedimento em Laboratórios de Genética Humana, elaborou um documento intitulado “Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana”, que propõe uma normatização laboratorial, apesar de não preencher todas as lacunas, no que respeita à certificação e controle de qualidade (Borovik et al., 2004).

Em 05 de novembro de 2009, o Ministério da Saúde publicou a Portaria N° 2.690, que instituiu a Política Nacional de Gestão de Tecnologias em Saúde, ficando estabelecido que as tecnologias em saúde devem ser implantadas no SUS à luz dos princípios de universalidade, equidade e integralidade. Os objetivos dessa Política são: (1) orientar os processos de incorporação de tecnologias nos sistemas e serviços de saúde; (2) nortear a institucionalização dos processos de avaliação e de incorporação de tecnologias baseados na análise das consequências e dos custos para o sistema de saúde e para a população; (3) promover o uso do conhecimento técnico-científico atualizado no processo de gestão de tecnologias em saúde; (4) sensibilizar os profissionais de saúde e a sociedade em geral para a importância das consequências econômicas e sociais do uso inapropriado de tecnologias nos sistemas e serviços de saúde; e (5) fortalecer o uso de critérios e processos de priorização da incorporação de tecnologias, considerando aspectos de efetividade, necessidade, segurança, eficiência e equidade (Brasil, Ministério da Saúde, 2009b).

Apesar da existência de uma portaria para orientar os processos de incorporação de tecnologias nos sistemas de saúde, especificamente em relação a inserção dos testes genéticos nada foi estabelecido ou regulamentado. A falta de regulamentação estimula a criação de laboratórios privados, por vezes sem um sistema de qualidade implementado, favorece a oferta selvagem de testes sem utilidade clínica comprovada e estimula a venda direta dos mesmos, sem prescrição médica e sem aconselhamento genético.

Também precisam ser definidas regras em relação à venda direta de testes genéticos ao consumidor (para a qual não existe ainda legislação). Embora não se conheça laboratórios brasileiros que ofereçam esse serviço, a população brasileira está vulnerável às empresas estrangeiras através da internet. Não há maneira de se saber qual o impacto real dessa prática no Brasil (não há estudos publicados ou pesquisas feitas), mas acredita-se que, como em outros países em desenvolvimento, isso ainda não é muito significativo.

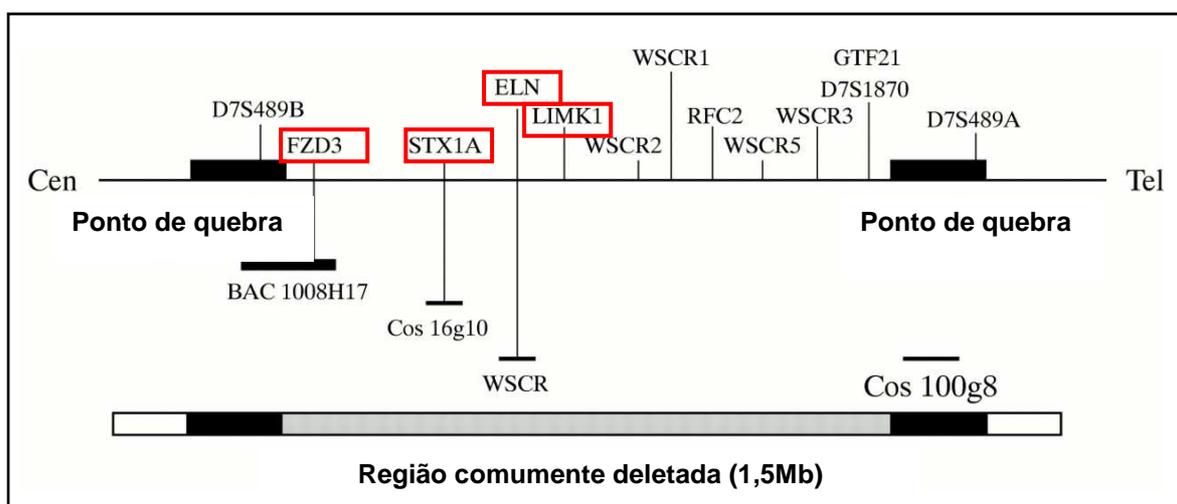
A técnica MLPA desmistifica a ideia de que os testes moleculares são extremamente caros e trabalhosos, tornando-se viável a sua incorporação no SUS, dentro de uma linha de cuidado de atenção a pessoas com doenças genéticas, que inclua assistência clínica ao paciente e aconselhamento genético familiar adequados, em consonância com a Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica no SUS.

O maior desafio nessa área no Brasil, neste momento, é ser capaz de estabelecer modelos e processos de avaliação em relação à utilidade clínica dos testes genéticos já ofertados, organizar testes e contextos prioritários, combater a oferta indiscriminada e a dispersão de recursos com testes sem utilidade clínica comprovada e promover a formação e distribuição nacional de profissionais especializados, ampliando desse modo o acesso aos usuários do SUS e agregando aspectos técnicos e éticos à assistência em genética médica no país.

#### 5.4. Considerações sobre o diagnóstico da síndrome de Williams

A síndrome de Williams é citogeneticamente caracterizada por uma microdeleção de 1,5Mb a 1,8Mb, que leva a perda de cerca de 26 a 28 genes contíguos. A **Figura 34** demonstra a região deletada em 7q11.23. A relação genótipo-fenótipo dos principais genes deletados na síndrome de Williams é apresentada na **Tabela 2**. Os três pacientes identificados no presente estudo apresentaram deleção de 6 genes localizados na região 7q11.23 e presentes no kit de MLPA utilizado. Como esses 6 genes estão compreendidos na região mais comumente deletada de 1,5Mb, não é possível determinar se as deleções desses três pacientes possuem 1,5 ou 1,8Mb. Essa distinção também não pode ser suspeitada pela clínica, já que não há uma clara distinção fenotípica de acordo com o tamanho da deleção (Pober, 2010).

A **Tabela 3** apresenta as principais características clínicas descritas na literatura em pacientes com síndrome de Williams, comparando-as com os pacientes diagnosticados no presente trabalho.



**Figura 34.** Região genômica do cromossomo 7 envolvida na síndrome de Williams (Botta et al., 1999). Em vermelho estão circundados alguns dos genes mais importantes para o fenótipo.

**Tabela 2.** Genótipo/fenótipo relacionado à haploinsuficiência de alguns dos genes associados à síndrome de Williams, detectados pelo SALSA®MLPA®P064-B2-MR1.

GENE	PROTEÍNA	FUNÇÃO/FENÓTIPO <sup>5</sup>
<i>FZD9</i> ou <i>FZD3</i> - Frizzled Drosophila homolog 9 ou 3 (OMIM *601766)	Frizzled-9 ou 3	Importante para o desenvolvimento embrionário e diferenciação celular; é expressa em todas as áreas do cérebro, nos testículos, músculo esquelético e rim.
<i>STX1A</i> - Syntaxin 1 (OMIM *186590)	Sintaxina	Importante na regulação de canais de íons e sinapses. Responsável pelas alterações na tolerância à glicose e na memória auditiva.
<i>ELN</i> – Elastin (OMIM *130160)	Elastina	Responsável pelas alterações cardiovasculares e do tecido conjuntivo.
<i>LIMK1</i> - LIM Domain Kinase 1 (OMIM *601329)	LIM-Kinase 1	Participa de processos celulares associados à estrutura do citoesqueleto e estimula o crescimento dos axônios. Contribui para o déficit cognitivo global e as alterações na cognição visio-espacial.
<i>CLIP2</i> - Cap-gly- domain-containing Linker Protein 2 ou <i>CYLN2</i> - cytoplasmatic linker 2 (OMIM *603432)	Proteína de Ligação 2	Mediadora de interações entre organelas específicas de membranas do SNC e microtúbulos. Responsável pelo fenótipo neurocognitivo.

<sup>5</sup> NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Tabela 3.** Características da síndrome de Williams.

<b>Característica</b>	<b>Frequência na literatura<sup>6</sup></b>	<b>Paciente 0208</b>	<b>Paciente 0509</b>	<b>Paciente 0910</b>
DI	50 a 90%	Leve	Moderada a severa	Leve a moderada
Alterações cardiovasculares	50 a 80%	+	+	+
Hipercalcemia	5 a 50%	+	-	-
Hiperacusia	85 a 95%	-	-	+
Deficiência de crescimento	70%	+	-	-
Alteração tireoidiana	10 a 30%	-	+	-
Otitis frequentes	50%	+	+	-

(+ = característica presente; - = característica ausente).

A síndrome de Williams é considerada uma doença com expressividade clínica variável e as diferenças fenotípicas nos pacientes estudados (sobretudo em relação ao grau da DI) devem-se, provavelmente, a penetrância incompleta dos genes deletados, efeitos epigenéticos e ambientais.

Todos os pacientes com síndrome de Williams diagnosticados neste estudo apresentaram algum problema cardíaco. Alterações cardiovasculares, como a estenose supra-avalvar da aorta, são frequentemente relatadas em cerca de 50 a 80%

<sup>6</sup> De acordo com Morris, 2006; Sugayama et al., 2003; Dykens et al., 2005; Pober, 2010.

dos pacientes com síndrome de Williams (Sugayama et al., 2003; Pober, 2010; Morris, 2010). Problemas musculoesqueléticos podem estar presentes, observando-se lordose, escoliose e contraturas articulares (Donnai e Karmiloff-Smith, 2000; Pankau, 2001).

A hipercalcemia transitória ocorre normalmente nos primeiros anos de vida, causando sintomas como vômitos, irritabilidade e constipação. Tende a desaparecer após um ano de idade e pode ser controlada com dieta restrita em vitamina D (Donnai e Karmiloff-Smith, 2000). Cherniske et al. (2004) avaliaram vinte indivíduos com mais de 30 anos e detectaram um paciente que ainda manifestava hipercalcemia, demonstrando que não se trata de um sintoma presente apenas na infância, embora seja mais raro na idade adulta.

Uma característica importante da síndrome é a hiperacusia, onde 85 a 95% dos indivíduos apresentam resposta emocional (atração ou aversão) exagerada e imediata a determinados sons. Dykens et al. (2005) propõe uma hipótese onde o medo, a ansiedade e a hiperatividade, possam ser comportamentos relacionados à alta prevalência de hiperacusia e defende que trabalhar a musicalidade nesses pacientes pode ser terapêutico em diversos fatores como ansiedade.

A deficiência de crescimento é característica frequente da síndrome, geralmente o peso e estatura ao nascimento encontram-se abaixo da média e o crescimento pós-natal é lento (Antonell et al., 2006). Partsch et al. (1999) analisaram dados de crescimento em crianças com síndrome de Williams e observaram que os indivíduos mostraram um pico de crescimento puberal prematuro diretamente relacionado à aceleração da idade óssea. A média de estatura final do homem adulto foi  $165.2 \pm 10.9\text{cm}$  e das mulheres foi  $152.4 \pm 5,7\text{cm}$ .

A incidência de anormalidades no trato renal é aproximadamente 18% e a otite média acontece frequentemente durante infância e adolescência (Donnai e Karmiloff-Smith, 2000). A hipermetropia é o erro de refração mais comum. Os vasos

retinianos podem exibir tortuosidades, característica encontrada em 42% dos indivíduos que participaram do estudo de Sugayama (2001), mas não pesquisado no presente trabalho. A presença de hérnias, principalmente inguinais, é comum ao nascimento, tornando necessária a correção cirúrgica no primeiro ano de vida (Pankau et al., 2001; Donnai e Karmiloff-Smith, 2000).

Problemas de tireoide estão entre as complicações mais comuns em pacientes com síndrome de Williams. Selicorni et al. (2006), em estudo realizado com 71 pacientes italianos com síndrome de Williams, mostrou que 84% dos afetados tinham alterações de tireoide, sendo que 43% tinham hipoplasia da glândula, 8% tinham elevação das dosagens do TSH e 28% tinham ambos os sinais. Entretanto, mesmo que os problemas relacionados à tireoide sejam comuns em pacientes, até onde pesquisamos (Hasle et al., 1998; Cambiaso et al., 2007; Stagi et al., 2008), nunca foi descrito na literatura um paciente com síndrome de Williams e câncer de tireoide, sendo este um achado clínico inédito a ser estudado.

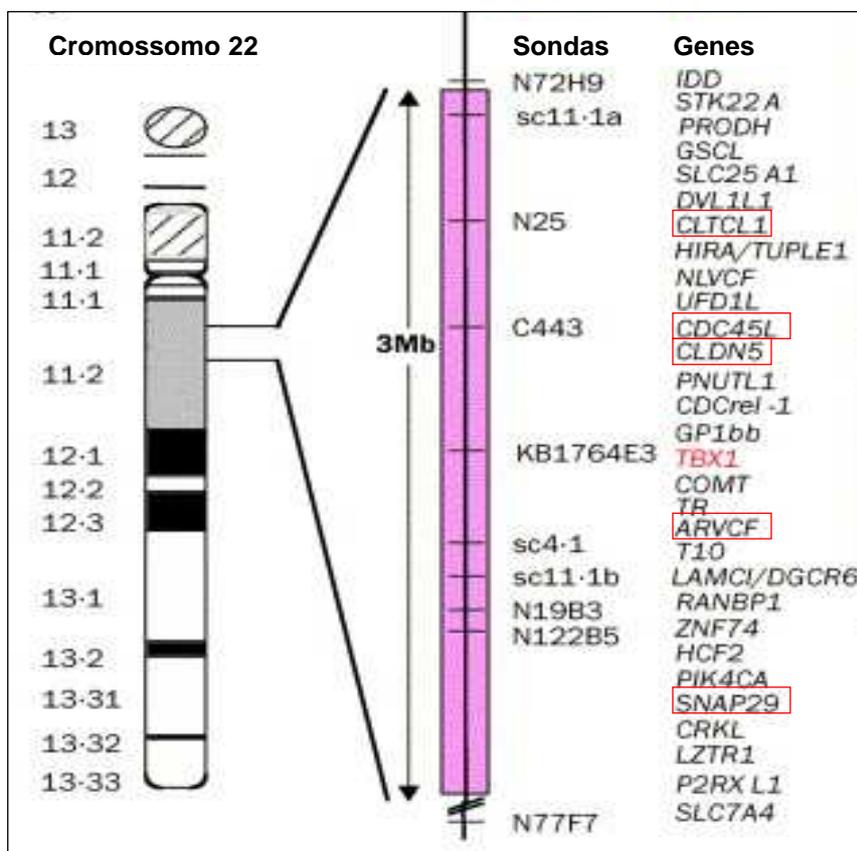
No seguimento clínico desses pacientes é importante o acompanhamento contínuo da função cardíaca, renal e tireoidiana.

Do ponto de vista do aconselhamento genético familiar, como, em cerca de 95% dos casos de síndrome de Williams, a microdeleção é um evento *de novo*, o risco de recorrência para a irmandade dos pacientes é baixo. Contudo, o risco de ocorrência para prole do paciente é de 50%. Especificamente nos três casos estudados nesse projeto, as famílias não pretendem ter mais filhos e foram orientadas em relação ao risco de recorrência para possíveis filhos dos pacientes, caso estes venham a se reproduzir.

### 5.5. Considerações sobre o diagnóstico da síndrome de deleção 22q11.2

A síndrome de deleção 22q11.2 é caracterizada citogeneticamente por uma microdeleção de 1,5Mb ou 3,0Mb, levando a hemizigose de até 30 genes. A **Figura 35** demonstra a região deletada em 22q11.2. A relação genótipo-fenótipo dos principais genes deletados é apresentada na **Tabela 4**. O paciente investigado no presente trabalho apresenta deleção dos 6 genes localizados em 22q11.2 e presentes no kit de MLPA utilizado, inclusive os genes mais distais (*SNAP29* e *CLTCL1*), comprovando tratar-se da deleção típica de 3,0Mb, encontrada em 85% dos casos de síndrome de deleção 22q11.2 (Emanuel 2008).

A **Tabela 5** apresenta as principais características clínicas descritas na literatura em pacientes com síndrome de deleção 22q11.2, comparando-as com o paciente diagnosticado no presente trabalho.



**Figura 35.** Região genômica envolvida na síndrome de deleção 22q11.2 (Yagi et al., 2003). Em vermelho estão circundados alguns dos genes mais importantes para o fenótipo.

**Tabela 4.** Genótipo/fenótipo relacionado à haploinsuficiência de alguns dos genes associados à síndrome de deleção 22q11.2, detectados pelo SALSA®MLPA®P064-B2-MR1.

Gene	Proteína	Função/Fenótipo <sup>7</sup>
<i>CLTCL1</i> – Clatherin heavy polypeptide-like 1 (OMIM *601273)	Codifica diversas variantes da proteína <i>CLTCL1</i>	É um componente das vesículas originadas da membrana plasmática ou do complexo de Golgi.
<i>CDC45L</i> – Cell division cycle 45, <i>S. Cerevisiae</i> homolog-like (OMIM *603465)	CDC 45	Essencial para iniciar a replicação do DNA.
<i>CLDN5</i> – Claudin 5 (OMIM *602101)	Claudin-5	Responsável pela formação de barreira física que impede a transição de água e solutos no meio extracelular das células epiteliais ou endoteliais.
<i>ARVCF</i> - Armadillo Repeat gene deleted in VCFS OMIM *602269	Proteína de repetição Armadillo	Importante na aderência entre as células, facilitando a comunicação entre o ambiente interno e externo da célula.
<i>SNAP29</i> – Synaptosomal associated protein 29-KD (OMIM *604202)	Proteína 29 associada ao sinaptossoma	Interage com a Sintaxina e participa da fusão de vesículas sinápticas na membrana, contribuindo para transmissão de impulsos nervosos.

<sup>7</sup> NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Tabela 5.** Características da síndrome de deleção 22q11.2.

Características	Frequência na literatura <sup>8</sup>	Paciente 2247
DI	81%	Severa
Alterações cardiovasculares	44 a 87%	+
Anomalias palatais	42%	+
Hipocalcemia	64%	-
Escoliose	47%	-
Dismorfias faciais	81%	+
Anomalias de fala	75%	+
Anomalias de dedos	6 a 63%	+

(+ = característica presente; - = característica ausente).

Entre os indivíduos com a síndrome de deleção 22q11.2, a taxa de malformações cardíacas varia de 44 a 87%, porém essa taxa diminui consideravelmente quando se trata de indivíduos adultos, o que pode ter relação com a alta mortalidade nos primeiros meses de vida (Shprintzen et al., 2005; Momma, 2007; Oh et al., 2007). Atualmente, tratamentos cardíacos e imunológicos diminuíram a taxa de mortalidade infantil em pacientes afetados para 4% (Bassett et al., 2011). Oh et al. (2007), em estudo realizado com 115 pacientes, encontraram 16 pacientes (13,9%) com microdeleção em 22q11.2, dos quais 81% apresentaram características faciais, 44% apresentaram anomalias cardíacas e 81% apresentaram algum grau de DI. O quadro clínico também pode incluir imunodeficiência celular, hipo ou aplasia das glândulas timo e paratireoide, hipocalcemia, dismorfias faciais típicas, hipotonia global,

<sup>8</sup> De acordo com Goldberg et al., 1993; Bassett et al., 2005; Momma, 2007; Oh et al., 2007; Shprintzen, 2008; McDonald-McGinn et al., 2011.

fenda palatina, insuficiência velofaríngea e retardo de crescimento, entre outras - já foram descritas mais de 80 características clínicas diferentes na síndrome de deleção 22q11.2, algumas quase imperceptíveis como a voz anasalada (Kitsiou-Tzeli et al., 2004), sendo esta uma doença com expressividade clínica muito variável.

