

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

MELISSA MACHADO VIANA

**CONTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO PARA O DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES DE
MICRODELEÇÕES POR MEIO DE METODOLOGIA ADEQUADA À REALIDADE
BRASILEIRA**

Belo Horizonte

2013

MELISSA MACHADO VIANA

**CONTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO PARA O DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES DE
MICRODELEÇÕES POR MEIO DE METODOLOGIA ADEQUADA À REALIDADE
BRASILEIRA**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em Saúde
da Criança e do Adolescente**

**Área de concentração: Saúde da Criança e
do Adolescente**

**Orientador: Prof. Dr. Marcos José Burle
de Aguiar**

Belo Horizonte

2013

V614c Viana, Melissa Machado.
Contribuição do fenótipo para o diagnóstico de síndromes de microdeleções por meio de metodologia adequada à realidade brasileira [manuscrito]. / Melissa Machado Viana. - - Belo Horizonte: 2013. 125f.: il.
Orientador: Marcos José Burle de Aguiar.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Fenótipo. 2. Síndrome de Williams. 3. Síndrome de DiGeorge. 4. Síndrome de Prader-Willi. 5. Síndrome de Angelman. 6. Reação em Cadeia da Polimerase. 7. Tecnologia de Baixo Custo. 8. Dissertações Acadêmicas. I. Aguiar, Marcos José Burle de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WS 200



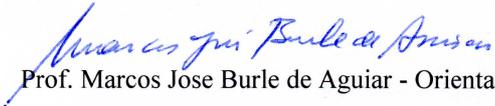
FOLHA DE APROVAÇÃO

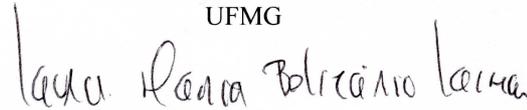
“CONTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO PARA O DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES DE MICRODELEÇÕES POR MEIO DE METODOLOGIA ADEQUADA À REALIDADE BRASILEIRA”

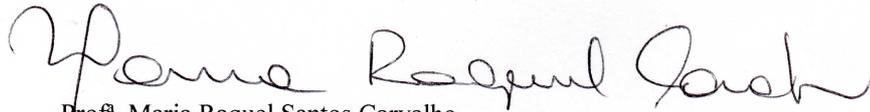
MELISSA MACHADO VIANA

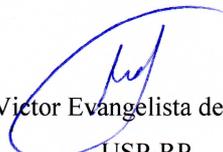
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde, Saúde da Criança e do Adolescente.

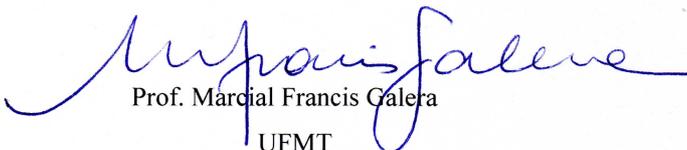
Aprovada em 19 de julho de 2013, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Marcos Jose Burle de Aguiar - Orientador
UFMG


Prof. Laura Maria de Lima B Facury Lasmar
UFMG


Prof. Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG


Prof. Victor Evangelista de Faria Ferraz
USP-RP


Prof. Marcial Francis Galera
UFMT

Belo Horizonte, 19 de julho de 2013.



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA MELISSA MACHADO VIANA

Realizou-se, no dia 19 de julho de 2013, às 13:00 horas, Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **CONTRIBUIÇÃO DO FENÓTIPO PARA O DIAGNÓSTICO DE SÍNDROMES DE MICRODELEÇÕES POR MEIO DE METODOLOGIA ADEQUADA À REALIDADE BRASILEIRA**, apresentada por **MELISSA MACHADO VIANA**, graduada no curso de Medicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Marcos Jose Burle de Aguiar - Orientador (UFMG), Prof^a. Laura Maria de Lima Belizário Facury Lasmar (UFMG), Prof^a. Maria Raquel Santos Carvalho (UFMG), Prof. Victor Evangelista de Faria Ferraz (USP-RP), Prof. Marcial Francis Galera (UFMT).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada
- Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
- Reprovada

Finalizados os trabalhos, a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 19 de julho de 2013.

Prof. Marcos Jose Burle de Aguiar
Doutor - UFMG

Prof^a. Laura Maria de Lima B Facury Lasmar
Doutora - UFMG

Prof^a. Maria Raquel Santos Carvalho
Doutora - Ludwig-Maximilian Universität München

Prof. Victor Evangelista de Faria Ferraz
Doutor - USP

Prof. Marcial Francis Galera
Doutor - UNIFESP

À minha mãe, pelo exemplo de força e amor
incondicional.

Ao João, pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos José Burle de Aguiar, meu mentor, por toda a confiança em mim depositada, pelas incontáveis portas abertas, pelo exemplo de médico e cidadão, e pelo imenso apoio durante os percalços do Doutorado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Danilo Junho Pena, pelo brilhantismo acadêmico, pela confiança e por ter me dado a oportunidade de participar deste projeto.

Ao Dr. Martin Stofanko, pelo desenvolvimento e realização dos exames laboratoriais referentes ao novo método diagnóstico utilizado neste trabalho, pela ajuda na confecção dos artigos, pelo exemplo na área de pesquisa científica e pelo trabalho em equipe.

Ao Dr. Higgor Gonçalves-Dornelas e à Dra. Pricila da Silva Cunha, pela realização dos exames laboratoriais e trabalho em equipe, mesmo à distância.

À Dra. Letícia Lima Leão, que hoje posso chamar de amiga, exemplo de profissionalismo e atenção aos pacientes, pela convivência e ajuda em todas as etapas deste trabalho, desde a seleção de probandos até o alívio em momentos de angústia.

À Profa. Dra. Regina Amélia Lopes Pessoa de Aguiar, pela convivência, participação em minha formação e fomentação da visão crítica necessária à prática da Ciência.

À Profa. Dra. Luciana Haddad, com quem comecei a jornada do Doutorado, por ter me recebido de braços abertos.

Aos colegas geneticistas, residentes à época da realização da pesquisa (Dr. Henrique Galvão, Dra. Betânia Loures, Dra. Anisse Chami e Dra. Raquel Roque) que, agora, compartilham a vontade de promover a Genética Médica, pelo apoio na seleção de pacientes e coleta de amostras.

Aos residentes atuais do Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da UFMG (Dr. Arsonval Lamounier, Dra. Thaís Teixeira, Dr. João Paulo Faria e Dra. Raíssa

Gonçalves), pela ajuda em dar retorno aos pacientes e familiares participantes do estudo acerca dos resultados obtidos.

A todos os pacientes e seus familiares, pela disponibilidade em participar do estudo e compreensão da importância da pesquisa científica para melhoria do atendimento médico, sem os quais este trabalho não seria possível.

À minha mãe e irmãos, pela compreensão quanto às ausências e pelo apoio fundamental nesta caminhada, por vezes, tão difícil.

Ao meu pai, pelo encorajamento na pesquisa científica.

Ao João, meu amor, pelo apoio na busca da realização deste sonho, pelo companheirismo nesta jornada que têm sido a Medicina e a Genética Médica, por clarear minhas idéias em momentos de neblina, pela paciência nos períodos de ausência e por me fazer rir diariamente.

RESUMO

VIANA, M.M. **Contribuição do fenótipo para o diagnóstico de síndromes de microdeleções por meio de metodologia adequada à realidade brasileira.** 2013. 132p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

A Genética Médica é especializada em doenças que cursam com malformações congênitas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e déficit cognitivo, as quais podem ser individualmente raras, mas que, em conjunto, afetam um número considerável de indivíduos e famílias. O diagnóstico é parte importante da abordagem genética, uma vez que sua determinação precisa é indispensável para tratamento específico, prognóstico clínico e de qualidade de vida, orientação quanto à evolução da doença e eventuais complicações, além de definição de prognóstico reprodutivo para a família, com base no risco de recorrência em gestações futuras do casal. Atualmente, em 40 a 60% dos casos, não é possível firmar um diagnóstico etiológico em casos de deficiência mental/atraso do desenvolvimento neuropsicomotor com ou sem anomalias congênitas associadas. Os métodos diagnósticos em genética podem, basicamente, ser divididos em duas categorias: aqueles direcionados a todo o genoma (diagnóstico amplo) e os que são voltados a uma região específica do DNA (diagnóstico com alvo). Técnicas amplas são vantajosas ao permitir uma avaliação completa do genoma. Entretanto, as técnicas amplas com resolução alta são caras e proibitivas para o cenário de economias emergentes, como o Brasil. Já as técnicas com alvo são mais viáveis para países com poucos recursos. É mais lógico e barato ter uma suspeita clínica e indicar um teste diagnóstico específico do que realizar uma varredura de todo o genoma humano em busca de alguma alteração. Nesse contexto, os papéis da avaliação clínica, do médico e do fenótipo são fundamentais. As síndromes de microdeleções/microduplicações cromossômicas são causadas por variações submicroscópicas no número de cópias de determinada região do genoma e são uma causa comum de anomalias congênitas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/déficit cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos. O presente estudo foi desenvolvido para avaliar a contribuição do fenótipo na identificação e diagnóstico de pacientes com síndromes de microdeleções/microduplicações em Minas Gerais/Brasil, permitindo, assim, utilizar tecnologias direcionadas a regiões específicas do genoma e, por

isso, mais baratas e adequadas à realidade brasileira. Entre 2005 e 2012, 3.239 pacientes foram atendidos pela primeira vez no Serviço Especial de Genética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Destes, 205 (6,3%) apresentavam características clínicas sugestivas de uma das síndromes de microdeleções/microduplicações incluídas na pesquisa. Após uma taxa de perda de pacientes igual a 26,8%, 150 pacientes formaram o grupo a ser estudado. Destes, 37 foram positivos para uma das síndromes pesquisadas, o que confere um rendimento do fenótipo associado à metodologia utilizada igual a 24,7%. Foi usado um método inédito, rápido, confiável e de baixo custo para detecção de síndromes de microdeleções e microduplicações em humanos, denominado *Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (MQF-PCR). Foram obtidos os melhores resultados com as síndromes de Williams (rendimento igual a 63,6%), Prader-Willi (41,7%), Angelman (20%) e Velocardiofacial (12,9%). O teste diagnóstico utilizado no estudo mostrou-se apropriado para a realidade brasileira, especialmente, para pacientes com as síndromes supracitadas, doenças em que o fenótipo foi ferramenta adequada no auxílio diagnóstico.

Palavras-chave: Fenótipo, Síndrome de Williams, Síndrome Velocardiofacial, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Angelman, PCR, Tecnologia de baixo custo.