No paciente diagnosticado no presente estudo não havia sido previamente aventada a hipótese clínica de síndrome de deleção 22q11.2, embora, após o diagnóstico molecular, o quadro clínico revisado seja compatível com esse diagnóstico. Chama atenção o fato de que embora anomalias de dígitos sejam um achado clínico frequente em até 63% dos pacientes (Goldberg et al., 1993), as alterações mais descritas na literatura são afinamento de dígitos e polidactilia pós-axial (McDonald-McGinn et al., 2011), enquanto o paciente investigado no presente estudo tem defeitos de eixo radial importantes.

No seguimento clínico desses pacientes é importante o acompanhamento contínuo da função cardíaca, tireoidiana e imunológica. Além disso, como existem relatos de paciente com deleção 22q11.2 e distúrbios psiquiátricos (esquizofrenia e psicoses), convém observar o comportamento dos afetados.

Do ponto de vista do aconselhamento genético, se os pais de uma criança afetada planejam ter mais filhos, é importante a realização de um teste molecular para detectar se a alteração foi herdada, pois nessa síndrome de 6% a 28% dos casos são herdados por padrão de herança autossômica dominante de um progenitor afetado e não diagnosticado previamente, normalmente com um quadro clínico muito brande (Carelle-Calmels et al., 2009). Se o exame molecular dos pais for negativo o risco de recorrência normalmente é baixo, porém existe a possibilidade (pequena e indeterminada) de um dos pais possuir mosaïcismo germinativo. No caso específico da família do paciente afetado que foi detectado nesse estudo, os pais não terão mais filhos e não houve necessidade de realizar o teste genético neles ou aconselhá-los a fazê-lo. O risco de ocorrência para eventual prole do paciente é de 50%.

## 6. Conclusões

Nesse estudo, foram padronizados testes genéticos usando a técnica de MLPA, para diagnóstico de síndromes de microdeleção em pacientes com DI. Em uma amostra de 57 pacientes com DI sem diagnóstico molecular, foram identificados 3 pacientes com síndrome de Williams e 1 paciente com síndrome de deleção 22q11.2. O quadro clínico dos pacientes diagnosticados foi compatível com os resultados dos testes moleculares e nesses quatro casos, a realização do teste genético molecular além de permitir a confirmação diagnóstica, contribuiu para o aconselhamento genético familiar.

A técnica de MLPA se mostrou útil para o rastreio de síndromes de microdeleção em pacientes com DI sem etiologia definida ou com hipótese diagnóstica de síndrome de microdeleção ainda não confirmada por teste genético molecular. Em função de seu baixo custo, se comparado a outras técnicas de biologia molecular, essa técnica pode ser usada como uma estratégia na assistência à saúde, colaborando para construção de uma linha de cuidado integral para pacientes com doenças genéticas e deficiência intelectual no SUS, em consonância com as Políticas Nacionais de Atenção à Saúde da Pessoa com Deficiência e de Atenção Integral em Genética Clínica.

## 7. Referências bibliográficas

1. Allanson JE, Greenberg F, Smith AC. The face of Smith-Magenis syndrome: a subjective and objective study. *J Med Genet*, 1999; 36(5): 394-397.
2. Anderlid BM, Bui TH. Clinical perinatal genetics. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2011; 16(2): 69.
3. Anderson G, Schroer RJ, Stevenson RE. Mental retardation in South Carolina II: Causation. *Proc Greenwood Genetic Ctr*, 1996; 15: 32-44.
4. Andrieux J, Villenet C, Quief S, Lignon S, Geffroy S, Roumier C, de Leersnyder H, de Blois MC, Manouvrier S, Delobel B, Benzacken B, Bitoun P, Attie-Bitach T, Thomas S, Lyonnet S, Vekemans M, Kerckaert JP. Genotype phenotype correlation of 30 patients with Smith-Magenis syndrome (SMS) using comparative genome hybridisation array: cleft palate in SMS is associated with larger deletions. *J Med Genet*, 2007; 44(8): 537-540.
5. Antonell A, Del Campo M, Flores R, Campuzano V, Perez-Jurado LA. Síndrome de Williams: aspectos clínicos y bases moleculares. *Rev Neurol*, 2006; 42(1): S69-75.
6. Armour JAL, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res*, 2000; 28(2): 605-609.
7. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn*, 2005; 5(2): 209-219.
8. Basel-Vanagaite L. Clinical approaches to genetic mental retardation. *Isr Med Assoc J*, 2008; 10: 821-826.
9. Bassett AS, Chow EWC, Husted J, Weksberg R, Caluseriu O, Webb GD, Gatzoulis MA. Clinical features of 78 adults with 22q11 deletion syndrome. *Am J Med Genet*, 2005; 138A: 307-313.

10. Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, Marino B, Oskarsdottir S, Philip N, Sullivan K, Swillen A, Vorstman J. International 22q11.2 deletion syndrome consortium. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr*, 2011; 159(2): 332-339.
11. Battaglia A, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2003; 117C(1): 3-14.
12. Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bhi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL, Zuberi SM, Carey JC. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics*, 2008; 121: 404-410.
13. Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel AA. High level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet*, 1998; 7(5): 887-894.
14. Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Jurado LAP. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Med Genet*, 2003; 73(1): 131-151.
15. Bernardes LCG, Maior IMML, Spezia CH, Araújo TCCF. Pessoas com deficiência e políticas de saúde no Brasil: reflexões bioéticas. *Ciênc Saúde Coletiva*, 2009; 14(1): 31-38.
16. Bitto E, Bingman CA, Wesenberg GE, McCoy JG, Phillips Jr GN. Structure of aspartoacylase, the brain enzyme impaired in Canavan disease. *Proc Ntl Acad Sci USA*, 2007; 104(2): 456-461.
17. Bonaventure J, El Ghouzzi V. Molecular and cellular bases of syndromic craniosynostoses. *Expert Rev Mol Med*, 2003; 5(4): 1-17.
18. Borovik CL, Tajara EH, Rocha JC, Farah LMS, Naccache NF, Netto RCM, Joffe R. Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana. Sociedade Brasileira de Genética, 2004, 15p.

19. Botta A, Novelli G, Mari A, Novelli A, Sabani M, Korenberg J, Osborne LR, Digilio MC, Giannotti A, Dallapiccola B. Detection of an atypical 7q11.23 deletion in Williams syndrome patients which does not include the STX1A and FZD3 genes. *J Med Genet.* 1999; 36(6): 478-80.
20. Brasil. Agência Nacional de Saúde Suplementar. Resolução normativa n.º167, de 09 de janeiro de 2008. Diretrizes de Utilização para Cobertura de Procedimentos na Saúde Suplementar. Diário Oficial da União 10 de janeiro de 2008
21. Brasil. Departamento de Informação e Informática do SUS. Sistema de Informações de Saúde. Estatísticas Vitais – Mortalidade e Nascidos Vivos. 1979-2006. Disponível em <http://www.datasus.gov.br/>. Acessado em 16 de agosto de 2012.
22. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico 2011.
23. Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico 2000. Características Gerais da População. Rio de Janeiro: IBGE, 2003. 178p.
24. Brasil. Lei n.º8.213/91, de 24 de julho de 1991. Dispõe sobre os Planos de Benefícios da Previdência Social e dá outras providências. Diário Oficial da União 25 de julho de 1991 – republicado no Diário Oficial da União de 14 de agosto de 1998.
25. Brasil. Ministério da Ação Social. Coordenadoria Nacional para a Pessoa Portadora de Deficiência; Conselho Consultivo. Subsídios para planos de ação dos governos federal e estadual na área de atenção ao portador de deficiência. Brasília: CORDE, 1994.
26. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS – Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS. Disponível em <http://sigtap.datasus.gov.br>. Acessado em 11 de agosto de 2012.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.º1.060/02. Política Nacional de Saúde da Pessoa Portadora de Deficiência. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 05 de junho de 2002.

28. Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.º2.380. Institui grupo de Trabalho de Genética Clínica, e dá outras providências. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 de outubro de 2004.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria n.º81/09. Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 21 de janeiro de 2009a.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria N° 2.690, de 05 de novembro de 2009. Institui, no âmbito do SUS, a Política Nacional de Gestão de Tecnologias em Saúde. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 06 de novembro de 2009b.
31. Brunoni D. Aconselhamento Genético. Ciênc saúde coletiva. 2002; 7(1): 101-107.
32. Buggenhout GV, Fryns JP. Angelman syndrome (AS, MIM 105830). Eur J Hum Genet, 2009; 17: 1367-1373.
33. Buiting K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2010; 154C(3): 365-376.
34. Burke W, Khoury MJ, Stewart A, Zimmern RL, Bellagio Group. The path from genome-based research to population health: development of an international public health genomics network. Genet Med. 2006; 8(7): 451-458.
35. Cai J, Goodman BK, Patel AS, Mulliken JB, Van Maldergem L, Hoganson GE, Paznekas WA, Ben-Neriah Z, Sheffer R, Cunningham ML, Daentl DL, Jabs EW. Increased risk for developmental delay in Sethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. Hum Genet, 2003; 114: 68-76.
36. Cali F, Ragalmuto A, Chiavetta V, Calabrese G, Fichera M, Vinci M, Ruggeri G, Schinocca P, Sturnio M, Romano S, Romano V, Elia M. Novel deletion of the E3A ubiquitin protein ligase gene detected by multiplex ligation-dependent probe amplification in a patient with Angelman syndrome. Exp Mol Med, 2010; 42(12): 842-848.

37. Callier P, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Marle N, Mosca AL, D'Athis P, Guy J, Masurel-Paulet A, Joly L, Guiraud S, Teyssier JR, Huet F, Mugneret F. Array-CGH in a series of 30 patients with mental retardation, dysmorphic features, and congenital malformations detected an interstitial 1p22.2-p31.1 deletion in a patient with features overlapping the Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A*, 2008; 146A(16): 2109-2115.
38. Cambiaso P, Orazi C, Digilio MC, Loches S, Capolino R, Tozzi A, Faedda A, Cappa M. thyroid morphology and subclinical hypothyroidism in children and adolescents with Williams syndrome *J Pediatr*. 2007; 150(1):62-65.
39. Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, Mutchinick OM, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns WB, Ledbetter DH. Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet*, 2003; 72(4): 918-930.
40. Carelle-Calmels N, Saugier-veber P, Girard-Lemaire F, Rudolf G, Doray B, Guerin E, Kuhn P, Arrive M, Gilch C, Schmitt E, Fehrenbach S, Schenebelen A, Frebourg T, Flori E. Genetic compensation in a human genomic disorder. *New Eng J Med*, 2009; 360: 1211-1216.
41. Carvalho ENS, Maciel DMMA. Nova concepção de deficiência mental segundo a American Association on Mental Retardation-AAMR: sistema 2002. *Temas em Psicologia da SBP*, 2003; 11(2): 147-156.
42. Cassidy SB, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Eur J of Hum Genetics*, 2009; 17(1): 3-13.
43. Castilla EE, Luquetti DV. Brazil: Public Health Genomics. *Public Health Genomics*, 2009; 12(1): 53-58.
44. Cherniske EM, Carpenter TO, Klaiman C, Young E, Bregman J, Insogna K, Schultz RT, Pober BR. Multisystem study of 20 older adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet*, 2004; 131(3): 255-264.

45. Cho EH, Park BYN, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification vs Fluorescent In Situ Hybridization. *Korean J Lab Med*, 2009; 29(1): 71-76.
46. Clauser L, Galiè M, Hassanipour A, Calabrese O. Saethre-Chotzen syndrome: review of the literature and report of a case. *J Craniofac Surg*, 2000; 11(5): 480-486.
47. Colnaghi R, Carpenter G, Volker M, O'Driscoll M. The consequences of structural genomic alterations in humans: Genomic disorders, genomic instability and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 2011; 22(8): 875-885.
48. Coudry RA. MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. *GBETH Newsletter*, 2007; 4(36): 1-6.
49. Council of Europe. Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine; 1997. Disponível em <http://conventions.coe.int/Treaty/EN/Treaties/Html/164.htm>. Acessado em 25 de maio de 2012.
50. Curry CJ, Sandhu A, Frutos L, Wells R. Diagnostic yield of genetic evaluations in developmental delay/mental retardation *Clin Res*, 1996; 44: 130A.
51. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff C, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Opitz J. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet*, 1997; 72(4): 468-477.
52. Dan B. Angelman syndrome: current understanding and research prospects. *Epilepsia*, 2009; 50(11): 2331-2339.
53. De Heer IM, De Klein A, Van Den Ouweland AM, Vermeij-Keers C, Wouters CH, Vaandrager JM, Hovius SE, Hoogeboom JM. Clinical and genetic analysis of patients with Saethre-Chotzen syndrome. *Plast Reconstr Surg*, 2005; 115(7): 1894-902; discussion 1903-1905.

54. Dobyns WB, Das S. LIS1-Associated Lissencephaly/Subcortical Band Heterotopia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. Gene Reviews. Seattle (WA); 1993-. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5189/>. Acessado em 01 de outubro de 2011.
55. Donnai D, Karmiloff-Smith A. Williams syndrome: from genotype through to the cognitive phenotype. *Am J Med Genet*, 2000; 97: 164-171.
56. Dykens EM, Rosner BA, Ly T, Sagun J. Music and anxiety in Williams syndrome: a harmonious or discordant relationship? *Am J Ment Retard*, 2005; 110(5): 346-358.
57. Elsea SH, Girirajan S. Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2008; 16(4): 412-421.
58. Emanuel BS, Shaikh TH. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet*, 2001; 2(10): 791-800.
59. Emanuel BS. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev*, 2008; 14(1): 11-8.
60. Faravelli F. NSD1 Mutations in Sotos Syndrome. *J Med Genet Semin Med Genet*, 2005; 137C(1): 24-31.
61. Fernandez L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, GarcíaÁlix A, Delicado A. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clinical Genetics*, 2005; 68(4): 373-378.
62. Finucane B, Dirrigl KH, Simon EW. Characterization of self-injurious behaviors in children and adults with Smith-Magenis syndrome. *M J Ment Retard*, 2001; 106(1): 52-58.
63. Fryns JP, Kleczkowska A, Dereymaeker A, Hoefnagees M, Heremans, Marlen J, Van Den Berghe H: A genetic diagnostic survey in an institutionalized population of 173 severely mentally retarded patients. *Clin Genet*, 1986; 30(4): 315-323.
64. Funato N, Ohyama K, Kuroda T, Nakamura M. Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol*, 2001; 21(21): 7416-7428.

65. Funato N, Twigg SRF, Higashiori N, Ohyama K, Wall SA, Wilkie AOM, Nakamura M. Functional analysis of natural mutations in two TWIST protein motifs. *Hum. Mutation*, 2005; 25(6): 550-556.
66. Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG. Monosomy 1p36 deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2007; 145C(4): 346-356.
67. Girirajan S, Vlangos CN, Szomju BB, Edelman E, Trecors CD, Dupuis L, Nezarati M, Bunyan DJ, Elsea SH. Genotype-Phenotype Correlation in Smith-Magenis Syndrome: evidence that multiple genes in 17p11.2 contribute to the clinical spectrum. *Genet. Med*, 2006; 8(7): 417-427.
68. Giugliani R. A Importância da Genética Médica e do Estudo de Defeitos Congênitos. In: Leite JCLL, Comunello LN, Giugliani, R, eds. *Tópicos em Defeitos Congênitos*. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002: 11.
69. Goldberg, R., Motzkin, B., Marion, R., Scambler, P. J., Shprintzen, R. J. Velocardio-facial syndrome: a review of 120 patients. *Am. J. Med. Genet.* 1993; 45: 313-319.
70. Gonçalves RW, Vieira FS, Delgado PGG. Política de saúde mental no Brasil: evolução do gasto federal entre 2001 e 2009. *Rev Saúde Pública*, 2012; 46(1): 51-58.
71. González Alvaredo S, Sanz Rojo R, García Santiago J, Gaztañaga Expósito R, Bengoa A, Pérez-Yarza EG. Genetic diagnostic criteria in cases of mental retardation and development of idiopathic origin. *An Pediatr (Barc)*, 2008; 69(5): 446-453.
72. Gothelf D, Aviram-Goldring A, Burg M, Steinberg T, Mahajnah M, Frisch A, Fennig S, Zalsman G, Weizman A. Cognition, psychosocial adjustment and coping in familial cases of velocardiofacial syndrome. *J Neural Transm*, 2007; 114(11): 1495-1501.
73. Gothelf D, Frisch A, Michaelovsky E, Weizman A, Shprintzen RJ. Velo-Cardio-Facial Syndrome. *J Ment Health Res Intellect Disabil*, 2009; 2(2): 149-167.
74. Gropman AL, Duncan WC, Smith AC. Neurologic and developmental features of the Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Pediatr Neurol*, 2006; 34(5): 337-350.

75. Gropman AL, Elsea S, Duncan WC Jr, Smith AC. New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Curr Opin Neurol*, 2007; 20(2): 125-134.
76. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, 2008; 1(1): 4.
77. Hasle H, Olsen JH, Hansen J, Friedrich U, Tommerup N. Occurrence of cancer in a cohort of 183 persons with constitutional chromosome 7 abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; 105(1): 39-42
78. Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG. Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet*, 2003; 72(5): 1200-1212.
79. Herman TE, Siegel MJ. Miller--Dieker syndrome, type 1 lissencephaly. *J Perinatol*, 2008; 28(4): 313-315.
80. Hofmann JJ, Zovein AC, Koh H, Radtke F, Weinmaster G, Iruela-Arispe ML. Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development: insights into Alagille syndrome. *Development*, 2010; 137(23): 4061-4072.
81. Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA. High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH). *J Med Genet*, 2002; 39(11): 790-795.
82. Horovitz DDG, Cardoso MH, Llerena JC Jr, de Mattos RA. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: características do atendimento e propostas para formulação de políticas públicas em genética clínica. *Cad Saúde Pública*, 2006; 22(12): 2599-2609.
83. Horovitz DDG, Llerena Jr, Mattos RA. Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: panorama atual. *Cad Saúde Pública*, 2005; 21: 1055-1064.
84. Hryshchenko NV, Bichkova AM, Lyvshyts AB, Kravchenko AS, Pampukha VN, Solovev AA, Kucherenko AM, Tatarskii PF, Afanaséva NA, Dubrovskaiia EV, Patskun IeY, Zymak-Zakutnais NO, Nykytchina TV, Lohysh Slu, Lyvshyts LA. Clinical genealogical and molecular genetic study of patients with mental retardation. *Tsitol Genet*, 2012; 46: 62-70.

85. Hunter AG. Outcome of the routine assessment of patients with mental retardation in a genetics clinic. *Am J Med Genet*, 2000; 90(1): 60-68.
86. Iglesias Escalera G, Carrasco Marina ML, Martín Del Valle F, Martínez Guardia N, Rodríguez L, Martínez-Fernández ML. Miller-Dieker syndrome. *An Pediatr (Barc)*, 2009; 70(3): 304-306.
87. Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, Pordeus AC, Latini FR, Bertola DR, Kim CA, Passos-Bueno MR. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet*, 2011; 54: e425-432.
88. Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res*, 2000; 10(5): 597-610.
89. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Bases e História: o impacto clínico das Doenças Genéticas. In: *Genética Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004, p. 1-6.
90. Kariyazono H, Ohno T, Ihara K, Igarashi H, Joh-o K, Ishikawa S, Hara T. Rapid detection of the 22q11.2 deletion with quantitative real-time PCR. *Molec Cell*, 2001; 15(2): 71-73.
91. Katz G, Lazcano-Ponce E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. *Salud Publica Mex*, 2008; 50 Suppl 2: s132-141.
92. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. A MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams e Beuren syndrome regions. *European J of Med Genet*, 2007; 50(1): 33-42.
93. Kitsiou-Tzeli S, Kolialexi A, Fryssira H, Galla-Voumvouraki A, Salavoura K, Kanariou M, Tsangaris GTH, Kanavakis E, Mavrou A. Detection of 22q11.2 deletion among 139 patients with Di George/Velocardiofacial syndrome features. *In Vivo*, 2004; 18: 603-608.