ABSTRACT

VIANA, M.M. **Phenotype contribution for the diagnosis of microdeletion syndromes using a methodology suited to Brazil.** 2013. 132p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

Medical Genetics specializes in disorders with congenital malformations, developmental delay and cognitive impairment, which can be individually rare, but that affect a considerable number of individuals and families when put together. Diagnosis is an important part of the genetic approach, since accurate diagnosis is essential to choose a specific treatment, to establish a clinical prognosis, to guide parents about the progress of the disease and possible complications and to define reproductive prognosis for the family, based on the risk of recurrence in future pregnancies. Currently, it is not possible to establish an etiologic diagnosis in cases of mental retardation/developmental delay with or without congenital anomalies in 40-60% of genetic patients. Diagnostic methods in genetics can be divided into two categories: those directed to the whole genome (broad diagnosis) and those that are geared to a specific DNA region (targeted diagnosis). Broad techniques allow a full assessment of the genome. However, those techniques with high resolution are expensive and prohibitive for the scenario of emerging economies such as Brazil. Targeted techniques are more feasible for countries with limited resources. It is more logical and cheaper to have a clinical suspicion and then indicate a specific diagnostic test than performing a scan of the entire human genome in search of an abnormality. In this context, clinical assessment by a physician and phenotype determination are critical. Microdeletion/microduplication syndromes are caused by submicroscopic copy number variants of a particular region of the genome and are a common cause of congenital anomalies, developmental delay/cognitive deficit and neuropsychiatric disorders. The present study aims to evaluate the phenotype contribution in the identification and diagnosis of patients with microdeletion/microduplication syndromes in Minas Gerais/Brazil, thus allowing to use targeted technologies that are cheaper and more appropriate to Brazilian reality. Between 2005 and 2012, 3,239 patients were evaluated for the first time at Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da UFMG. Of these, 205 (6.3%) had suggestive clinical features of one of the microdeletion/microduplication syndromes included in this survey. A total of 150 patients formed the group to be studied (loss rate of 26.8%). Of these,

37 were positive for one of the syndromes, giving an overall diagnostic yield of 24.7%. We used a new, fast, reliable and low cost method for detection of microdeletion and microduplication syndromes in humans, called Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (MQF-PCR). The best results were obtained with Williams syndrome (diagnostic yield of 63.6%), Prader-Willi syndrome (diagnostic yield of 41.7%), Angelman syndrome (20%) and Velocardiofacial syndrome (12.9%). The approach used in this research (phenotype associated with a targeted test) proved to be suitable for Brazil, especially for patients with the above syndromes. These are diseases in which phenotype was a useful tool for the diagnosis.

Keywords: Phenotype, Williams Syndrome, Velocardiofacial Syndrome, Prader-Willi Syndrome, Angelman Syndrome, PCR, Diagnosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Academia Americana de Pediatria
aCGH	Hibridação Genômica Comparativa em Microarranjos
ADHD	Distúrbio de Déficit de Atenção e Hiperatividade
ASD	Defeito de septo atrial
BMI	Índice de Massa Corporal
cDNA	Ácido Dexosirribonucleico complementar
CGH	Hibridação Genômica Comparativa
Del Xp22.3	Síndrome de Deleção Xp22.3
DNA	Ácido Dexosirribonucleico
<i>ELN</i>	Gene Elastina
FISH	Hibridação In Situ Fluorescente
Kb	Kilobases
KTCN	Ceratocone
LCR	Sequências pequenas de repetições de bases cromossômicas
LE	Olho esquerdo
<i>LIMK1</i>	Gene Domínio LIM da quinase 1
Mb	Megabases
MBE	Medicina Baseada em Evidências
MLPA	Amplificação de sondas dependente de ligações múltiplas
MQF-PCR	Reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa para microduplicações/microdeleções
MRI	Imagem por meio de Ressonância Nuclear Magnética
NF1	Neurofibromatose tipo 1

OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OU	Oculus uterque
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPAS	Estenose periféria de artéria pulmonar
PWACR	Região crítica de Prader-Willi/Angelman
qPCR	PCR quantitativa
RE	Olho direito
SA	Síndrome de Angelman
SMM	Síndromes de microdeleções/microduplicações
SPW	Síndrome de Prader-Willi
SUS	Sistema Único de Saúde
SVAS	Estenose aórtica supravalvar
TGF β	Fator transformador de crescimento
TF	Tetralogia de Fallot
VCF2	Síndrome Velocardiofacial tipo 2
VCFS	Síndrome Velocardiofacial
VSD	Defeito de septo ventricular
WAGR	Síndrome de Aniridia-Tumor de Wilms
WBSCR	Região cromossômica da síndrome de Williams-Beuren

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Síndromes de microdeleções/microduplicações incluídas na pesquisa _____ 39

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes de acordo com a suspeita diagnóstica, número de resultados positivos e rendimento da abordagem diagnóstica global e para cada doença ____ 44

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática da recombinação homóloga não alélica por eventos inter e intracromossômicos _____ 32

Figura 2 - Representação esquemática de fatores genéticos modificadores do fenótipo ____ 35

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
1 Introdução	17
2 Os testes diagnósticos em Genética Médica	20
2.1 Aspecto histórico dos testes diagnósticos em Genética Médica	20
2.2 Aspectos positivos e negativos dos testes diagnósticos em Genética Médica	23
2.3 Aspectos econômicos e de custo-benefício dos testes diagnósticos em Genética Médica: justificativa para exames adequados à realidade brasileira	25
3 O que é o fenótipo? Qual é a sua importância na prática clínica? Que dificuldades e facilidades traz ao médico geneticista?	28
4 As síndromes de microdeleções/microduplicações	31
4.1 O fenótipo nas síndromes de microdeleções	33
5 Objetivos	37
5.1 Objetivo geral	37

5.2 Objetivos específicos	37
6 Metodologia	38
6.1 Síndromes de microdeleções/microduplicações estudadas	38
6.2 Criação do banco de dados e constituição da população estudada	39
6.3 Dados da história e do exame físico	41
6.4 Coleta de material para obtenção de DNA	41
6.5 Testes moleculares	41
6.6 Análise estatística	42
7 Resultados	43
7.1 <i>Phenotype of Williams-Beuren syndrome in Brazilian patients: comments on the article by Patil et al. (2012) and discussion of variable phenotypes in distinct populations (artigo publicado na revista American Journal of Medical Genetics – Part A)</i>	46
7.2 <i>A new case of keratoconus associated with Williams-Beuren syndrome (artigo publicado online na revista Ophthalmic Genetics)</i>	49
7.3 <i>Phenotype as a tool for diagnosing Williams-Beuren Syndrome using a low cost methodology (em preparação para envio à revista European Journal of Medical Genetics)</i>	54
7.4 <i>Ocular features in 16 Brazilian patients with Williams-Beuren Syndrome (artigo publicado online na revista Ophthalmic Genetics)</i>	74
7.5 <i>Using phenotype to indicate a low cost diagnostic test for Velocardiofacial Syndrome in Brazilian Patients (em preparação para envio à revista Journal of Community Genetics)</i>	80

7.6 Papel do fenótipo no diagnóstico das síndromes de Prader-Willi e Angelman determinadas por microdeleções, utilizando metodologia custo-efetiva em economias emergentes (em preparação para envio à revista Cadernos de Saúde Pública)	95
8 Discussão	107
9 Conclusões	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXO A – Protocolo para coleta de dados	122

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2% a 3% das gestações resultam no nascimento de uma criança com algum tipo de anomalia congênita e aproximadamente 5% das crianças apresentará alguma doença genética que comprometerá seu desenvolvimento e qualidade de vida (OMS, 2000). A deficiência intelectual e o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor são as principais causas de comprometimento posterior ao nascimento.

Reserva-se o termo “deficiência intelectual” a crianças com idade superior a 5 anos, enquanto utiliza-se “atraso do desenvolvimento” para crianças mais novas (tipicamente até 5 anos). O atraso do desenvolvimento é um distúrbio em uma ou mais áreas do desenvolvimento, com limitações ou atraso na aquisição de habilidades que podem ser diretamente observadas e medidas no contexto de seu progresso natural. Tais áreas ou domínios do desenvolvimento incluem: aspecto motor (grosso e fino), fala e linguagem, cognição, pessoal/social e atividades da vida diária (Shevell, 2008).

Define-se a deficiência intelectual como uma inaptidão duradoura caracterizada por um prejuízo nas habilidades mentais e adaptativas. A Associação Americana em Déficits Intelectuais e do Desenvolvimento a caracteriza como:

[...] uma substancial redução na atividade do indivíduo, caracterizada por um funcionamento intelectual significativamente abaixo da média, coexistente com uma limitação em duas ou mais das seguintes áreas: comunicação, cuidados pessoais, atividades cotidianas, atividades sociais, vida comunitária, auto-controle, saúde e segurança, atividades acadêmicas, de lazer e de trabalho. (Shalock et al., 2010).

A Genética Médica e os médicos geneticistas são especializados nas doenças que cursam com malformações congênitas, atraso do desenvolvimento e déficit cognitivo, as quais podem ser individualmente raras, mas que, em conjunto, afetam um número considerável de

indivíduos e famílias. Estima-se, no Brasil, mais de quatro milhões de afetados e um excesso de 100.000 novos casos por ano (Pena, 2005; Pena, 2008).

O geneticista é o profissional responsável pelo diagnóstico clínico; solicitação de testes laboratoriais específicos (quando disponíveis); coordenação de todas as especialidades que acompanham o paciente visando um cuidado integral e eficiente; e, de forma mais importante, é o médico indicado para a realização do aconselhamento genético.

O aconselhamento genético é definido pela *American Society of Human Genetics* (Epstein, 1975) como o processo de comunicação que lida com problemas humanos associados com a ocorrência, ou risco de ocorrência, de uma doença genética em uma família. Envolve a participação de uma ou mais pessoas treinadas para ajudar o indivíduo ou sua família a: 1) compreender os fatos médicos, incluindo o diagnóstico, provável curso da doença e as condutas disponíveis; 2) apreciar o modo como a hereditariedade contribui para a doença e o risco de recorrência para parentes específicos; 3) entender as alternativas para lidar com o risco de recorrência; 4) escolher o curso de ação que pareça apropriado em virtude do seu risco, objetivos familiares, padrões éticos e religiosos, atuando de acordo com essa decisão; 5) ajustar-se, da melhor maneira possível, à situação imposta pela ocorrência do distúrbio na família, bem como à perspectiva de recorrência da doença.

O diagnóstico preciso é parte importante da abordagem genética, uma vez que é indispensável para instituir um tratamento específico (quando disponível), estabelecer um prognóstico clínico e de qualidade de vida, orientando os pais quanto à evolução da doença e eventuais complicações e, finalmente, definir um prognóstico reprodutivo para a família, com base no risco de recorrência em gestações futuras do casal. Ou seja, para a realização de adequado aconselhamento genético.