94. Kobrynski LJ, Sullivan KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*, 2007; 370(9596): 1443-1452.
95. Koolen DA, Nillesen WM, Vertsteeg MHA, Merkx GFM, Knoers NVAM, Kets M, Vermeer S, Van Rvenswij CMA, Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BBA, Siskerman EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*, 2004; 41: 892-899.
96. Kousoulidou L, Sismani C, Patsalis PC. Multiplex Amplifiable Probe Hybridization (MAPH) methodology as an alternative to comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Mol Biol*, 2010; 653: 47-71.
97. Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 2008; 29(23): 4627-4636.
98. Kress W, Schopp C, Lieb G, Petersen B, Büsse-Ratzka M, Kunz J, Reinhart E, Schäfer WD, Sold J, Hoppe F, Pahnke J, Trusen A, Sörensen N, Krauss J, Collmann H. Saethre-Chotzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2006; 14(1): 39-48.
99. Kumar S, Mattan NS, de Vellis J. Canavan disease: a white matter disorder. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2006; 12(2): 157-165.
100. Laczmanska I, Jakubiak A, Slezak R, Pesz K, Stembalska A, Laczmanski L, Sasiadek MM, Smigiel R. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) as a screening test in children with developmental defects and intellectual disability of unknown etiology. *Med Wieku Rozwoj*, 2011; 15(2): 132-139.
101. Lao Villadóniga JI. Diagnosis and genetic counseling in mental retardation. *Rev Neuro*, 2001; 33(Suppl 1): S1-S6.
102. Laxova R, Ridler MAC, Bowen-Braverty M. An etiologic survey of the severely retarded Hertfordshire children who were born between January 1, 1965 and December 31, 1967. *Am J Med Genet*, 1977; 1(1): 75-86.

103. Le Gloan L, Pichon O, Isidor B, Boceno M, Rival JM, David A, Le Caignec C. A 8.26 deletion in 6q16 and a 4.95 Mb deletion in 20p12 including *Jag1* and *BMP2* in a patient with Alagille syndrome and Wolff Parkinson-White syndrome. *Eur J Med Genet*, 2008; 51(6): 651-657.
104. Li MR, Wan XZ, Yang YL, Zhang YH, Xiong H, Bao XH, Zhong N, Wu XR, Pan H. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subtelomeric chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009; 89(40): 2839-2842.
105. Liang JS, Shimojima K, Yamamoto T. Application of array-based comparative genome hybridization in children with developmental delay or mental retardation. *Pediatr Neonatol*, 2008; 49(6): 213-217.
106. Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG. Nonhomologous DN End Joining and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem*, 2010; 50: 279-296
107. Lockwood WW, Chari R, Chi B, Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet*, 2006; 14(2): 139-148.
108. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangement and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 2005; 1(6): e49.
109. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends in Genet*, 1998; 14(10): 417-422.
110. Majnemer A, Shevell MI. Diagnostic yield of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. *J Pediatr*, 1995; 127(2): 193-199.
111. Mandal K, Boggula VR, Borkar M, Agarwal S, Phadke SR. Use of Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) in screening of subtelomeric regions in children with idiopathic mental retardation. *Indian J Pediatr*, 2009; 76(10): 1027-1031.
112. Mao R, Pevsner J. The use of genomic microarrays to study chromosomal abnormalities in mental retardation. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 2005; 11(4): 279-285.

113. Marques-de-Faria AP, Ferraz VE, Acosta AX, Brunoni D. Clinical genetics in developing countries: the case of Brazil. *Community Genet.* 2004; 7(2-3): 95-105.
114. Matalon R, Michals-Matalon K. Canavan Disease. 2011. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington. 1993.
115. Matalon R, Michals-Matalon K. Spongy degeneration of the brain, Canavan disease: biochemical and molecular findings. *Pediatr Pathol Mol Med*, 2000; 18: 471-481.
116. Matarese CA, Renaud DL. Classical (type I) lissencephaly and Miller-Dieker syndrome. *Pediatr Neurol*, 2009; 40(4): 324-325.
117. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine (Baltimore)*. 2011; 90(1): 1-18.
118. McElhinney DB; Krantz, ID.; Bason, L; Piccoli, DA.; Emerick, KM.; Spinner, NB.; Goldmuntz, E. Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome. *Circulation*, 2002; 106(20): 2567-2574.
119. McQueen PC, Spence MW, Winsor EJT, Garner JB, Pereira, LH. Causal origins of major mental handicap in the Canadian mountain provinces. *Dev Med Child Neurol*, 1986; 28(6): 697-707.
120. Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med*. 2012; 366(8): 733-743.
121. Melo DG, Acosta AX, Salles MA, Pina-Neto JM, Castro JD, Santos AC. Sotos syndrome (cerebral gigantism): analysis of 8 cases. *Arq Neuropsiquiatr*, 2002; 60 (2-A): 234-238.
122. Mersmann N, Tkachev D, Jelinek R, Roth PT, Mobius W, Ruhwedel T, Ruhle S, Webwe-Fhr W, Sartorius A, Klugmann M. Aspartoacylase-LacZ Knockin Mice: Na Engineered Model of Canavan Disease. *PloS One*, 2011; 6(5): e20336.
123. Meyer-Lindenberg A, Mervis CB, Berman KF. Neural mechanisms in Williams syndrome: a unique window to genetic influences on cognition and behavior. *Nat Rev Neurosci*, 2006; 7(5): 380-393.

124. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hmosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krntz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martis CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*, 2010; 86(5): 749-64.
125. Momma K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion. *Int J Cardiol*, 2007; 114:147-149.
126. Monfort S, Roselló M, Orellana C, Oltra S, Blesa D, Kok K, Ferrer I, Cigudosa JC, Martinez F. Detection of known and novel genomic rearrangements by array based comparative genomic hybridization: deletion of ZNF533 and duplication of CHARGE syndrome genes. *J Med Genet*, 2008; 45: 432-437.
127. Moog U. The outcome of diagnostic studies on the etiology of mental retardation: considerations on the classification of the causes. *Am J Med Genet*, 2005; 137: 228-231.
128. Morris CA. Introduction: Williams syndrome. *Am J Med Genet C Med Genet*, 2010; 154C(2): 203-208.
129. Morris CA. Williams syndrome. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP editors: *Gene Reviews*. Seattle (WA); 2006. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301427>. Acessado em: 10 de maio de 2012.
130. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The Genetics of Autism. *Pediatrics*, 2004; 113: e472-e486.
131. Nagai T, Matsumoto N, Kurotaki N, Harada N, Niikawa N, Ogata T, Imaizumi K, Kurosawa K, Kondoh T, Ohashi H, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Yokoyama T, Uetake K, Sakazume S, Fukushima Y, Naritomi K. Sotos syndrome and haploinsufficiency of *NSD1*: clinical features of intragenic mutations and microscopic deletions. *J Med Genet*, 2003; 40: 285-289.
132. Novoa MC, Bumham TF. Desafios para a universalização da genética clínica: o caso brasileiro. *Ver Panm Salud Publica*, 2011; 29(1): 61-68.

133. Oh AK, Workman LA, Wong GB. Clinical correlation of chromosome 22q11.2 fluorescent in situ hybridization analysis and velocardiofacial syndrome. *Cleft Palate Craniofac J*, 2007; 44(1): 62-66.
134. OMS. Organização Mundial da Saúde. Retardamento mental: enfrentando o desafio. Washington, D.C., Publicacion NPNSP/86/58, 1986.
135. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet*, 2004; 66(6): 488-495.
136. Opitz JM, Kaveggia EG, Laxova R, Pallister PD. The diagnosis and prevention of severe mental retardation. *Proceedings, International Conference on Preventable Aspects of Genetic Morbidity*, 1982; Cairo, p. 117-138.
137. Ou Z, Stankiewicz P, Xia Z, Breman AM, Dawson B, Wiszniewska J, Szafranski P, Cooper ML, Rao M, Shao L, South ST, Coleman K, Fernhoff PM, Deray MJ, Rosengren S, Roeder ER, Enciso VB, Chinault AC, Patel A, Kang SH, Shaw CA, Lupski JR, Cheung SW. Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between non homologous chromosomes. *Genome Res*, 2011; 21(1): 33-46.
138. Paim JS. O que é o SUS. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2009, 148p.
139. Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, Bermejo A Martinez, Fernández L, López Pajares I. MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet*, 2006; 69(3): 228-233.
140. Pankau R, Siebert R, Kautza M, Schneppeheim R, Gosch A, Wessel A, Partsch CJ. Familial Williams-Beuren syndrome showing varying clinical expression. *Am J Med Genet*, 2001; 98: 324-329.
141. Partsch CJ, Dreyer G, Gosch A, Inverno M, Schneppeheim, Wessel A, Pankau R. Longitudinal evaluation of growth, puberty and bone maturation in children with Williams syndrome. *J Pediatrics*, 1999; 134(1): 82-89.
142. Patsalis PC, Kousoulidou L, Männik K, Sismani C, Zilina O, Parkel S. Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization. *Eur J Hum Genet*, 2007; 15(2): 162-172.

143. Patsalis PC, Kousoulidou L, Sismani C, Männik K. MAPH: from gels to microarrays. *Eur J Med Genet*, 2005; 48(3): 241-249.
144. Pereira AC, Corrêa RF, Mota GF, Kim CA, Mesquita SF, Krieger JE. High specificity PCR screening for 22q11.2 microdeletion in three different ethnic groups. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(10): 1359-1365
145. Pilz D. Miller-Dieker Syndrome. Orphanet 2003. Disponível em <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-MDS.pdf>. Acessado em 17 de outubro de 2011.
146. Pina-Neto J.M. de. Aconselhamento genético. *J Pediatr (Rio J.)*, 2008; 84(Suppl 4): S20-S26.
147. Pober BR. Williams-Beuren syndrome. *N Engl J Med*, 2010; 362(3): 239-252.
148. Ramsden SC, Clayton-Smith J, Birch R, Buiting K. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet*, 2010; 11: 70.
149. Raskin S, Perez ABA, Marques-de-Faria AP. Genética Médica: Teste Laboratorial para Diagnóstico de Doenças Sintomáticas. In: Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2004, 11p. Disponível em [http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto\\_diretrizes/054.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/054.pdf). Acessado em 21 de janeiro de 2011.
150. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschenhoff F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*, 2006; 140(19): 2063-2074.
151. Rio M, Cre L, Lyonnet S, Iech L, Amiel J, Faivre L, Lyonnet S, Le Merrer M, Odent S, Lacombe D, Edery P, Brauner R, Raoul O, Gosset P, Prieur M, Vekemans M, Munnich A, Colleux L, Cormier-Daire. Spectrum of *NSD1* mutations is Sotos and Weaver syndromes. *J Med Genet*, 2003; 40: 436-440.
152. Rooms L, Reyniers E, Kooy RF. Subtelomeric rearrangements in the mentally retarded: a comparison of detection methods. *Hum Mutat*, 2005; 25(6): 513-524.

153. Rooms L, Vandeweyer G, Reyniers E, Van Mol K, de Canck I, Van der Aa N, Rossau R, Kooy RF. Array-based MLPA to detect recurrent copy number variations in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet A*, 2011; 155A(2): 343-348.
154. Rosa RFM, Zen PRG, Roman T, Graziadio C, Paskulin GA. Síndrome de deleção 22q11.2: compreendendo o *CATCH22*. *Rev Paul Pediatr*, 2009; 27(2): 211-220.
155. Ruggieri VL, Arberas CL. Genetic syndromes recognizable in the neonatal period. *Medicina (B Aires)*, 2009; 69(1 Pt 1): 15-35.
156. Sandrin-Garcia P, Abramides DV, Martelli LR, Ramos ES, Richieri-Costa A, Passos GA. Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. *Mol Cell Biochem*. 2007; 303(1-2): 9-17.
157. Schaefer GB, Bodensteiner JB. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. *Pediatr Clin N Am*, 1992; 39(4): 929-943.
158. Schalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley VJ, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM, Gomez SC, Lachapelle Y, Luckasson R, Reeve A, Shogren KA, Snell ME, Spreat S, Tassé MJ, Thompson JR, Verdugo-Alonso MA, Wehmeyer ML, Yeager MH. *Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports*. 11 ed. American Association on Intellectual and Developmental Disabilities, 2010, 259p.
159. Schluth-Bolard C, Till M, Edery P, Sanlaville D. New chromosomal syndromes. *Pathol Biol (Paris)*, 2008; 56(6): 380-387.
160. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30(12): e57.
161. Schubert C. The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell. Mol. Life Sci*, 2008; 66(7): 1178-1197.
162. Schwinger E, Devriendt K, Rauch A, Philip N. Clinical utility gene card for: DiGeorge syndrome, velocardiofacial syndrome, Shprintzen syndrome, chromosome 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2, TBX1). *Eur J Hum Genet*, 2010; 18(9).

163. Selicorni A, Fratoni A, Pavesi MA, Bottigelli M, Arnaboldi E, Milani D. Clinical report thyroid anomalies in Williams syndrome: investigation of 95 patients. *Am J Med Genet A*. 2006 ;140(10): 1098-1101.
164. Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. *Hum Mut*, 2004; 23(5): 413-419.
165. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2007; 145C(4): 335-345.
166. Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet*, 2000; 34: 297-329.
167. Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Gen*, 2004; 13: 57-64.
168. Shevell MI, Majnemer A, Rosenbaum P, Abrahamowicz M. Etiologic yield of subspecialists' evaluation of young children with global developmental delay. *J Pediatr*, 2000; 136(5): 593-598.
169. Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. *Prog Pediat Cardiol*, 2005; 20(2): 187-193.
170. Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study. *Dev Disabil Res Rev*, 2008; 14: 3-10.
171. Slavotinek AM. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet*, 2008; 124(1): 1-17.
172. Smith AC, Boyd K, Elsea SH, Finucane BM, Haas-Givler B, Gropman A, Johnson KP, Lupski JR, Magenis E, Potocki L and others. Smith-Magenis Syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA); 2001-. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1310/>. Acessado em 10 de outubro de 2011.
173. Smith C, Magenis RE, Elsea SH. Overview of Smith-Magenis syndrome. *J. Assoc Genet Technol*, 2005; 31(4): 163-167.

174. Sogaard M, Tumer Z, Hjalgrim H, Hahnemann J, Friis B, Ledaal P, Pedersen VF, Baekgaard P, Tommerup N, Cingoz S, Duno M, Brondum-Nielsen K. Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter. *BMC Med Genet*, 2005; 6: 21.
175. Sparks EE, Perrien DS, Huppert KA, Peterson TE, Huppert SS. Defects in hepatic Notch signaling result in disruption of the communicating intrahepatic bile duct network in mice. *Dis Model Mech*, 2011; 4(3): 359-367.
176. Spinner NB, Colliton RP, Crosnier C, Krantz ID, Hadchouel M, Meunier-Rotival M. Jagged1 mutations in Alagille syndrome. *Hum Mutat*, 2001; 17(1): 18-33.
177. Stagi S, Manoni C, Salti R, Cecchi C, Chiarelli F. Thyroid hypoplasia as a cause of congenital hypothyroidism in Williams syndrome. *Horm Res*. 2008; 70(5): 316-318.
178. Stankiewicz P, Beaudet AI. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*, 2007; 17(3): 182-192.
179. Stevenson RE, Massey PS, Schroer RJ, McDermott S, Richter B. Preventable fraction of mental retardation: analysis based on individuals with severe mental retardation. *Ment Retard*, 1996; 34(3): 182-188.
180. Strømme P. Aetiology in severe and mild mental retardation: a population-based study of Norwegian children. *Dev Med Child Neurol*, 2000; 42(2): 76-86.
181. Sugayama SMM, Moisés RL, Wangenfur J, Ikari NM, Abe, KT, Leone C, Silva CAA, Chauffaille MLLF, Kim CA. Síndrome de Williams-Beuren. Anomalias cardiovasculares em 20 pacientes diagnosticados pela Hibridização In Situ por Fluorescência. *Arq Bras Cardiol*, 2003; 81: 462-467.
182. Sugayama SMM. Estudo genético-clínico e citogenética molecular pela técnica da hibridização in situ por fluorescência (FISH) em pacientes com síndrome de Williams-Beuren. 153p. [Tese-Doutorado]: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2001.

183. Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Cole TR, Das S, Horn D, Hughes HE, Temple IK, Faravelli F, Waggoner D, Turkmen S, Cormier-Daire V, A Irrthum, Rahman N; Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *Am J Hum Genet*, 2005; 77(2): 193-204.
184. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int*, 2010; 52(4): 547-550.
185. Turleau C, Vekemans M. Trisomy 21: fifty years between medicine and science. *Med Sci (Paris)*, 2010; 26(3): 267-272.
186. Turnpenny P, Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 14<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2011.
187. Van Hagen JM, Eussen HJ, Van Schooten R, Van Der Geest JN, Lagers-Van Haselen GC, Wouters CH, De Zeeuw CI, Gille JJ. Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Test*, 2007; 11(3): 321-327.
188. Van Karnebeek CD, Jansweijer MC, Leenders AG, Offringa M, Hennekam RC. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *Eur J Hum Genet*, 2005b; 13(1): 6-25.
189. Van Karnebeek CD, Scheper FY, Abeling NG, Alders M, Barth PG, Hoovers JM, Koevoets C, Wanders RJ, Hennekam RC. Etiology of mental retardation in children referred to a tertiary care center: a prospective study. *Am J Ment Retard*, 2005a; 110(4): 253-267.
190. Van Schrojenstein Lantman-de Valk HM, Walsh PN. Managing health problems in people with intellectual disabilities. *BMJ*, 2008; 337: a2507.
191. Vieira TAP. Contribuições no estabelecimento de estratégias laboratoriais em genética para a saúde pública no Brasil utilizando a síndrome de deleção 22q11.2 como modelo. 135p. [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2012.

192. Vissers LELM, Veltman JA, Van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Dep Hum Mol Genet*, 2005; 14(2): R215-R223.
193. Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Human Mutation*, 2006; 27(8): 814-821.
194. Walter E, Mazaika P, Reiss A. Insights Into Brain Development from Neurogenetic Syndromes: Evidence from Fragile X Syndrome, Williams Syndrome, Turner Syndrome and Velocardiofacial Syndrome. *Neuroscience*, 2009; 164(1): 257-271.
195. Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EWC, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*, 2005; 6:180.
196. Wellesley D, Hockey A, Stanley F. The etiology of intellectual disability in Western Australia: A community-based study. *Dev Med Child Neurol*, 1991; 33(11): 963-973.
197. Whittington J, Holland A. Neurobehavioral phenotype in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2010; 154C(4): 438-447.
198. Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet*, 1993; 30: 852-856.
199. Winpenninckx B, Rooms L, Kooy RF. Mental retardation: a review of the genetic causes. *Brit J Dev Disabil*, 2003; 49(96): 29-44.
200. Woods RH, UI-Haq E, Wilkie AO, Jayamohan J, Richards PG, Johnson D, T Lester, Wall SA. Reoperation for intracranial hypertension in TWIST1-confirmed Saethre-Chotzen syndrome: a 15-year review. *Plast Reconstr Surg*, 2009; 123(6): 1801-1810.
201. Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J, Gao Z, Yang Y, Cai B, Wang L, Zhou Z, Tian L, Wang X, Zhong N, Qin J, Wu X, Jiang Y. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet*, 2010; 11: 72.

202. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*, 2003; 362: 1366-1373.
203. Yeargin-Allsopp M, Murphy CC, Cordero JF, Decoufle P, Hollowell JG. Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-yearold children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. *Dev Med Child Neurol*, 1997; 39: 142-149.
204. Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol*, 2010; 30(4): 886-896.
205. Zeng BJ, Pastores GM, Leone P, Raghavan SS, Kolodny EH. Mutation analysis of the aspartoacylase gene in non-Jewish patients with Canavan disease. *Adv Exp Med Biol*, 2006; 576: 165-173.
206. Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, Stanger BZ. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*, 2009; 136(10): 1727-1739.
207. Zurynski Y, Frith K, Leonard H, Elliott E. Rare childhood diseases: how should we respond? *Arch Dis Child*. 2008; 93: 1071-1074.

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo 1

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Responsáveis:** Biomédica Adriana Rosolia Costa Sabbag, Profa. Dra. Débora Gusmão Melo e Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior.

**Instituição:** Universidade Federal de São Carlos – Departamento de Medicina.

**Projeto de Pesquisa:** Pesquisa de síndromes de microdeleção em pacientes com deficiência mental por meio da técnica de MLPA.

Somos pesquisadores da UFSCar e estamos realizando um projeto com o objetivo de padronizar um exame para detectar pequenas alterações nos cromossomos que podem ser a origem de síndromes genéticas que causam deficiência mental.

Você está recebendo esta carta porque é responsável legal por uma pessoa com deficiência mental de causa não esclarecida que é acompanhada no Ambulatório de Genética Médica da UFSCar. Você está sendo convidado a participar, e permitir que seu filho (ou filha) que tem deficiência mental também participe desse projeto.

Para participar do projeto, você precisa concordar que seu filho (ou filha) faça um exame de sangue. Haverá desconforto para o paciente, pois será necessário puncionar uma veia do braço ou da mão do paciente e retirar cerca de 5ml de sangue periférico. Os riscos deste procedimento são: (1) o paciente se queixar de dor e ficar chateado por causa do procedimento, (2) haver sangramento local e formação de pequeno hematoma, (3) infecção secundária (pequeno risco que se corre toda vez que a pele é rompida), (4) necessidade de várias punções para localizar as veias.

Com este sangue será realizado apenas um exame de biologia molecular, partir do DNA do paciente, para detectar se ele tem ou não perda de pequenos pedaços dos cromossomos. Todos os resultados obtidos desta análise genética são considerados extremamente confidenciais e vinculados ao segredo profissional. Ao final da pesquisa, o material coletado (sangue) não utilizado será descartado.

É importante ressaltar que não existem garantias que, participando do projeto, a causa da deficiência mental do paciente será esclarecida, pois o exame pode ser normal.

Também é importante ressaltar que você receberá um laudo com o resultado do exame, independente do resultado, sendo o exame normal ou não, mas o resultado do exame pode demorar até 2 anos para ficar pronto. Ou seja, o laudo do exame pode só estar disponível no segundo semestre de 2012.

Os resultados deste projeto poderão ser divulgados em encontros científicos e revistas especializadas, porém sem que o nome do paciente ou da sua família apareça associado à pesquisa.

Nós nos comprometemos em tirar quaisquer dúvidas que possam vir a aparecer durante a execução do projeto.

Não há qualquer custo financeiro envolvido na sua participação neste projeto. Não há qualquer obrigatoriedade de sua participação e, se quando você estiver participando do projeto resolver desistir, não haverá qualquer consequência para o paciente ou sua família. O paciente pode continuar a ser seguido no Ambulatório de Genética Médica da UFSCar independente de você aceitar ou não participar deste projeto.

Considerando as colocações acima, eu, \_\_\_\_\_, aceito incluir o paciente \_\_\_\_\_ neste projeto e, sendo minha participação totalmente voluntária, estou livre para a qualquer momento desistir de colaborar, sem qualquer prejuízo para mim ou para o paciente.

Eu recebi uma cópia deste termo e tive a possibilidade de lê-lo.

Assinatura do responsável legal pelo paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo projeto: \_\_\_\_\_

São Carlos, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Endereço e telefone para contato com os pesquisadores  
Departamento de Medicina - UFSCar - tel. (16) 3351-8340

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar  
Pró-Reitoria de Pesquisa da UFSCar  
Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP –  
Brasil. Fone (16) 3351-8110  
Endereço eletrônico: cephumanos@power.ufscar.br

## 8.2. Anexo 2

### Parecer do Comitê de Ética com Pesquisa com Seres Humanos da UFSCar



#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUF - BR

[cephumanos@power.ufscar.br](mailto:cephumanos@power.ufscar.br)

<http://www.propq.ufscar.br>

### Parecer Nº. 253/2010

CAAE: 0044.0.135.000-10

**Título do projeto:** PESQUISA DE SÍNDROMES DE MICRODELEÇÃO EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA MENTAL POR MEIO DA TÉCNICA DE MLPA

**Pesquisadores (as):** ADRIANA ROSOLIA COSTA, DEBORA GUSMAO MELO, EUCLIDES MATHEUCCI JUNIOR

#### Parecer

As pendências apontadas no Parecer nº. 211/2010 foram satisfatoriamente resolvidas.

O projeto atende as exigências contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

#### Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente dentro de 1 (um) ano a partir desta data e ao término do estudo.

São Carlos, 14 de julho de 2010.

  
Prof. Dr. Daniel Vendruscolo  
Coordenador do CEP/UFSCar

### 8.3. Anexo 3

#### Sequências de nucleotídeos presentes em cada uma das sondas do kit SALSA® MLPA® P064-B2 MR1

Tamanho do amplicon	Gene	Posição cromossômica	Sonda 5'	Sonda 3'
130	TNFRSF4	01p36.33	GCACACCCTGCAGCCGGCCAGCAA	TAGCTCGGACGCAATCTGTGAGGACAGGGACCCCCCAGCC
135	SCNN1D	01p36.33	GATGGAAGGCCACACAGCCAGTGACGAAGCT	GTGATTCACACAGGCCTGGGTGACTCCAGCAT
142	NSD1	05q35.3	TGGAGGCTTTTGGAGATCCTTCTGA	GAGAGCCTGGGTGGCTGAAAAAGCAATCGTCATGTTTG
148	TRPV1	17p13.2	GATAGGCAGTCTGCTCAGCCCCGAGGAA	GTTTATCTGCGACAGTTTTTCAGGGTCTCTGAAGCCAGAGGACG
154	ARVCF	22q11.21	TGACGCCATGTTGCCCTACAGCTGGAGCGT	GCCCAGCAGCCTGGCATGGTCAGTGGTGGCATGGGCA
160	UBE3A	15q11.2	GAAGAAGACTCAGAAGCATCTTCCTCAAGG	ATAGGTGATAGCTCACAGGGAGACAACAATTTGCAAAAATTAG
166	TNFRSF13B	17p11.2	CTCAGCTGCCGCAAGGAGCAAGGCAAG	TTCTATGACCATCTCCTGAGGGACTGCATCAGCTGTGCCTCCA
172	MKRN3	15q11.2	GCGACATGTGTGGGCTGCAGACCT	TGCACCCCATGGATGCTGCCAGAGGGAAGAACATAT
178	GNB1	01p36.33	TGTGGCATTGAAGAGCACTAAGATCGGAA	GATGAGTGAGCTTGACCAGTTACGGCAGGAGGCCGAGCAAC
184	HIC1	17p13.3	CGCTGCCCTTCCAGAAGCTGG	AGGAGGCCGCACCGCCTTCCGACCCATTTCCG
191	CLTCL1	22q11.21	CGTTTCTGTGAACACTGTTGCCTTGGT	GACCGAGACCGCGGTCTACCACTGGAGCATGGAAGGTG
196	CLDN5	22q11.21	CTCGTGCCACTCTGCTGGTTCGCCAACATT	GTCGTCCGCGAGTTTTACGACCCGTCTGTGCCCG
202	TWISTNB	07p21.1	GCTGGCGTCTGCCTTGCCCTA	GAGTTGCCGACTTATGCCGCTGCTTGTGCGCTGGTGAACAGTCGCT
211	NSD1	05q35.3	GGCCCAAAAAGAGCTAAGACAGCTGCA	GGAAGACCGAAAGAATGACAAGAAGCCACCACCTTATAAA
220	NDN	15q11.2	GCTAGTCCTCAGAGACACTGCTGCGA	GGGTAGTGGGCAGTGGGATTAGCCTCCCGCAGAGC
229	CLIP2	07q11.23	GGGGATGACTTCCCTGGGGGACTTT	GTGGTGGGCGAGCGGTGTGGGTGAACGGCGTGA
238	PAFAH1B1	17p13.3	CAATGGATTCCCCGTCCGCCAGAAAAATAT	GCATTGAGTGGTCACAGGAGTCCAGTCACTCGAGTCATTTTCC
247	PANK4	01p36.32	GTTAACCAAGCTGGCCTACTATTCAACGGT	ACAGCACAAAAGTCGCCAAGGTGCGGTCTTTTCGAC

256	FZD9	07q11.23	CACAGAGAAGCTGGAGAAGCTCATGGTCAA	GATCGGGTCTTCTCCATCCTCTACACGGTGCCCGCC
265	ASPA	17p13.2	CCCTGCGCCATTGAGGTCTATAAAAT	TATAGAGAAAGTTGATTACCCCCGGGATGAAAATGGAGAAATTGCTG
274	LRRC48	17p11.2	CTGAGCTTGTTCAACAACCGGATCTCCAAG	ATCGACTCCCTGGACGCCCTCGTCAAGCTGCAGGTGT
283	PAFAH1B1	17p13.3	CACCCTATGTCGTCCTGTCGAGCGTA	GATCAAACAGTAAAAGTGTGGGAGTGCCGTTGATTGTGTCTCCT
292	STX1A	07q11.23	GAGATCATCAAGCTGGAGAACAGCATCCGT	GAGCTACACGACATGTTTCATGGACATGGCCATGCTCGTGGAGA
301	LLGL1	17p11.2	GTCCCTGCTTGATGACAGCAGTCTGCA	TCTCTGGGAGATTGTCCACCATAATGGCTGTGCCACCTGGAA
310	ELN	07q11.23	CGGCAACAATTAGGCTTTGGGGATAAAACG	AGGTGCGGAGAGCGGGCTGGGGCATTCTCC
319	TWIST1	07p21.1	CACAGGTCTCCAGAGCGACGAGCTGGACT	CCAAGATGGCAAGCTGCAGCTATGTGGCTCACGA
329	PRPSAP2	17p11.2	GTGTGACGCCACCTGAATTAGAAACCAAGA	TGAACATAACCAAAGGTGGTCTGGTGTGTTTTTCAGCAAATC
336	TP73	01p36.32	CAGTGGCGGCCGCCAGGAGAGACCCGGGTG	TCAGGAAAGATGGGCCGTCTGGGGGACAGCAGGG
346	JAG1	20p12.2	CAGACGGATCGCCTGCTCAAAGGTAGGACAT	GATGGCTGCCGCAGTTCACCTGTGTTCTGGAATCAGGG
355	MFAP4	17p11.2	CAGCTGCCACTTTGCCAACCTCAA	TGGCTTCTACCTAGGTGGCTCCACCTCTCTTATGCCAATGGC
364	HIC1	17p13.3	CAGCTTGGACCGCTCCAGATAAGAGTGTGCGGA	AAGCGCGCGGGGCTGAGACGCGACCAGGAC
373	SNAP29	22q11.21	TGCAGACAGAAATTGAGGAGCAAGATG	ACATTCTTGACCGGCTGACAACCAAAGTGGACAAGTTAGATGT
382	TNFRSF18	01p36.33	GGCTGCACCCAGTTCGGGTTTTCTCAC	TGTGTTCCCTGGGAACAAGACCCACAACGCTGTGTGCGTC
391	LIMK1	07q11.23	CGACCGAGTGTTTCATCTGCCTCACGTGTGGGACCTTT	ATCGGTGACGGGGACACCTACACGCTGGTGGAGCACT
400	UBE3A	15q11.2	GGAGTTCTGGGAAATCGTTCATTCATTTAC	AGATGAACAGAAAAGACTCTTCTTGACGTTTACAACGGGCACA
409	GABRB3	15q12	CACCCCGGTGCTGGTGGCTGTGGT	GTGCTGCGCCAGAGGTAGGGTCGCGGGTGGGCC
418	CLIP2	07q11.23	GGTGTGCTGCTGGAGGCCAATCG	TCACTCCCAGGGCCGGAGAGGGACCTGAGCCGT
427	METTL16	17p13.3	CGAGCTTCGCTATGCGGCTGCTTTAA	GATTCTAGGGTTGTACAGGCCACGCCAGACACGACGTCTG
436	SKI	01p36.33	GTCTCCGCGCCGAGAACGAGAAGAAG	ATGAAAGAGGCCAACGAGTCACGGCTGCGCCTGAAGCG
445	NSD1	05q35.3	GTGAAAAATTGGGTGAGCTGCTGTTATGTG	AGGCTCAGTGCTGTGGGGCTTCCACCTGGAGTGCCT
454	KLHL22	22q11.21	CGGACAGCGGAATCCTCTTCGATGTTG	TGCTGGTGGTGGAGGGCAGACACATCGAGGCCCA
465	CDC45	22q11.21	GGACGCCGTGGCTATGTTTCGTGTCC	GATTTCCGCAAAGAGTTCTACGAGGTGGTCCAGAGCC
472	JAG1	20p12.2	CTTTGAAAAGTGGTGTGTTTTCCAGTCGT	GCATGCTCCAATCGGCGGAGTATATTAGAGCCGGGACGCG

#### 8.4. Anexo 4

### Consentimento do responsável para publicação de dados clínicos do paciente



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Departamento de Medicina  
Via Washington Luís, km 235 – Caixa Postal 676  
13565-905 – São Carlos – SP - Brasil  
Fone: (16) 3351-8340 / Fax: (16) 3351-8382  
E-mail: [dmed@ufscar.br](mailto:dmed@ufscar.br)

---

### CONSENTIMENTO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_, mãe e responsável  
por \_\_\_\_\_,  
dou meu consentimento para que sejam publicadas, em material acadêmico-científico  
(revistas, dissertações e teses), fotos e dados clínicos de \_\_\_\_\_.

São Carlos, de \_\_\_\_\_ de 2012.

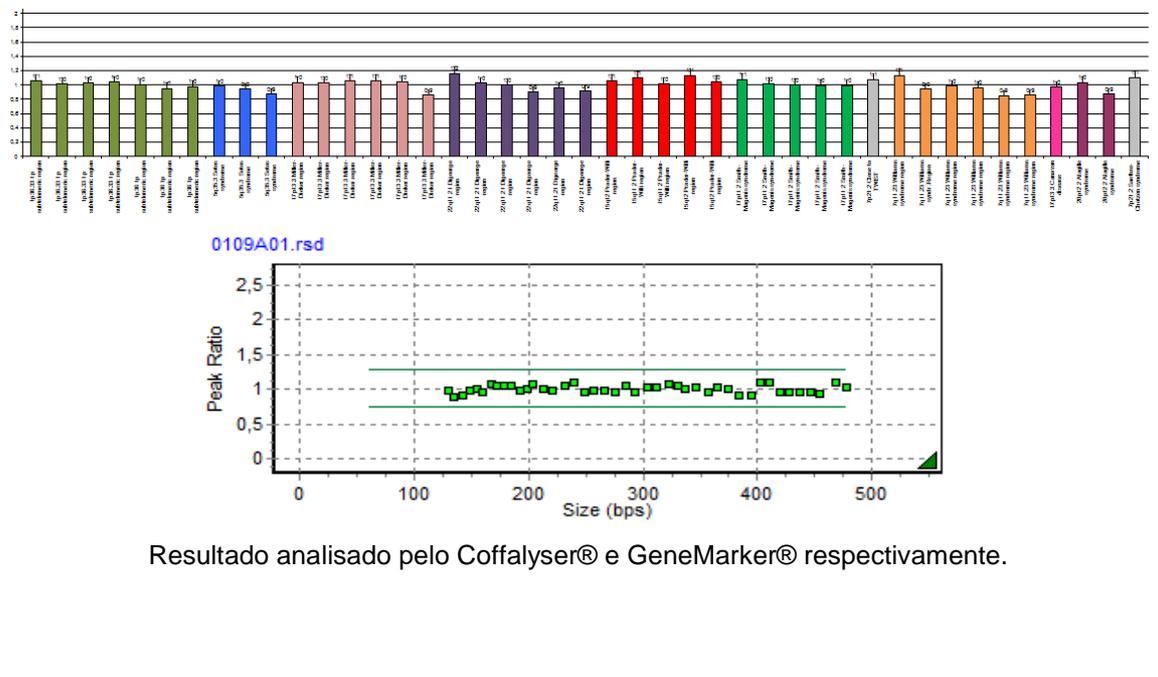
---

Assinatura

## 8.5. Anexo 5

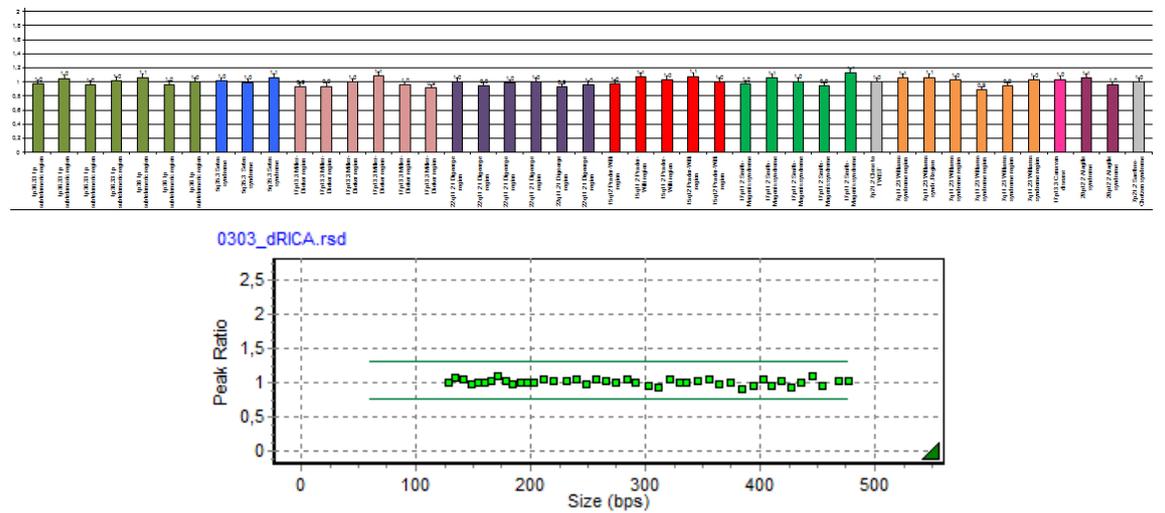
### Resumo clínico e diagrama dos resultados MLPA analisados através do software Coffalyser® e GeneMarker® dos 54 pacientes com resultados negativos.

**0109**, paciente do sexo masculino, 3 anos e 1 mês. Apresenta ADNPM, atraso de linguagem, distúrbio de comportamento com hiperatividade e dificuldade de concentração. Não possui dismorfias significativas.