Infelizmente, em 40 a 60% dos casos não é possível firmar um diagnóstico etiológico em casos de deficiência intelectual/atraso do desenvolvimento neuropsicomotor com ou sem malformações congênitas associadas (Battaglia et al., 1999). Como afirmado por Baraitser e Winter (1996):

[...] Muitas das doenças vistas por dismorfologistas clínicos são simplesmente não diagnosticáveis. A maioria dos serviços diagnósticos cerca de 40% dos pacientes atendidos. É sempre tentador colocar o paciente dentro de uma categoria diagnóstica, mas deve-se resistir. Mesmo os dismorfologistas mais experientes têm que se esforçar para fazer um diagnóstico na maior parte dos pacientes [...].

Nas situações em que o diagnóstico é possível, os exames complementares são aliados da experiência clínica do geneticista. Felizmente, os testes diagnósticos em Genética Médica evoluíram muito desde o início da sua implementação na prática clínica.

2 Os testes diagnósticos em Genética Médica

2.1 Aspecto histórico dos testes diagnósticos em Genética Médica

A história de exames complementares auxiliando o diagnóstico em Genética Médica teve início na década de 1950. Em 1952, Hsu descobriu uma preparação de solução hipotônica que, quando colocada junto a *pellets* nucleares, fazia os cromossomos se espalharem à medida que o núcleo celular se edemaciava (Hsu, 1952). Em 1956, Tjio e Levan observaram que células humanas normais continham 46 cromossomos (Tjio e Levan, 1956). Entre 1959 e 1960, várias descobertas foram feitas relacionando alterações cromossômicas numéricas e fenótipos específicos: Lejeune et al. (1959) descobriram que a Síndrome de Down era causada pela trissomia do cromossomo 21; Patau et al. (1960) e Edwards et al. (1960) reconheceram que trissomias do 13 e do 18 eram responsáveis pelos fenótipos que levam seus nomes, respectivamente.

Em 1970, Caspersson iniciou a era de bandeamento cromossômico ao observar que Quinacrina causava a exibição de bandas claras e escuras ao longo de todos os cromossomos (Caspersson et al., 1970). Em 1976, Yunis descreveu um aperfeiçoamento da técnica com visualização de um número maior de bandas (cariótipo de alta resolução), o que permitiu a detecção de anomalias cada vez mais sutis no genoma humana e que puderam ser ligadas a fenótipos específicos (Yunis, 1976).

A partir de então, em menos de 40 anos, as técnicas de citogenética e, de forma mais ampla, as de diagnóstico em Genética Médica têm evoluído constantemente e de maneira cada vez mais acelerada. Tanto que o Projeto Genoma Humano, iniciado em 1990 e concluído em 2000, permitiu que a sequência completa de todos os 3 bilhões de pares de base do genoma humano estivesse disponível para a comunidade científica, usando maciçamente a técnica de sequenciamento automatizado (Sanger et al., 1977; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

A primeira grande descoberta que impulsionou a pesquisa molecular sobre o material genético foi o reconhecimento de que o DNA poderia ser estudado a partir de pequenos

fragmentos. Tal descoberta ocorreu na década de 1970 e corresponde ao uso das endonucleases de restrição bacterianas (ou enzimas de restrição), que reconhecem sequências específicas de DNA e realizam a clivagem das ligações fosfodiéster na dupla-hélice no local deste reconhecimento (Nussbaum, 2007). Tal clivagem dá origem a pequenos fragmentos de DNA que podem ser usados para a clonagem em microrganismos, construção de bibliotecas genômicas e de DNA complementar (cDNA) e, finalmente, para o desenvolvimento de sondas de DNA (Nussbaum, 2007).

As sondas são pequenos fragmentos de DNA marcados com material radioativo ou corante fluorescente que se liga por hibridação a filamentos complementares em uma região de interesse do genoma, dando origem a uma dupla hélice estável e detectável. Tais sondas foram fundamentais em estudos de associação realizados na década de 1980 e permitiram identificar a localização de diversos genes causadores de doenças Mendelianas em famílias afetadas, como Fibrose Cística e Doença de Huntington, bem como fornecer informação sobre sequências de DNA ao longo de cada cromossomo (Gilliam et al., 1987; Spence et al., 1987).

Posteriormente, passou-se a tentar isolar sequências de DNA por meio da técnica de *Southern blotting*. Nesta técnica, o DNA genômico é submetido a enzimas de restrição e os vários fragmentos gerados são separados de acordo com seu peso molecular por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos já separados são desnaturados e transferidos do gel para papel filtro por meio de capilaridade e incubados com sondas marcadas. O filme com sondas marcadas, após exposição a radiação, é capaz de mostrar aquelas mutações com efeito considerável sobre o tamanho de um fragmento, tais como grandes deleções e inserções (Southern, 1975).

Assim como as sondas de hibridação de ácidos nucléicos são usadas para identificar fragmentos de DNA na análise pelo *Southern blotting*, os citogeneticistas são capazes de hibridizar sondas marcadas aos cromossomos imobilizados em lâminas de microscopia para visibilizar alterações cromossômicas, o que deu origem à técnica de Hibridação *In Situ* Fluorescente - FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization* (Speicher e Carter, 2005).

Historicamente, FISH foi a primeira técnica molecular a ser amplamente utilizada em laboratórios de citogenética ao redor do mundo (Trask, 1991). Neste método, sondas fluorescentes de DNA são hibridizadas aos cromossomos em metáfase e permitem detectar a presença, o número e a localização de pequenas regiões cromossômicas ou submicroscópicas (Vermeesch et al., 2007).

Após o FISH, foi desenvolvida a cariotipagem multicolorida baseada no FISH ou cariotipagem espectral, a qual permite a detecção simultânea de todos os cromossomos através de sondas de DNA que emitem fluorescências de cores distintas para cada cromossomo (Speicher et al., 1996).

No final da década de 1980, um método alternativo à clonagem para gerar uma quantidade essencialmente ilimitada de uma determinada sequência de interesse do DNA revolucionou tanto o diagnóstico molecular como a análise molecular de uma doença genética específica. É a chamada Reação em Cadeia da Polimerase - PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Saiki et al., 1985; Mullis e Faloona, 1987; Ehrlich et al., 1988, Saiki et al., 1988; Schochetman et al., 1988). Por meio desta técnica, é possível amplificar seletivamente uma única molécula de DNA diversas bilhões de vezes em poucas horas, usando como base o conhecimento da replicação de DNA na célula humana.

A PCR também pode ser usada como uma técnica quantitativa para medir a quantidade de uma determinada sequência de DNA em dada amostra em comparação com uma amostra controle. É a PCR quantitativa - qPCR, do inglês *quantitative PCR* (Svånem et al., 1988). A base para este método é que, em uma reação de PCR, o número de moléculas da região do DNA sendo amplificada duplica a cada ciclo. Logo, se a quantidade de material sintetizado for delineada no começo da reação, o número de ciclos necessários para atingir um limiar arbitrário é uma medida da quantidade de molde que estava presente no início da PCR. Assim, quanto menos ciclos necessários para atingir um determinado limiar, mais moldes estavam presentes do início da reação (Svånem et al., 1988).

Mais recentemente, a técnica denominada *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) foi desenvolvida e é baseada em um método de *multiplex PCR* direcionado a sequências-alvo. Somente os *primers* que hibridizam com as sequências-alvo são amplificados e os produtos resultantes podem ser analisados por meio de eletroforese capilar. O resultado do exame é conseguido ao se comparar o padrão de picos obtidos na reação e aqueles de amostras de referência, indicando quais sequências mostram número de cópias alterado (Weise et al., 2012). MLPA permite a detecção de variações no número de cópias genômicas de até 50 sequências diferentes ao mesmo tempo e vários *kits* para detecção de síndromes de microdeleções/microduplicações estão disponíveis comercialmente (Jehee et al., 2011).

Em 1992, foi introduzido um método de detecção de variação em número de cópias de DNA em todo o genoma, denominado Hibridação Genômica Comparativa - CGH, do inglês *comparative genome hybridization* (Kallioniemi et al., 1992), que logo após (em 1997/1998) foi suplantada pela adição de sequências de DNA colocadas em placas de vidro como os alvos da hibridação, o que deu origem à Hibridação Genômica Comparativa em Microarranjos - aCGH, do inglês *array-CGH* (Pinkel et al., 1998).

2.2 Aspectos positivos e negativos dos testes diagnósticos em Genética Médica

Cada técnica supracitada foi sendo desenvolvida de forma a resolver problemas ou entraves que as técnicas precedentes demonstravam na prática clínica. Sendo assim, como o cariótipo convencional, que distingue cerca de 400 bandas cromossômicas (ou 5 a 10 Megabases - Mb), apresentava deficiências inerentes ao método (tais como baixa resolução, consumo excessivo de tempo com cultura de células e análise microscópica, além de necessitar de citogeneticista experiente) e permitia detectar anomalias de número ou de estrutura em apenas 3-4% dos casos de deficiência intelectual e autismo (Bejjani e Shaffer, 2008), foi desenvolvida a técnica de FISH. Mesmo o cariótipo de alta resolução, que teoricamente pode conseguir preparações com até 1.000 bandas (Yunis, 1981) às custas de tempo, trabalho e custo excessivos, não foi suficiente para resolver os problemas que se mostravam e fez com que o FISH se tornasse método importante na Genética Clínica. Quanto ao FISH, a técnica é capaz de detectar alterações submicroscópicas (menores que 5 Mb) em 6,8% dos pacientes com déficit cognitivo ou atraso do desenvolvimentos submetidos a *screening* por este método, mas também depende de preparações celulares e profissionais treinados que custam tempo e dinheiro (Shevell et al., 2003).

A técnica de *Southern blotting* também é considerada trabalhosa, demorada, exige exposição a radiação e sua resolução (entre 10 a 40Kb) é ainda baixa (Bejjani e Shaffer, 2008). Já a cariotipagem espectral tem na limitação de fluorocromos com cores facilmente distinguíveis seu principal ponto negativo. O CGH foi rapidamente substituído pelo aCGH em função de sua parca resolução, em torno de 10Mb (Shaffer, 2005).

O aCGH é a técnica mais discutida e estudada atualmente, uma vez que permite análises com alta resolução, diagnosticando uma infinidade de alterações não-balanceadas (Shaffer et al., 2007; Shaffer e Bejjani, 2006). A resolução do aCGH é limitada somente pelo tamanho do inserto usado e a distância entre os clones (Bejjani e Shaffer, 2008). De fato, o estudo de pacientes com deficiência intelectual ou autismo, com ou sem malformações, usando aCGH mostra microdeleções em 10 a 15% dos casos, incluindo 5% de deleções especificamente em regiões subtelo méricas (Kriek et al., 2004; Lu et al., 2007; Slavotinek, 2008; Stankievicz e Beaudet, 2007).