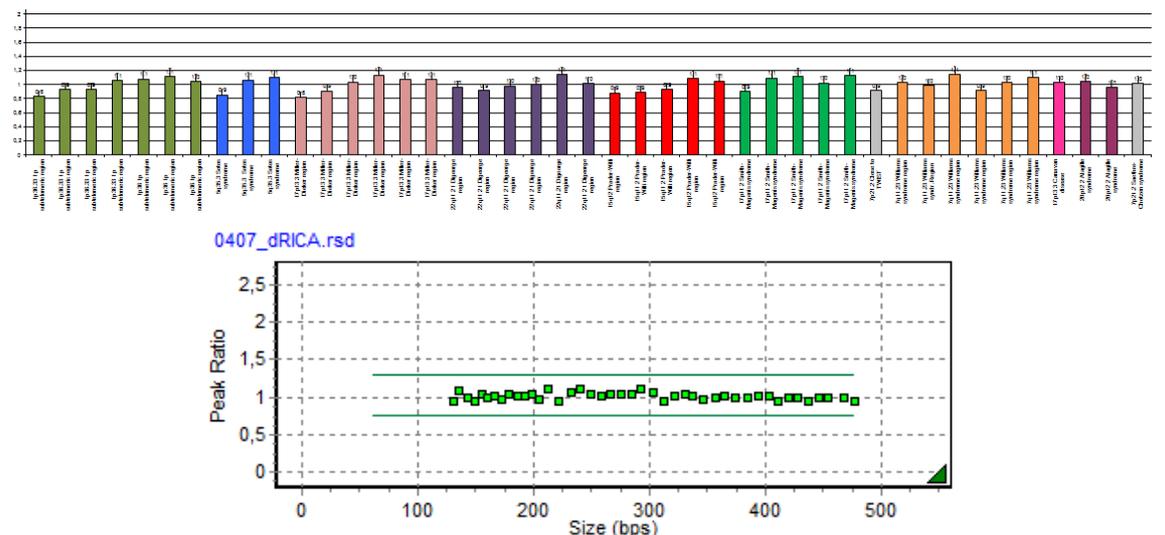
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**0303**, paciente do sexo masculino, 11 anos e 5 meses. Apresenta DI leve com déficit de aprendizagem. Tem irmão gêmeo com quadro semelhante. Apresenta dismorfias: hipertelorismo ocular, hipoplasia de face média e prognatismo mandibular.



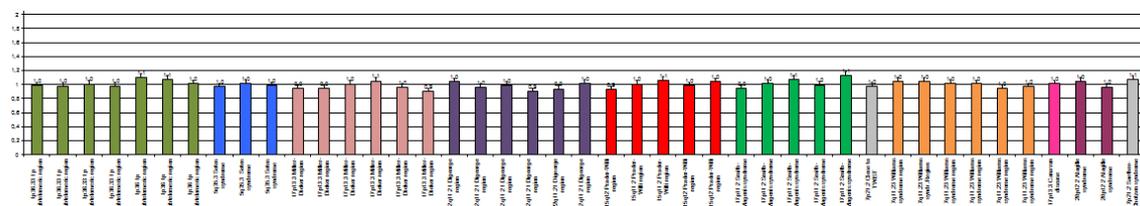
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**0407**, paciente do sexo masculino, 11 anos e 5 meses. Apresenta DI leve com déficit de aprendizagem. Tem irmão gêmeo com quadro semelhante. Apresenta dismorfias: hipertelorismo ocular, hipoplasia de face média e prognatismo mandibular.

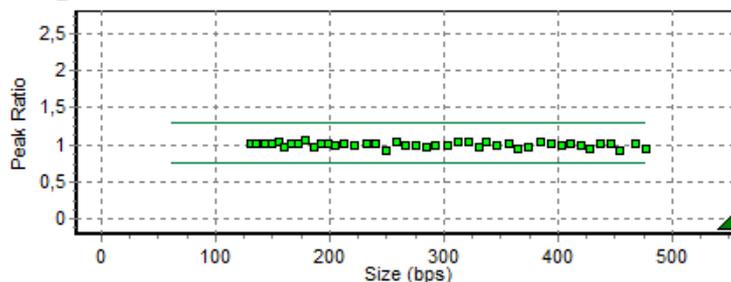


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**0605**, paciente do sexo feminino, 10 anos e 9 meses. Apresenta DI moderada, com transtorno global do desenvolvimento, e distúrbio de comportamento (hiperfagia e compulsão por alimentos). Apresenta obesidade, mas não tem dismorfias significativas.

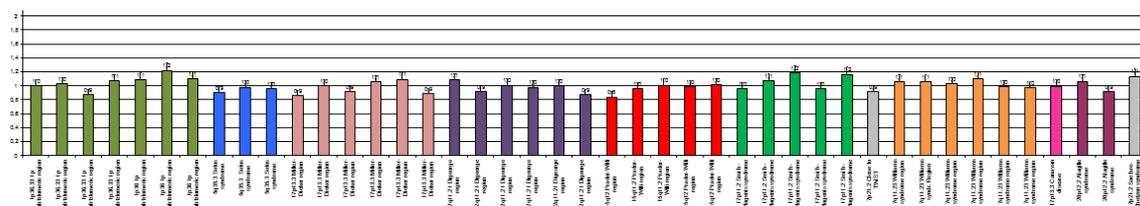


0605\_dRICA.rsd

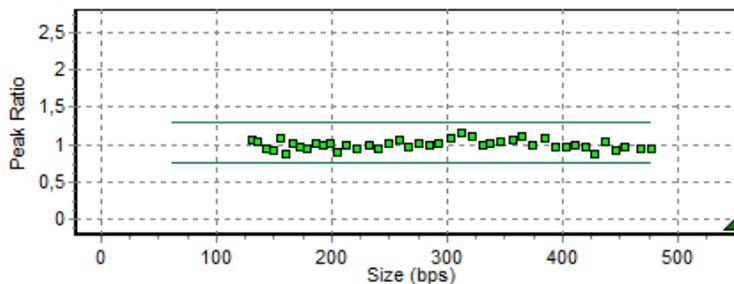


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**0719**, paciente do sexo masculino, 22 anos e 2 meses. Apresenta DI grave com atraso na fala. Apresenta obesidade, sobrancelhas espessas, raiz nasal alta, fenda palpebral oblíqua para cima, microtia aparente e mamilos invertidos.



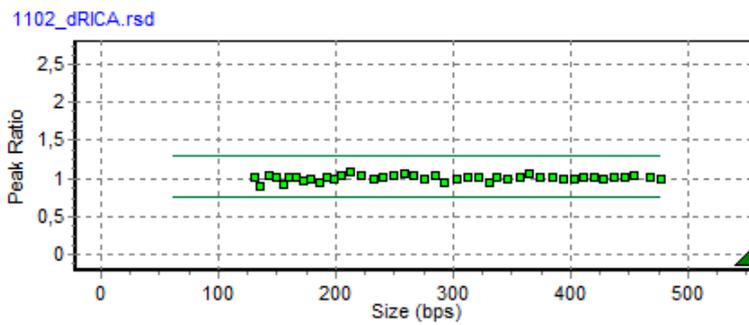
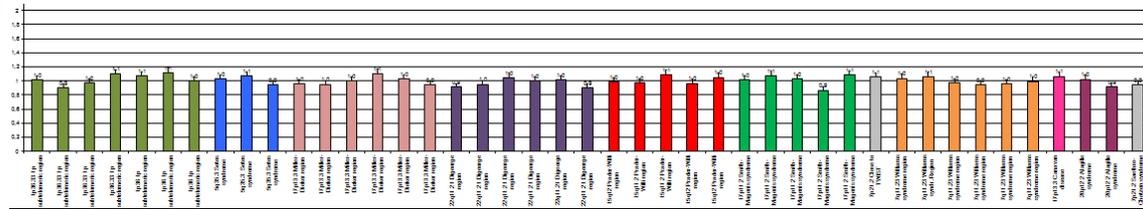
0719\_dRICA.rsd



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

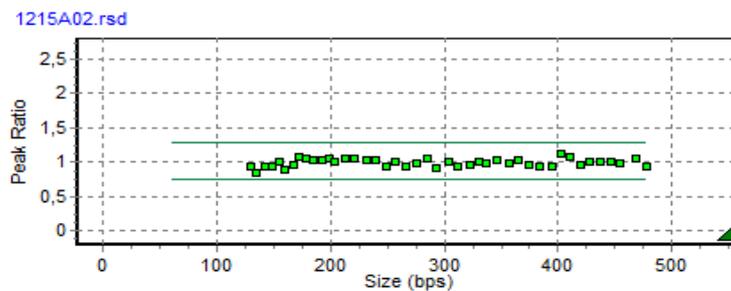
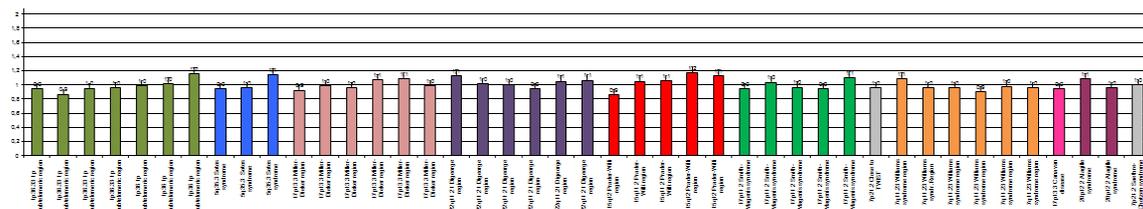


**1102**, paciente do sexo masculino, 16 anos e 1 mês. Apresenta DI leve a moderada com déficit de aprendizagem. Apresenta estrabismo convergente, nevus em tronco e dorso, micrognatia, com orelhas baixo implantadas, palato alto, mamilo direito invertido, deformidade em ambos calcâneos.



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

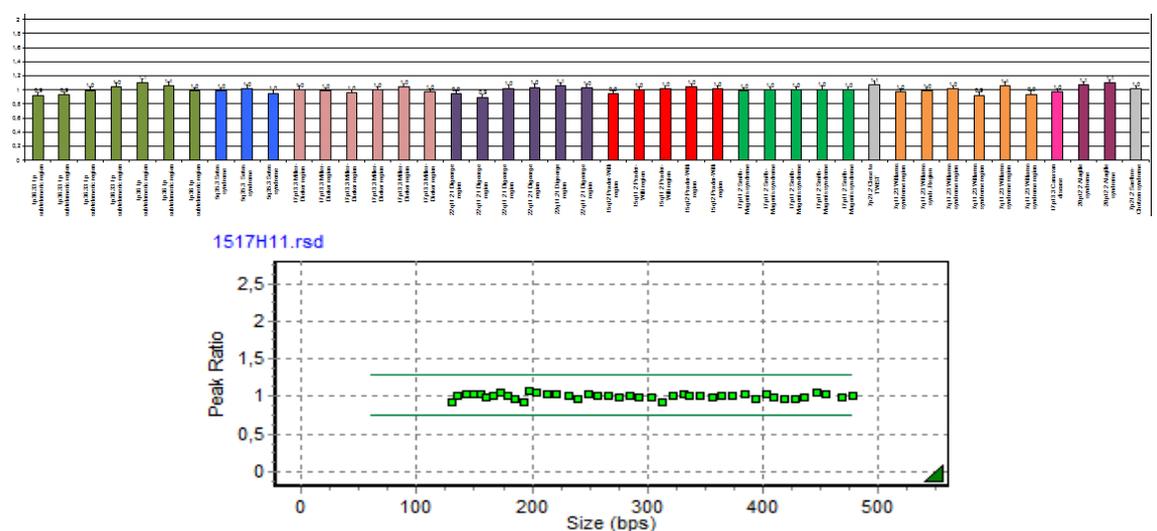
**1215**, paciente do sexo masculino, 8 anos. Apresenta DI moderada com macrocefalia, atraso na linguagem e déficit de atenção. Apresenta epicanto, hipertelorismo ocular, displasia do pavilhão auricular e mamilos invertidos.



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

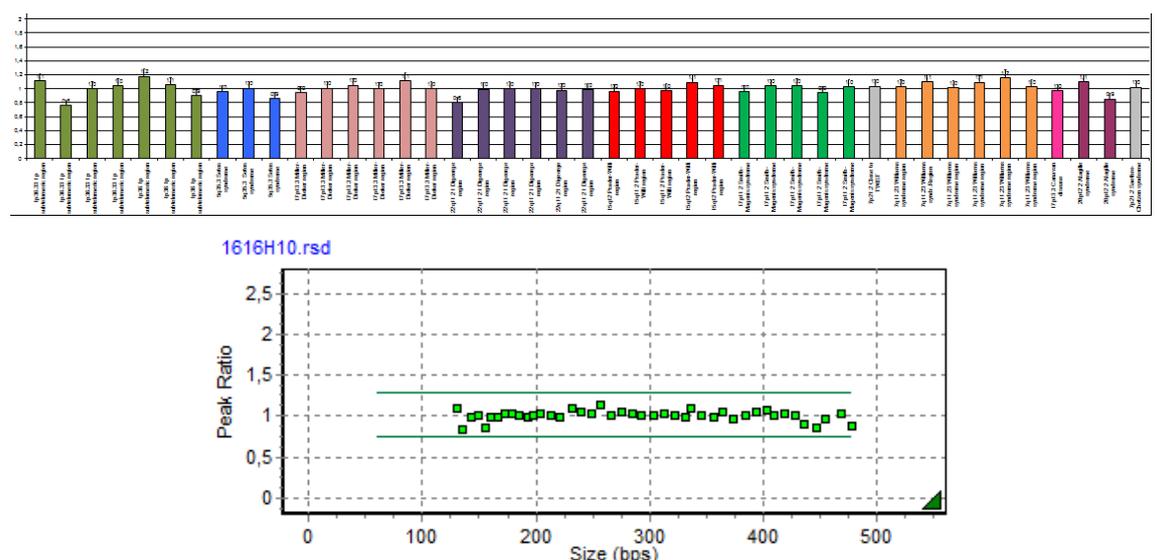


**1517**, paciente do sexo feminino, 11 anos e 2 meses. Apresenta DI grave com distúrbios de comportamento (arranca cabelos, é hiperativa, irritada e tem dificuldade de comunicação). Apresenta fenda palpebral oblíqua para cima, sinofre, displasia do pavilhão auricular, palato alto, hipertricose, cabelos baixo implantados na nuca e cútis marmorata.



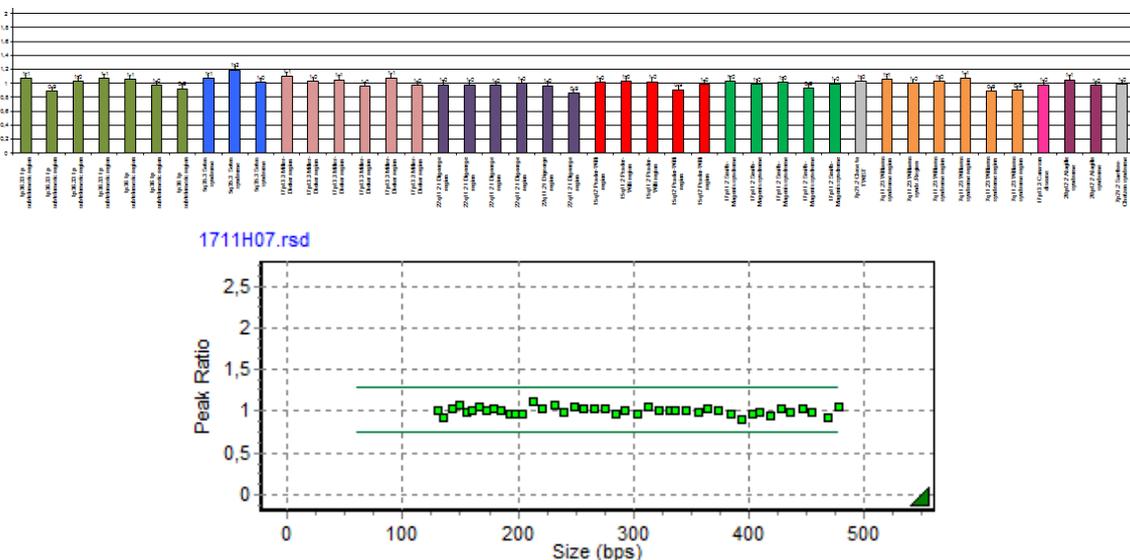
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**1616**, paciente do sexo feminino, 16 anos e 1 mês. Apresenta DI moderada e crises convulsivas. Tem miopia, baixa implantação de cabelo na nuca, displasia de pavilhão auricular, palato alto, hipoplasia da unha do 5º dedo, cubitus valgus, espaço entre 1º e 2º artelhos aumentado.



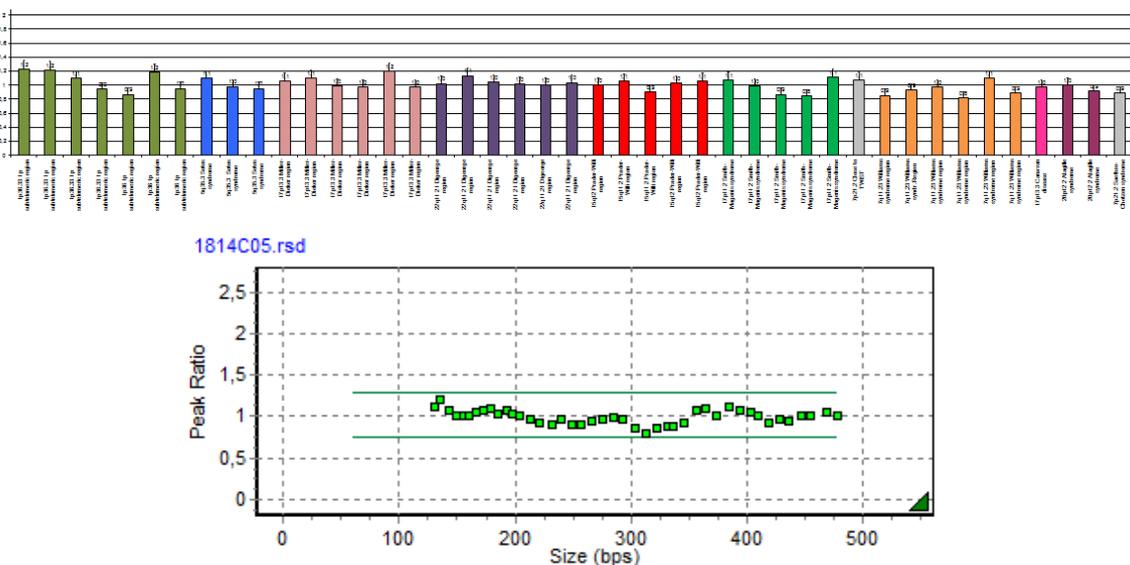
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**1711**, paciente do sexo masculino, 7 anos e 9 meses. Apresenta DI grave sem distorções. Apresenta infecções de vias aéreas superiores e inferiores frequentes.



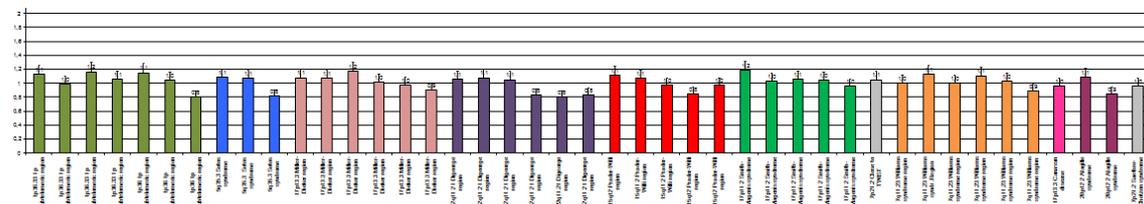
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**1814**, paciente do sexo masculino, 13 anos e 9 meses. Apresenta DI leve a moderada com déficit de aprendizagem. Apresenta cubitus valgo, hipertelorismo ocular, assimetria de membros inferiores e pé plano.

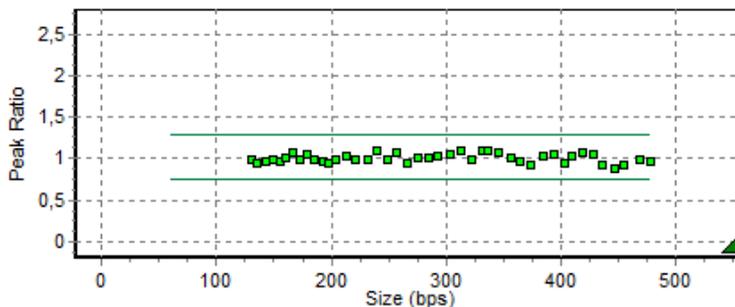


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**1913**, paciente do sexo masculino, 5 anos e 2 meses. Apresenta DI moderada a grave com algumas alterações de comportamento sugestivas de comportamento autístico. Tem braquicefalia, fenda palpebral grande e oblíqua para cima, cílios longos, orelhas em abano,

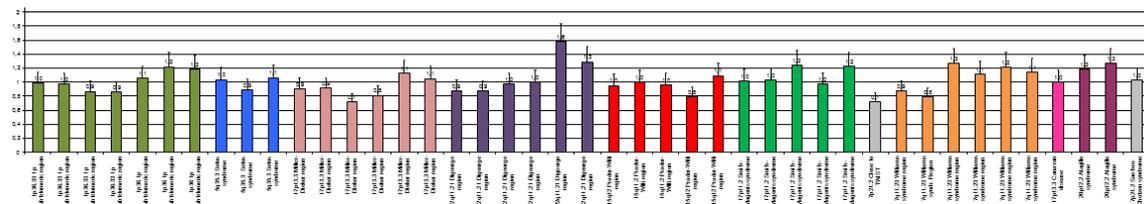


1913G08.rsd

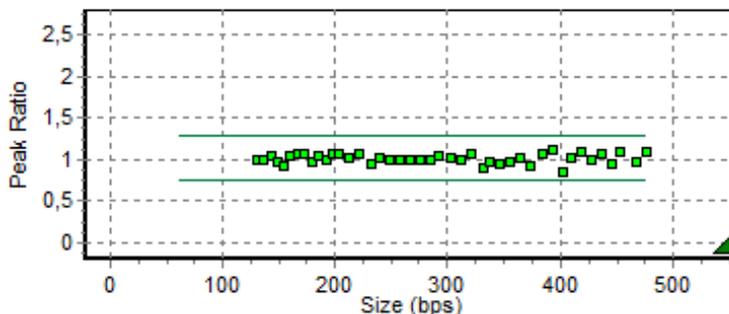


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**2049**, paciente do sexo masculino, 12 anos e 4 meses. Apresenta DI leve com hiperatividade e déficit de atenção. tem nistagmo, estrabismo, distúrbio de refração, fâcias longilínea, orelhas proeminentes, palato alto, assimetria torácica, discreta frouxidão ligamentar.



2049\_dRICA.rsd

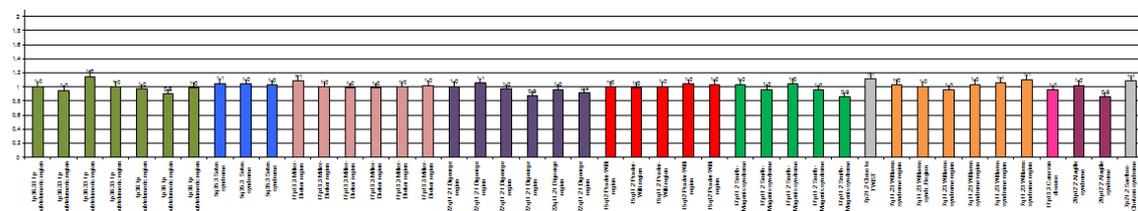


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

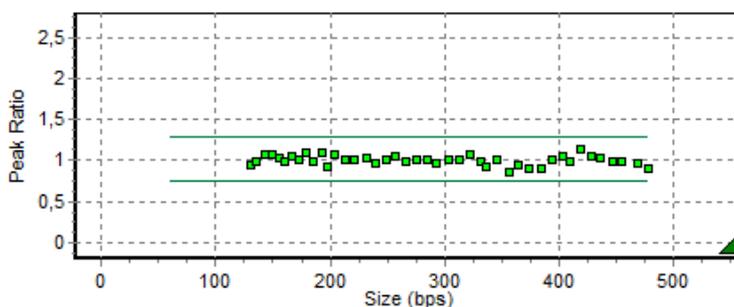




**2625**, paciente do sexo masculino, 11 anos e 3 meses. Tem DI leve a moderada com déficit escolar. Tem cardiopatia congênita, e dismorfias: hipertelorismo aparente, clinodactilia discreta, palato alto discreto, nevus e mancha café com leite nas costas. Fez cirurgia para correção de hérnia inguinal.

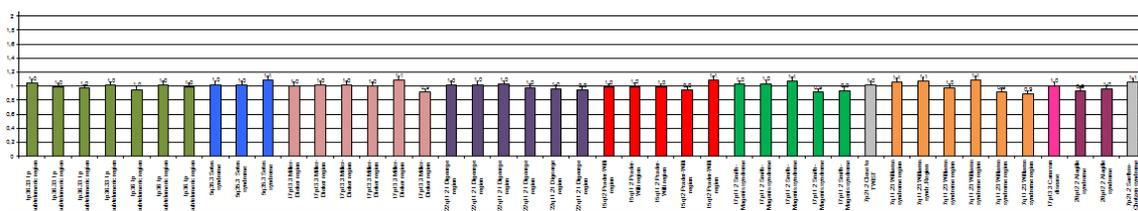


2625E02.rsd

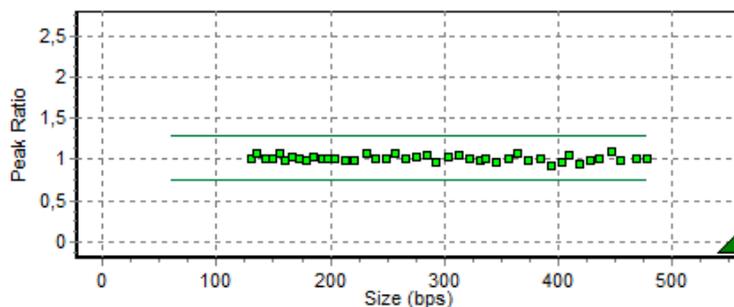


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**2726**, paciente do sexo masculino, 2 anos e 3 meses. Apresenta ADNPM e dismorfias: retração bitemporal, displasia do pavilhão auricular, epicanto, implantação do segundo artelho mais alta bilateralmente, testículos retráteis e hemangioma plano em frente.

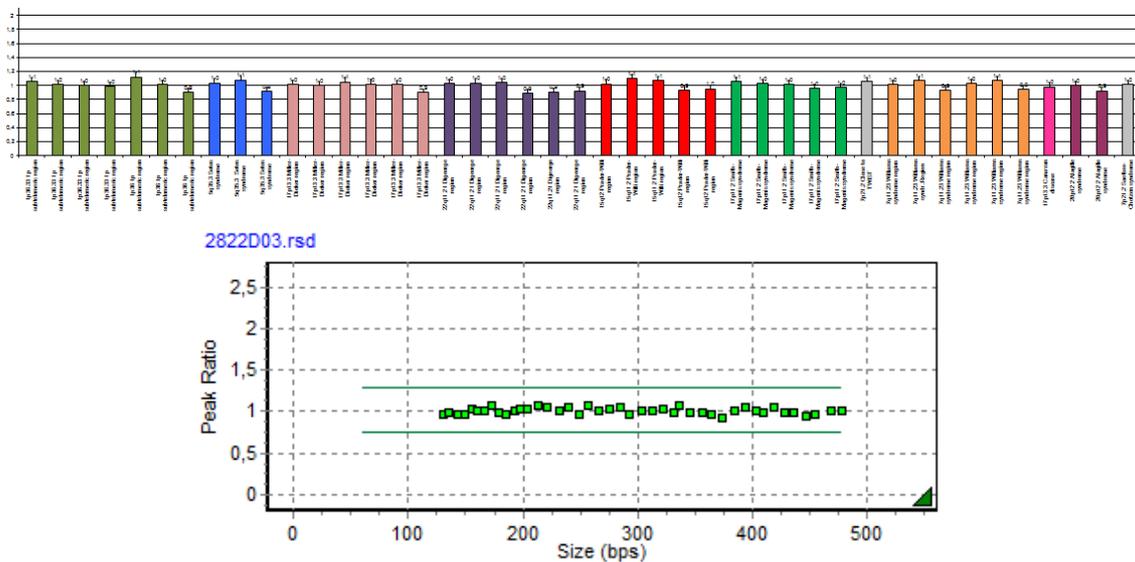


2726C07.rsd



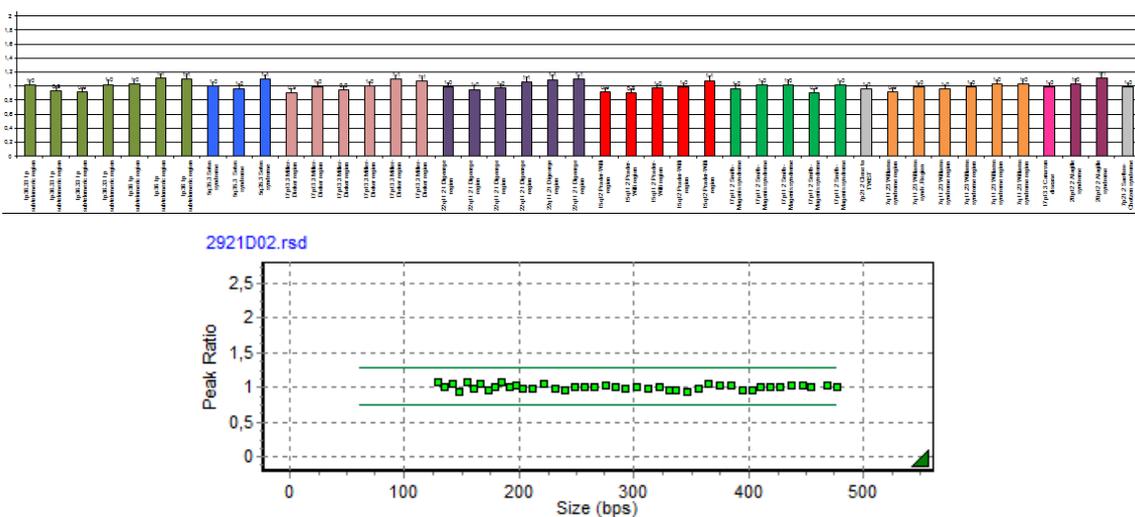
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**2822**, paciente do sexo masculino, 3 anos e 4 meses. Apresenta ADNPM, hipotonia global e dismorfias: fendas palpebrais curtas e oblíquas para cima, displasia do pavilhão auricular, lábios finos, queixo pontiagudo, clinodactilia bilateral, dedos das mãos longos, frouxidão ligamentar e testículo direito no canal.



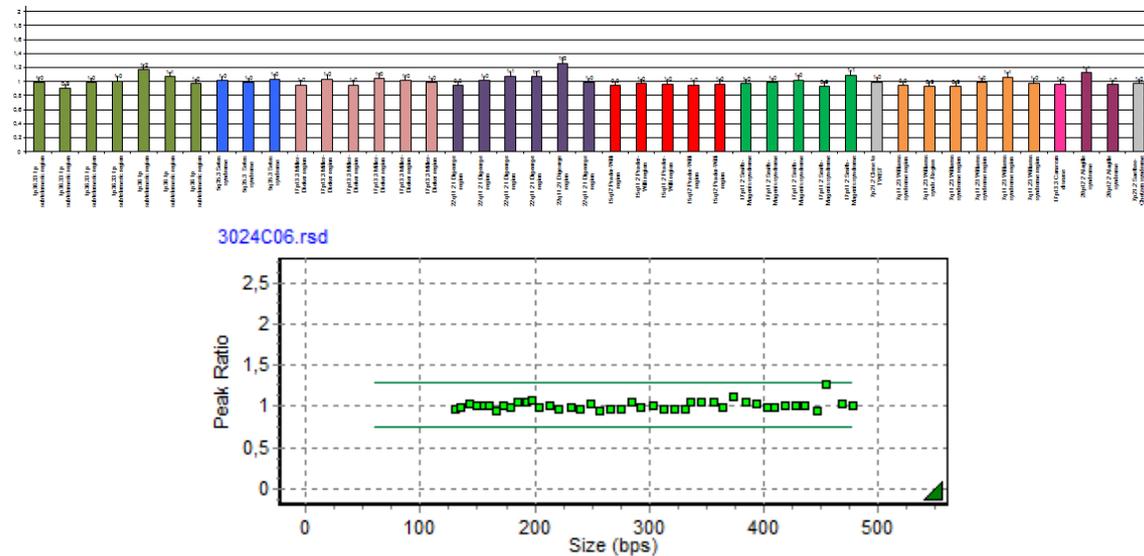
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**2921**, paciente do sexo feminino, 22 anos e 6 meses. Apresenta DI moderada e baixo rendimento escolar. Apresenta dismorfias: epicanto, fenda palpebral oblíqua para cima. Raiz nasal alta, prognatismo mandibular.



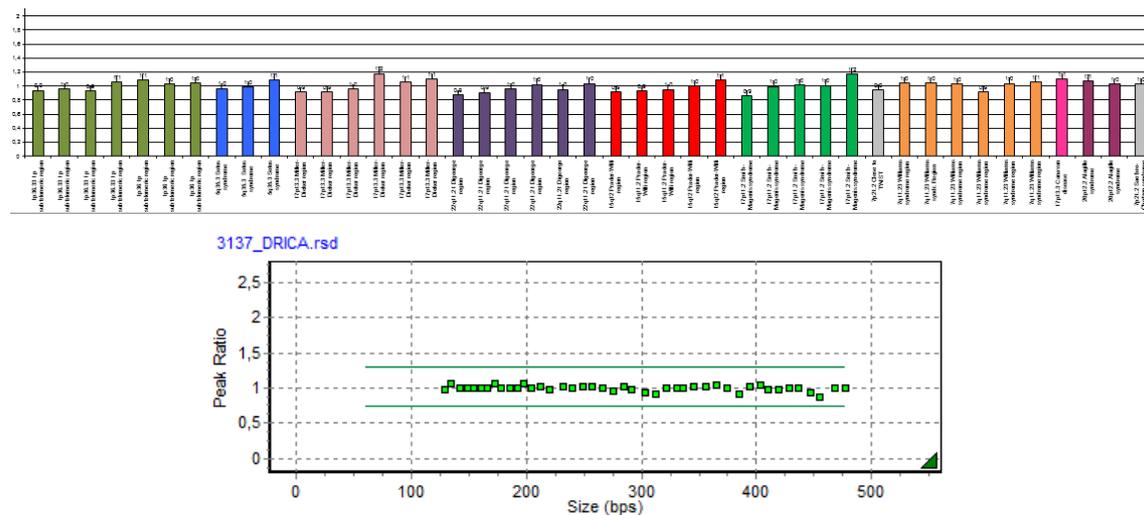
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3024**, paciente do sexo feminino, 14 anos. Apresenta DI grave com microcefalia, sem dismorfias aparentes, já apresentou convulsão, agora tem ameaças de crises controladas por remédios. Tem irritabilidade ocasional.



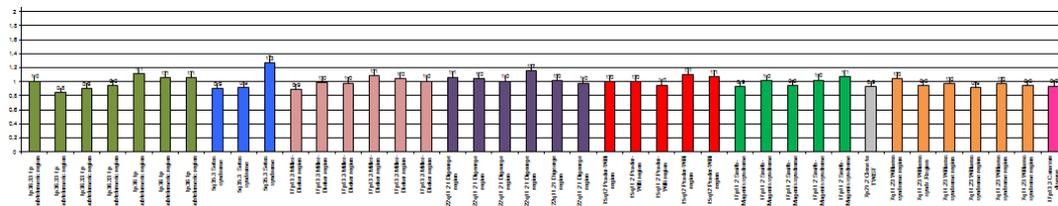
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3137**, paciente do sexo feminino, 15 anos e 7 meses. Apresenta DI leve a moderada. Tem discreta hipertricosse em dorso, cabelos baixo implantados na nuca, clionodactilia discreta, discreto afilamento de falange distal dos dedos e baixa estatura.

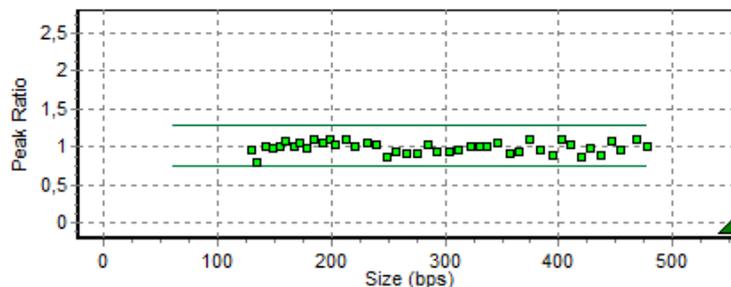


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3239**, paciente do sexo feminino, 32 anos e 5 meses. Apresenta DI leve a moderada com dificuldade de relacionamento interpessoal. Não apresenta distorções.

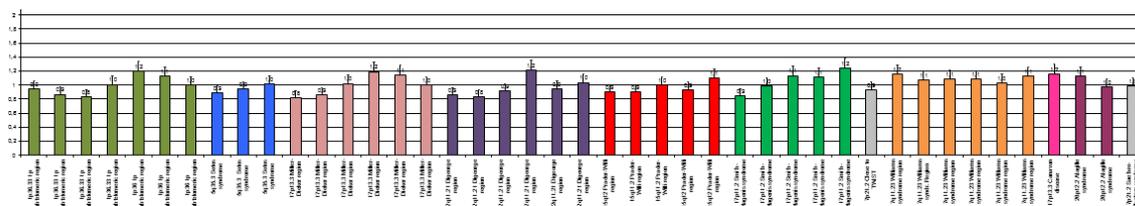


3239E05.rsd



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3338**, paciente do sexo feminino, 28 anos e 4 meses. Apresenta DI leve a moderada com dificuldade de relacionamento interpessoal e distorções: palato alto, hipoplasia de 4º metacarpo bilateralmente e dedos das mãos alongados.