Entretanto, há ainda discussões acerca deste método. Uma das mais importantes é que ainda não estão bem estabelecidas as relações entre genótipo e fenótipo. Não se sabe quais alterações são patológicas e quais não têm significado clínico. Vermeesch et al. (2007) relataram que, até a publicação de seu artigo, em todas as séries de pacientes analisadas existia um certo número de casos nos quais a alteração cromossômica não podia ser ligada a um significado clínico. Isso mostra a dificuldade em se interpretar alterações como causadoras de um determinado fenótipo e, conseqüentemente, transmitir um diagnóstico e realizar aconselhamento genético do paciente e sua família.

Outro alvo importante de discussão é quanto ao custo-benefício do aCGH, uma vez que se trata de método novo, de última geração e dispendioso, especialmente quando se leva em consideração países em desenvolvimento e o âmbito do sistema público de saúde.

Já técnicas que levam em consideração sequências-alvo, como qPCR e MLPA, têm no fato de dependerem de suspeita clínica e identificarem somente um *locus* ou um número limitado de *loci* sua maior crítica (Weise et al., 2012).

Nesse contexto, em que exames cada vez mais minuciosos e com maior resolução são desenvolvidos quase diariamente em todo o mundo, é preciso questionar qual a importância desses testes e como eles devem ser usados na prática clínica.

2.3 Aspectos econômicos e de custo-benefício dos testes diagnósticos em Genética Médica: justificativa para exames adequados à realidade brasileira

Genética Clínica com acesso a técnicas laboratoriais que permitam o diagnóstico do maior número possível de pacientes é o objetivo de qualquer serviço médico que prime pela excelência.

A identificação de uma criança com deficiência intelectual ou com uma síndrome genética é sempre um evento dramático para a família. A tarefa do médico não é fácil, pois ele tem de lidar com a família e seus sentimentos de culpa, negação e raiva, o enlutamento pela perda do filho esperado, o estigma da doença e o medo de recorrência em gestações futuras (Petean e de Pina Neto, 1998). A preocupação primordial do médico perante a criança com deficiência intelectual, malformações congênitas ou atraso do desenvolvimento neuropsicomotor deve, então, ser o diagnóstico preciso, indispensável para o aconselhamento genético. Além disso, o estabelecimento de uma causa para a deficiência daquele filho permite melhor aceitação da doença e alívio emocional significativo a longo prazo para os pais (Lenhard et al., 2005).

O Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG) atende pelo Sistema Único de Saúde (SUS) há mais de 25 anos e, além de adquirir *expertise* no atendimento de doenças genéticas, vem diversificando suas atividades, abrangendo um leque cada vez maior de áreas atendidas. No entanto, conta apenas com o recurso da citogenética como propedêutica complementar.

Grande número de pacientes com deficiência intelectual e/ou malformações, com forte suspeita diagnóstica clínica ou com diagnósticos clínicos ainda duvidosos, não pode contar com recursos diagnósticos de certeza, os quais já estão disponíveis para muitas doenças. Tal fato obriga o serviço a manter, em graus variados, um estado de dúvida que impõe aos pacientes e suas famílias incerteza em relação aos prognósticos clínicos e genéticos. Dentre os pacientes que permanecem sem diagnóstico sindrômico, muitos são suspeitos de apresentarem síndromes de microdeleções e aguardam a disponibilidade de exames moleculares no SUS para que o diagnóstico seja finalmente confirmado, permitindo planejamentos terapêuticos e reprodutivos mais seguros. A possibilidade do diagnóstico de número relativamente pequeno de doenças frequentes resultaria em grande número de beneficiados e em melhora

significativa na qualidade do atendimento. Mas qual seria o método, dentre todos os disponíveis, mais adequado para implementação no SUS?

Nos Estados Unidos e Europa, o método inicial para o diagnóstico genético em pacientes com déficit cognitivo e/ou malformações congênitas e/ou atraso no desenvolvimento é o aCGH (Flore e Milunsky, 2012), uma técnica muito dispendiosa (que varia entre R\$2.600,00 e R\$ 8.000,00 por exame, de acordo com levantamento realizado em Junho de 2013 em laboratórios particulares brasileiros), o que impede a sua ampla adoção como técnica de escolha na investigação da deficiência intelectual no Brasil. Levando-se em conta a elevada prevalência da deficiência intelectual, seria inviável estabelecer este método como padrão, especialmente dentro do orçamento do SUS. Mesmo técnicas mais baratas, como o MLPA, custam algo em torno de R\$600,00-R\$1.000,00 (levantamento realizado em Junho de 2013 em laboratórios particulares brasileiros) e ainda são muito dispendiosas para o cenário do SUS. A técnica que mais se adequa às necessidades do sistema público de saúde brasileiro parece ser a de PCR, por ser extremamente sensível, mais rápida, mais barata e requerer menores quantidades de amostras que quaisquer outros métodos de análise de ácidos nucleicos (Nussbaum, 2007). Atualmente, uma reação de PCR para diagnóstico tem um custo entre R\$300,00 e R\$600,00 (levantamento realizado em Junho de 2013 em laboratórios particulares brasileiros).