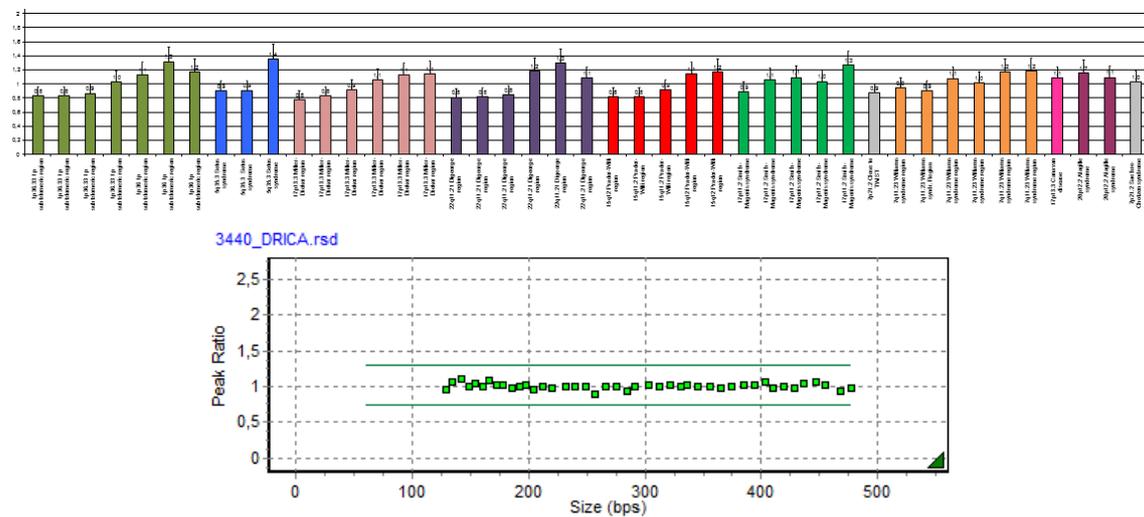


3338\_DRICA.rsd



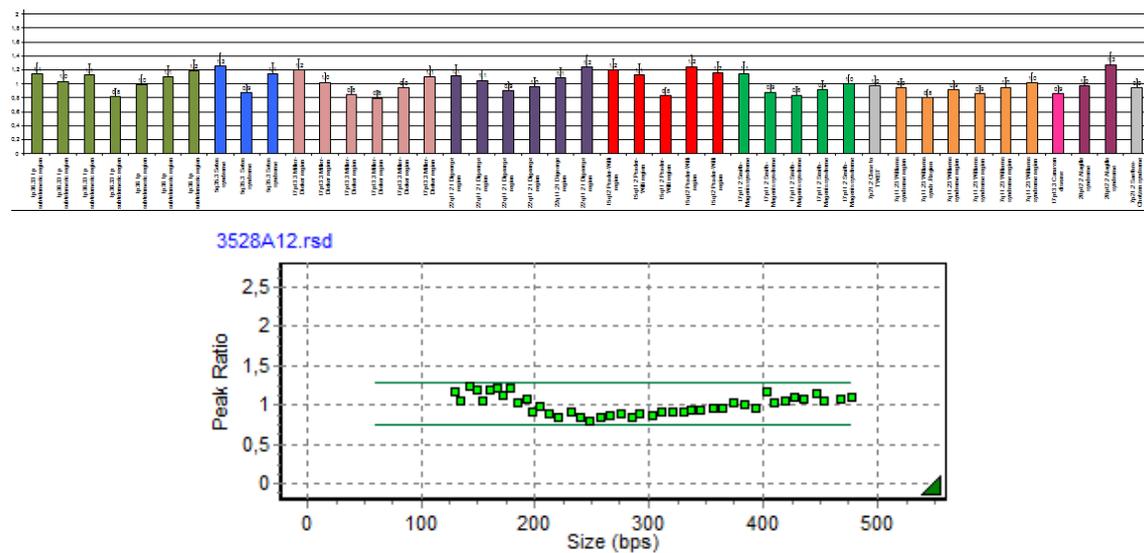
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3440**, paciente do sexo masculino, 2 anos. Apresenta ADNPM, hipotonia global e miocardiopatia hipertrófica.



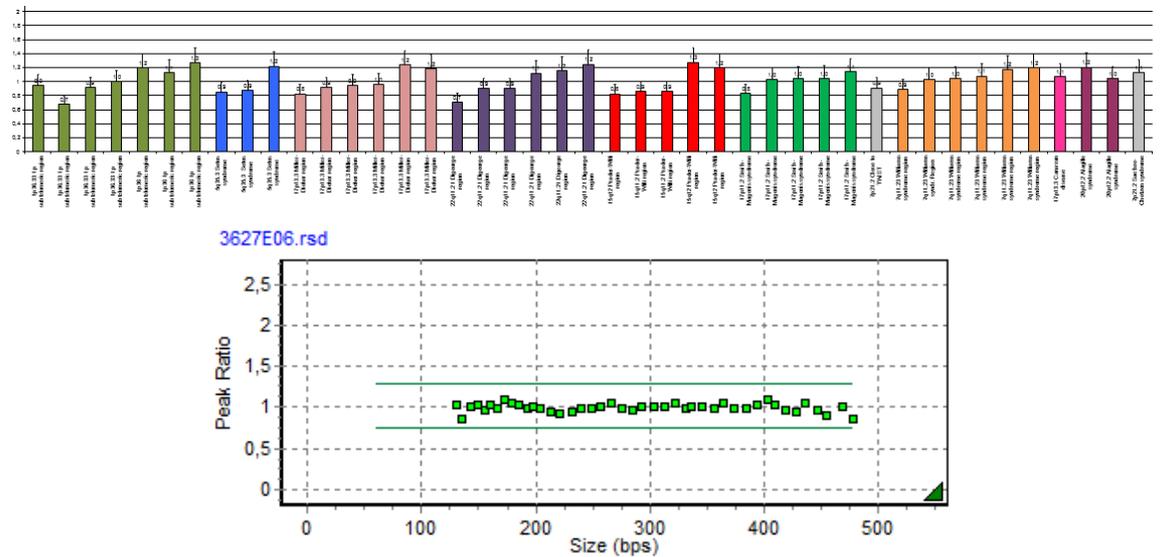
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3528**, paciente do sexo masculino, 11 anos e 11 meses. Apresenta DI moderada e dismorfias: epicanto, estrabismo bilateral convergente, falhas nas sobrancelhas, palato alto.



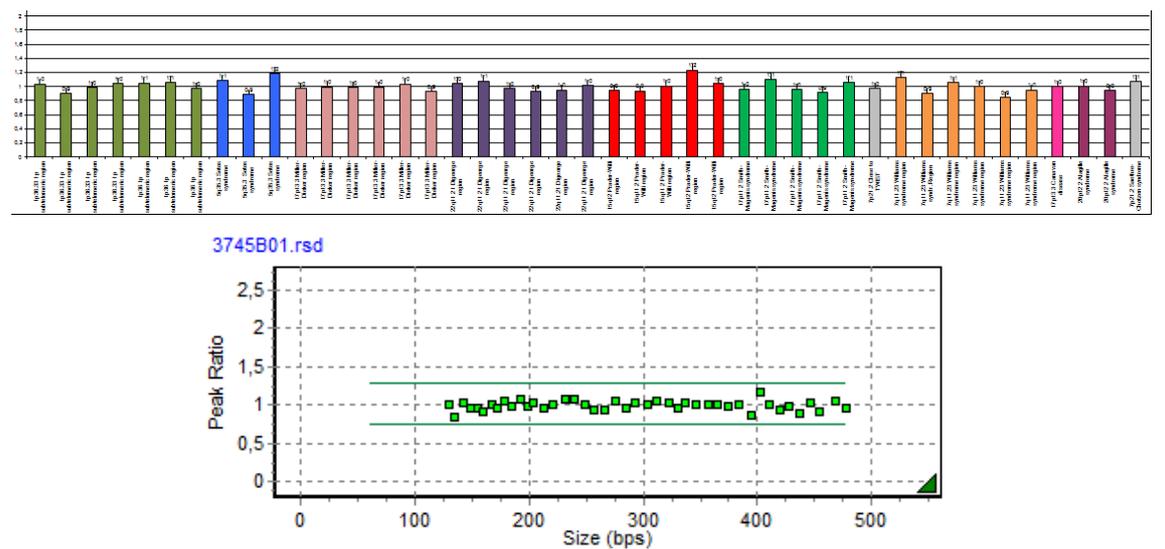
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3627**, paciente do sexo feminino, 5 anos e 5 meses. Apresenta ADNPM, hipotonia e hiperatividade. Não tem distorções significativas.



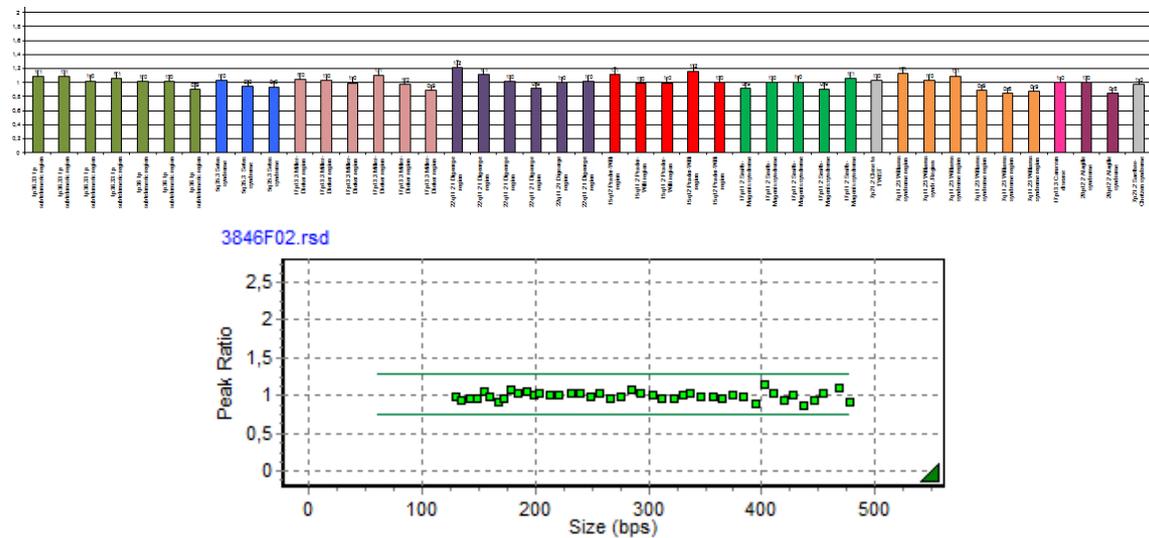
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3745**, paciente do sexo masculino, 7 anos e 1 mês. Apresenta DI moderada com irritabilidade, hiperatividade, dificuldade de concentração e déficit de aprendizagem. Apresenta distorções: hipertelorismo ocular, cílios longos, prognatismo, clinodactilia em ambas as mãos e escoliose.



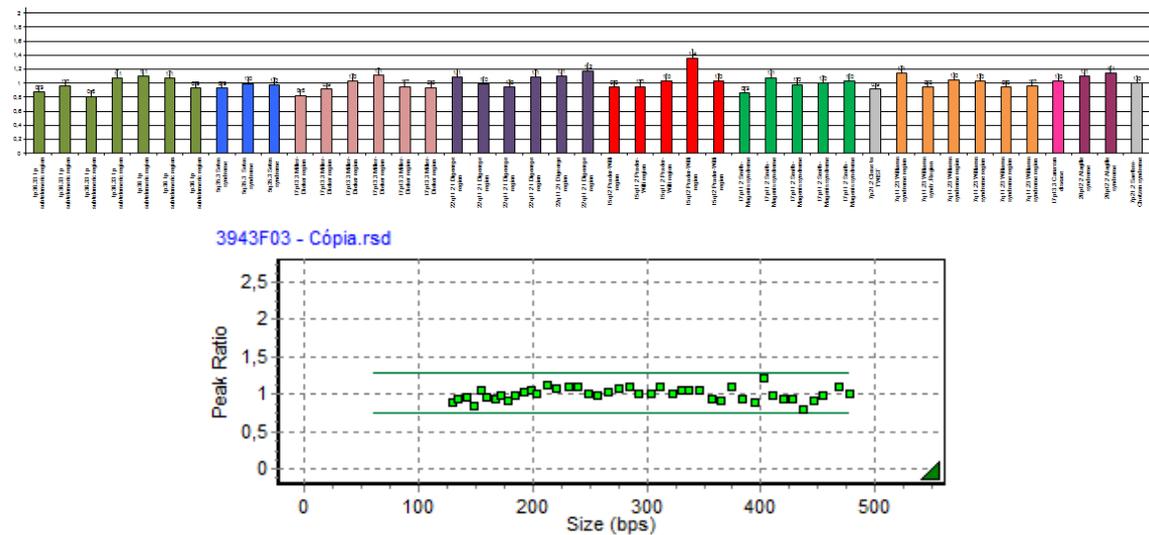
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3846**, paciente do sexo masculino, 1 ano e 5 meses. Apresenta ADNPM e fácies síndrômica: retração bitemporal, displasia de pavilhão auricular, fenda palpebral oblíqua para cima, palato alto, cútis marmorata.



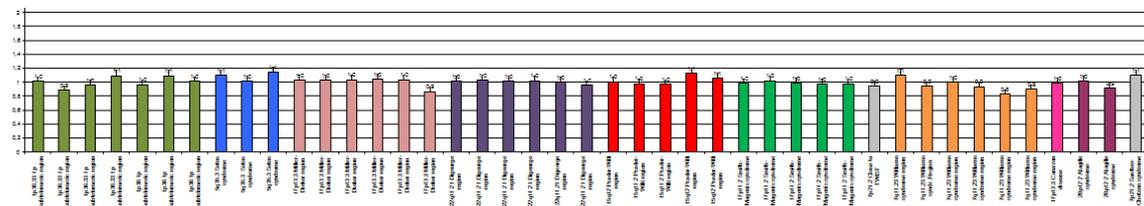
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**3943**, paciente do sexo masculino, 36 anos. Apresenta DI moderada, hiperatividade, hiperfagia, comportamento agressivo ao ser contrariado. Não tem distúrbios significativos.

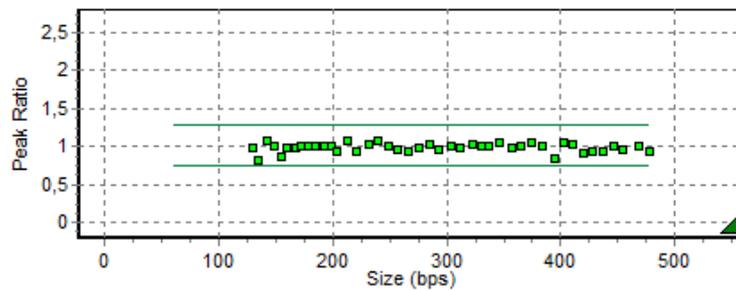


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**4041**, paciente do sexo masculino, 3 anos e 9 meses. Apresenta ADNPM e fácies sindrômica ao nascimento com retração bitemporal, displasia de pavilhão auricular, micrognatia, hérnia umbilical, cútis marmorata, e aplasia da cútis na região da fontanela.



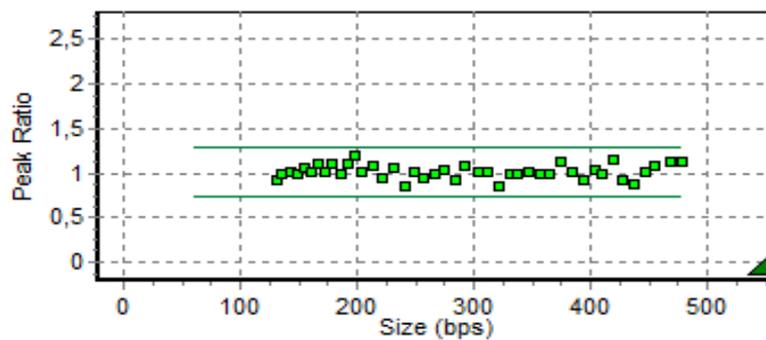
4041B04 - Cópia.rsd



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

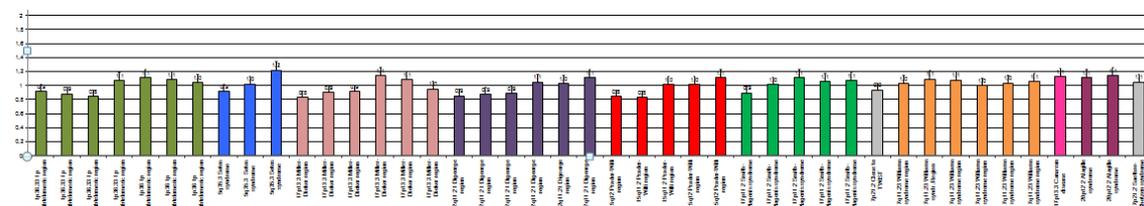
**4144**, paciente do sexo feminino, 13 anos e 5 meses. Apresenta DI leve a moderada, com dismorfias: discreta clinodactilia em ambas as mãos, discreto prognatismo, orelhas em abano.

4144\_DricaF09.rsd

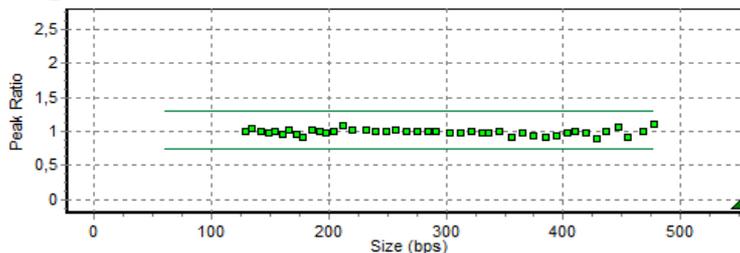


Resultado analisado pelo GeneMarker®.

**4242**, paciente do sexo masculino, 8 anos e 5 meses. Apresenta DI grave com distorções: orelhas em abano, raiz nasal alta, micrognatia.

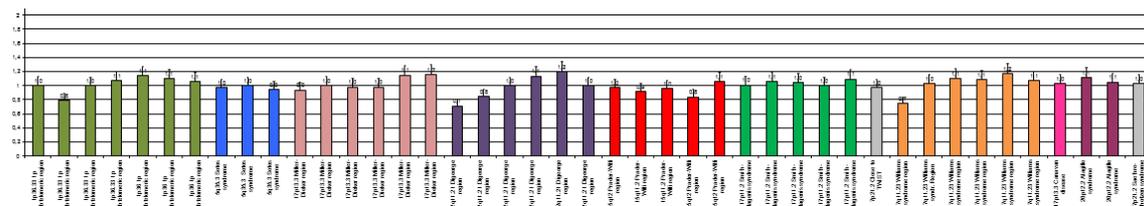


4242\_DRICA.rsd

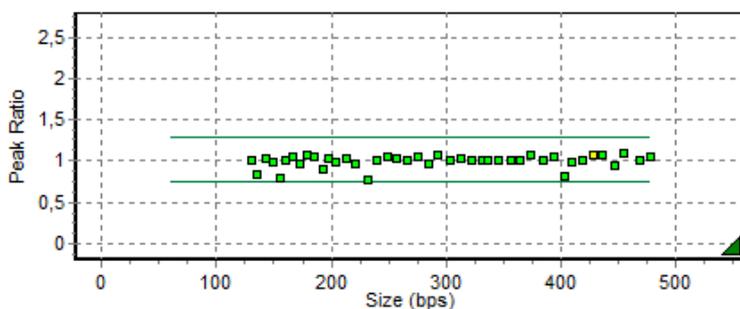


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**4330**, paciente do sexo masculino, 12 anos e 11 meses. Apresenta DI moderada com comportamento verborrágico. Tem lábios grossos e orelhas em abano.



4330D09.rsd

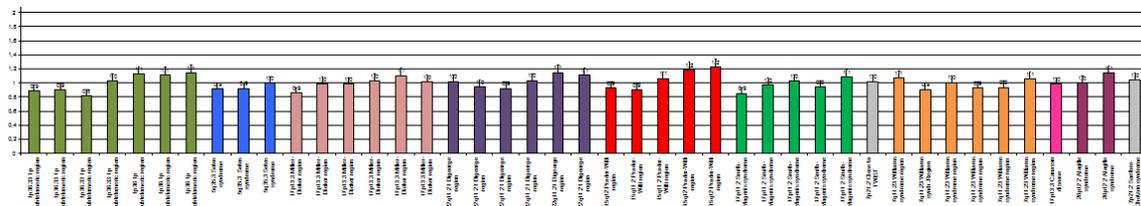


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

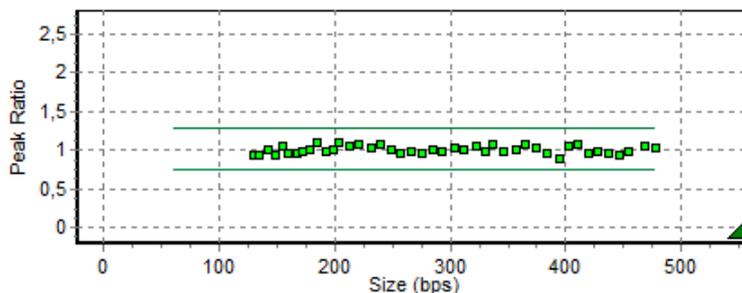




**4836**, paciente do sexo masculino, 11 anos e 9 meses. Apresenta DI moderada com dificuldade de aprendizado, hiperatividade e crises convulsivas esporádicas. Fez cirurgia de hérnia umbilical e inguinal esquerda, apresenta olhos fundos e estrabismo convergente.

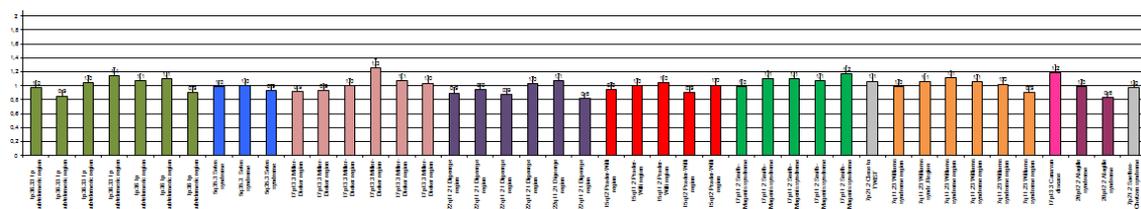


4836G04 - Cópia.rsd

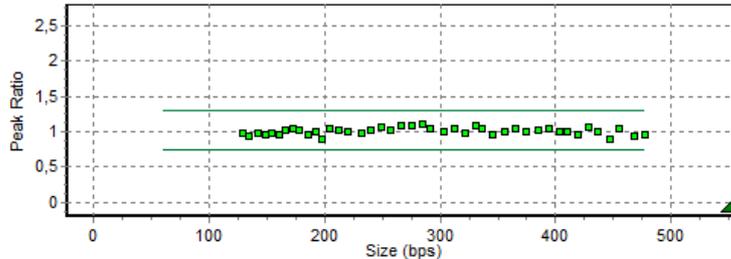


Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**4934**, paciente do sexo feminino, 23 anos e 6 meses. Apresenta DI grave e microcefalia, com epilepsia focal sintomática e ausência de linguagem. Apresenta prognatismo mandibular, discreto cubitus valgo, sindactilia cutânea entre 2º e 3º artelhos (1/3 proximal).

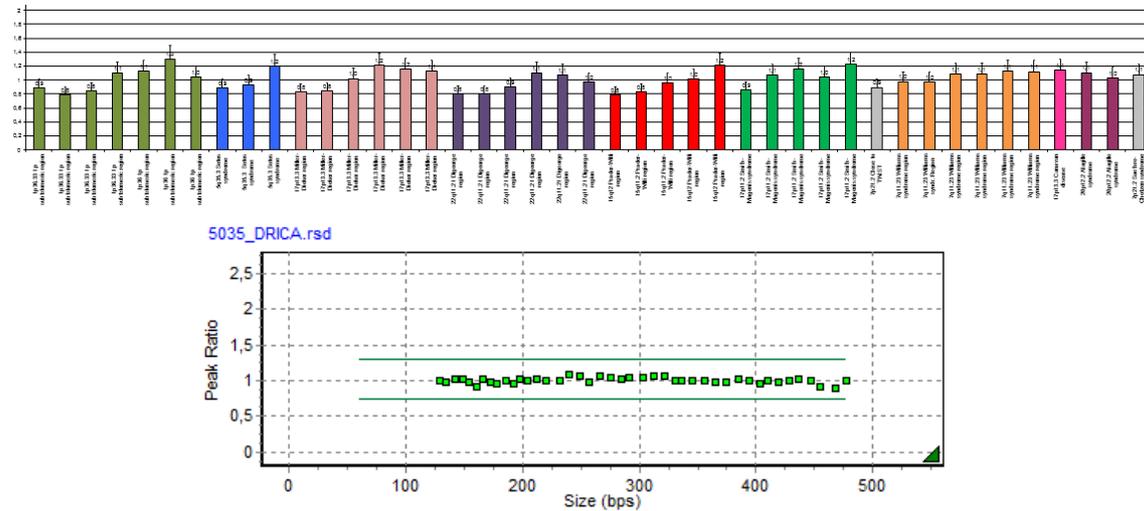


4934\_DRICA.rsd



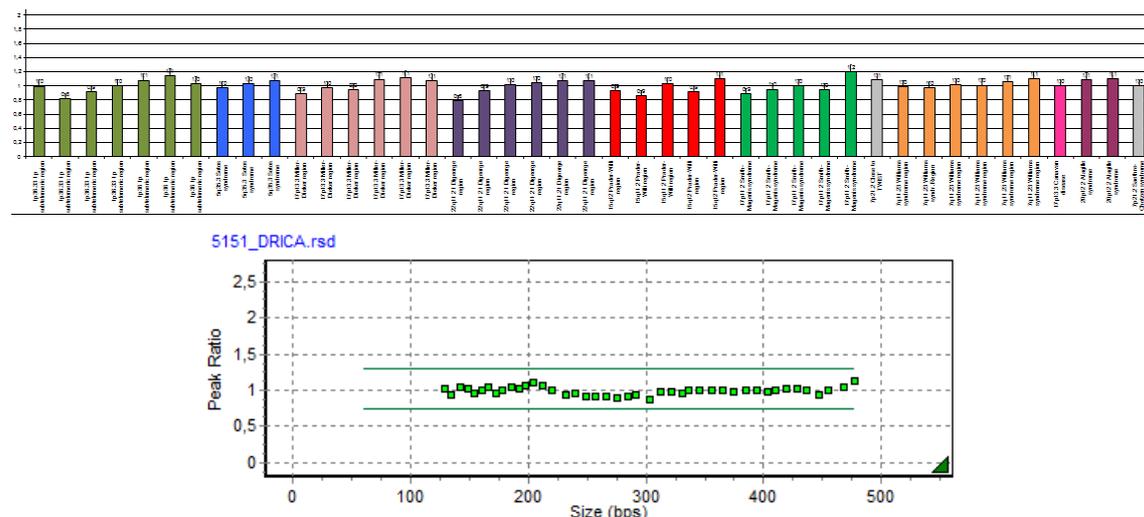
Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**5035**, paciente do sexo masculino, 14 anos e 6 meses. Apresenta DI leve a moderada, déficit de aprendizagem e déficit de atenção. Apresenta fenda palpebral oblíqua para baixo, micrognatia importante, raiz nasal alta, pescoço curto, orelhas baixo implantadas, assimetria torácica.



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

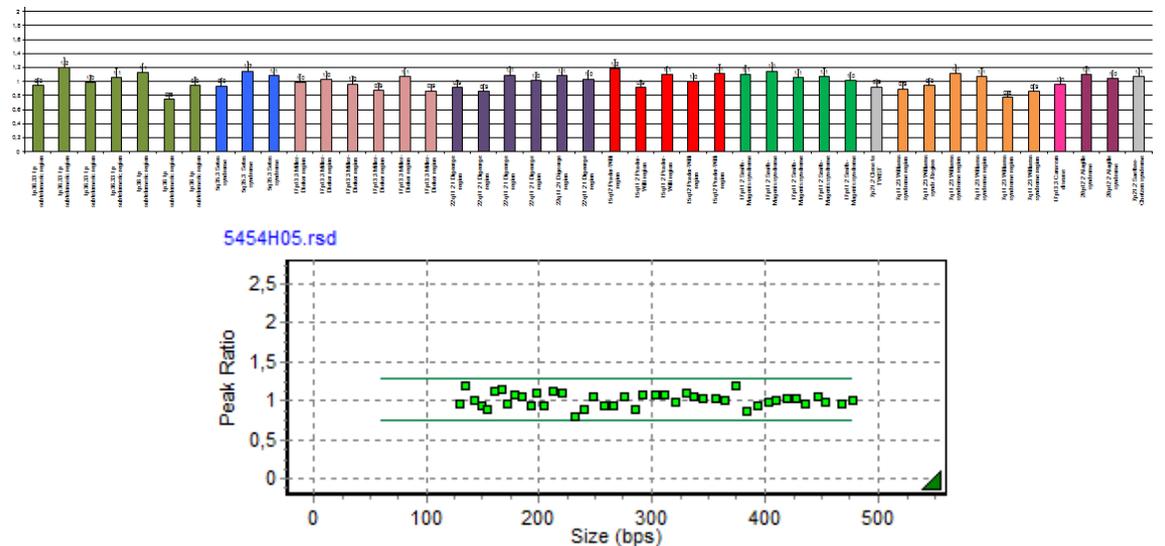
**5151**, paciente do sexo feminino, 15 anos e 4 meses. Apresenta DI moderada com poucas dismorfias (palato alto, dentes apinhados, discreto sobredobramento de hélix, clinodactilia, aumento do espaço entre 2° e 3° quirodáctilos e entre o 1° e 2° pododáctilos).



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

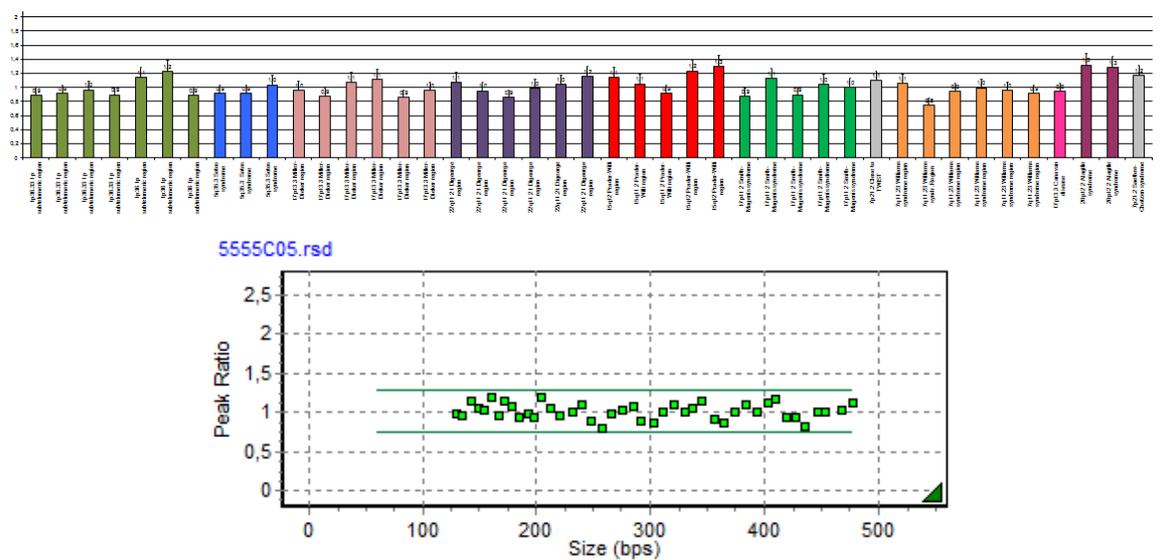


**5454**, paciente do sexo feminino, 3 anos e 2 meses. Apresenta ADNPM, epilepsia e hipotonia global. Tem discreto apagamento da face média, discreta proptose ocular, palato alto, afilamento de falange distal e cútis marmorata.



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

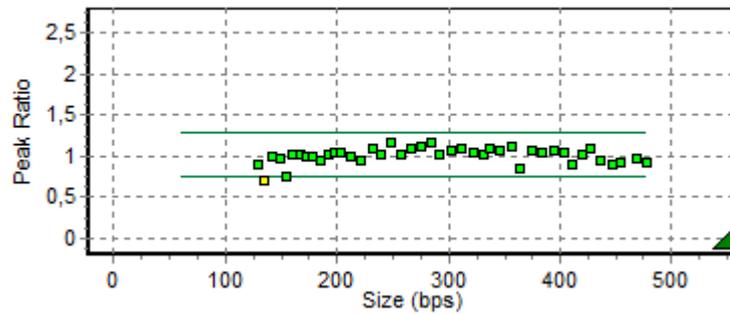
**5555**, paciente do sexo masculino, 12 anos e 10 meses. Apresenta DI moderada, dificuldade escola, déficit de atenção, hiperatividade, agressividade, hiperfagia e pouca autonomia em cuidados de sua higiene pessoal. Tem obesidade, pés tortos e pequenos, mamilos invertidos, mancha hipocrômica em abdome, displasia de lóbulo auricular, afilamento da falange distal dos dedos.



Resultado analisado pelo Coffalyser® e GeneMarker® respectivamente.

**5656**, paciente do sexo feminino, 4 anos. Apresenta atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, obesidade e distúrbios: sinofre discreta e olhos amendoados.

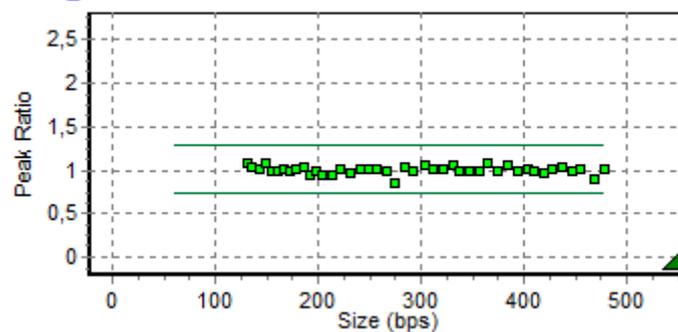
5656\_DricaE07.rsd



Resultado analisado pelo GeneMarker®.

**5757**, paciente do sexo feminino, 9 anos e 10 meses. Apresenta DI moderada a grave, com distúrbios: face triangular, prognatismo, cúbito valgo.

5757\_DricaF08.rsd



Resultado analisado pelo GeneMarker®.

## 8.6. Anexo 6

### Laudo do teste genético negativo

#### RESULTADO

**PACIENTE:**

**DATA DE NASCIMENTO:**

**SEXO:**

**MÉDICO REQUERENTE:** Dra Débora Gusmão Melo

**ORIENTADORES DA PESQUISA:** Dra Débora Gusmão Melo e Dr. Euclides Matheucci Jr.

**TÉCNICOS RESPONSÁVEIS:** Dra Adriana Rosolia Costa Sabbag; Dr Bruno Garcia Rocha.

**EXAME:** Pesquisa de Síndromes de Microdeleção

**AMOSTRA UTILIZADA:** Sangue total colhido em EDTA.

**TÉCNICA UTILIZADA:** Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA - MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands); Kit P064 B2.

**DESCRIÇÃO RESUMIDA DA TÉCNICA:** O MLPA é um teste genético capaz de realizar uma semiquantificação de segmentos cromossômicos, cuja alteração numérica (deleção ou duplicação) seja sabidamente relacionada à presença de determinadas síndromes genéticas. O teste analisa as principais sequências relacionadas às síndromes que podem ser detectadas pelo kit, porém, alguns indivíduos podem ser portadores de alguma dessas síndromes com alterações não capazes de serem detectadas pelo teste em questão.

**SÍNDROMES CAPAZES DE SEREM DETECTADAS PELO KIT P064 B2:** síndrome de deleção 1p36; síndrome de Williams; síndrome de Smith-Magenis; síndrome de Miller-Dieker; síndrome de deleção 22q11.2; síndrome de Prader-Willi; síndrome de Angelman; síndrome de Alagille; síndrome de Saethre-Chotzen; síndrome de Sotos; doença de Canavan.

**RESULTADO MLPA:** Não foi detectada nenhuma alteração nas sequências analisadas pelo teste MLPA com o kit P064 B2.

---

**Dra Débora Gusmão Melo**  
**CRM-SP: 89.771**

---

**Dra Adriana Rosolia Costa Sabbag**  
**CRBM-SP: 11170**

---

**Dr Bruno Garcia Rocha**

---

**Dr Euclides Matheucci Jr**  
**Orientador**

São Carlos, de de 2012.

## 8.7. Anexo 7.

### Laudo do teste genético positivo

#### RESULTADO

**PACIENTE:**

**DATA DE NASCIMENTO:**

**SEXO:**

**MÉDICO REQUERENTE:** Dra Débora Gusmão Melo

**ORIENTADORES DA PESQUISA:** Dra Débora Gusmão Melo e Dr. Euclides Matheucci Jr.

**TÉCNICOS RESPONSÁVEIS:** Dra Adriana Rosolia Costa; Dr Bruno Garcia Rocha.

**EXAME:** Pesquisa de microdeleções cromossômicas associadas a síndromes genéticas.

**AMOSTRA UTILIZADA:** Sangue total colhido em EDTA.

**TÉCNICA UTILIZADA:** Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA - MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands); Kit P064 B2.

**DESCRIÇÃO RESUMIDA DA TÉCNICA:** O MLPA é um teste genético capaz de realizar uma semiquantificação de segmentos cromossômicos, cuja alteração numérica (deleção ou duplicação) seja sabidamente relacionada à presença de determinadas síndromes genéticas. O teste analisa as principais sequências relacionadas às síndromes que podem ser detectadas pelo kit, porém, alguns indivíduos podem ser portadores de algumas dessas síndromes com alterações não capazes de serem detectadas pelo teste em questão.

**SÍNDROMES CAPAZES DE SEREM DETECTADAS PELO KIT P064 B2:** síndrome de deleção 1p36; síndrome de Williams; síndrome de Smith-Magenis; síndrome de Miller-Dieker; síndrome de deleção 22q11.2; síndrome de Prader-Willi; síndrome de Angelman; síndrome de Alagille; síndrome de Saethre-Chotzen; síndrome de Sotos; doença de Canavan.

**RESULTADO MLPA:** Após comparação da amostra teste com 5 controles foram detectadas deleções nos seguintes genes: \_\_\_\_\_, indicando que o paciente tem síndrome \_\_\_\_\_ (CID \_\_\_\_\_), como demonstrado na Figura 1.

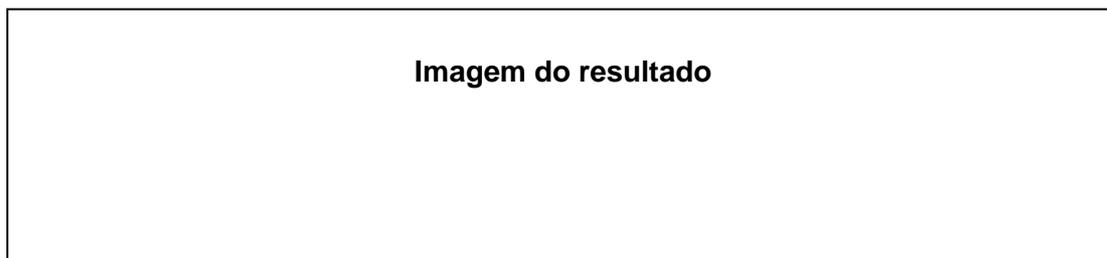


Figura 1. Diagrama da análise dos resultados com a região deletada indicada pela seta.

---

**Dra Débora Gusmão Melo**  
CRM-SP: 89.771

---

**Dra Adriana Rosolia Costa Sabbag**  
CRBM-SP: 11170

---

**Dr Bruno Garcia Rocha**

---

**Dr Euclides Matheucci Jr**  
Orientador

São Carlos, de de 2012.

UFSCar, CAPES, CNPq, QGENE, DNAConsult.