Diante deste quadro, o que fazer? Devemos tentar copiar a tecnologia importada de alto custo ou devemos tentar desenvolver soluções próprias? Como escreveu Pena (2009):

[...] O Brasil está em uma encruzilhada neste início de século 21. Sabe muito bem que o domínio da informação tecnológica é o principal critério competitivo na sociedade mundial. Mas como obter essa tecnologia? Continuar, como fez no passado, a transplantar para cá técnicas e processos americanos e europeus caros, mal adaptados à nossa civilização tropical e muitas vezes defasados? Ou inovar com tecnologia original, própria, endógena? [...]. A solução é devorar e metabolizar o conhecimento científico estrangeiro para criar tecnologias próprias e novas nos trópicos. [...] Vamos prestigiar e priorizar a tecnologia brasileira, feita em casa. Criemos aqui o que verdadeiramente precisamos [...].

Uma solução viável seria, então, o desenvolvimento de uma técnica mais barata, porém ainda sensível e confiável, que permitisse o diagnóstico molecular em serviços públicos de saúde no Brasil.

De forma geral, os métodos diagnósticos em Genética podem, basicamente, ser divididos em duas categorias: aqueles direcionados a todo o genoma (diagnóstico amplo) e os que são voltados a uma região específica do DNA (diagnóstico com alvo ou *targeted*).

Técnicas amplas, tais como cariótipo, sequenciamento e aCGH, são vantajosas ao permitir uma avaliação completa do genoma. Entretanto, se por um lado não diagnosticam pequenas alterações (devido à baixa resolução como no caso do cariótipo), por outro, detectam alterações em alta resolução, mas que, por vezes, não podem ser relacionadas ao fenótipo clínico (como sequenciamento e o aCGH). Além disso, como já colocado, as técnicas com resolução alta são caras e proibitivas para o cenário de países em desenvolvimento, como o Brasil.

Já as técnicas com alvo ou *targeted* (como *Southern blotting*, FISH, PCR, MLPA) são criticadas, principalmente por autores estrangeiros, por dependerem de uma suspeita clínica específica (Shaffer, 2005; Vermeesch et al., 2007; Bejjani e Shaffer, 2008). Entretanto, em países com poucos recursos, o diagnóstico com alvo específico é mais viável, especialmente no sistema público. É mais lógico e barato ter uma suspeita clínica e indicar um teste diagnóstico específico que realizar uma varredura de todo o genoma humano em busca de alguma alteração. Nesse contexto, os papéis da avaliação clínica, do médico e do fenótipo são fundamentais. O conhecimento sobre o fenótipo dos pacientes é de extrema importância, uma vez que indicará a suspeita diagnóstica, o teste genético apropriado e o tratamento mais adequado àquele doente e sua família.

3 O que é o fenótipo? Qual é a sua importância na prática clínica? Que dificuldades e facilidades traz ao médico geneticista?

O fenótipo é classicamente definido como “as características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas observadas em um indivíduo, determinadas por seu genótipo e o ambiente em que se expressa” (Nussbaum, 2007, p. 472). A partir de tal conceito, é possível perceber quantas variáveis atuam na determinação do fenótipo de um paciente. Não são somente características morfológicas, mas também variáveis bioquímicas, alterações comportamentais, alterações cognitivas, entre outras. E todos os pontos devem ser levados em consideração no processo de tentativa de elucidação diagnóstica em um determinado indivíduo.

A influência ambiental no fenótipo é uma das características mais difíceis de avaliar em um paciente, pois existe uma interação complexa entre ambiente e componente genético. Assim sendo, são várias as indagações que o geneticista enfrenta diante de seu paciente. O déficit cognitivo é resultante somente da alteração genética ou a falta de estímulo familiar agravou o quadro? Essa falta de estímulo é somente por deficiência de conhecimento ou cultural ou existe um componente genético determinando também um déficit cognitivo nos pais da criança? Ou ainda: o ganho pômbero-estatural diminuído em determinada criança com uma síndrome de baixa estatura é determinado apenas geneticamente ou as condições sócio-econômicas precárias naquela família exercem papel preponderante?

Pode-se pensar que o genótipo seja o fator que menos varia quando se avalia um fenótipo, isto é, que um determinado genótipo é o único responsável por certo fenótipo. Entretanto, o conceito “um gene, uma doença” não mais explica algumas situações encontradas na Genética Clínica.

As heterogeneidades genética, alélica e de *locus* são capazes de complicar a relação genótipo-fenótipo. A heterogeneidade genética significa a produção de fenótipos iguais ou similares por mecanismos genéticos diferentes (Nussbaum, 2007). Fenótipos idênticos ou similares também podem ser causados por diferentes alelos mutantes em determinado *locus*, o que caracteriza a heterogeneidade alélica (Nussbaum, 2007). Já a heterogeneidade de *locus* é definida como a produção de fenótipos idênticos devido a mutações em dois ou mais *loci*

diferentes (Nussbaum, 2007). Existe ainda a heterogeneidade clínica, termo que descreve a ocorrência de fenótipos clinicamente diferentes devido à mesma mutação em um único gene (Nussbaum, 2007).

O fenótipo *per se* é variável. É possível haver expressividade variável, ou seja, determinada característica pode variar de leve a intensa em indivíduos que possuam o mesmo genótipo (Nussbaum, 2007). Também a penetrância, que é o parâmetro estatístico que indica a proporção de indivíduos com uma mutação que apresenta qualquer nível de expressão fenotípica, atua na variabilidade do fenótipo (Young, 2005). O fato é que a determinação do fenótipo é complexa. E o reconhecimento de um fenótipo e sua associação com determinada causa genética é também complexa e laboriosa para o médico geneticista.

Existem alguns fenótipos mais facilmente reconhecíveis, geralmente associados a anomalias cromossômicas numéricas. A síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) apresenta, provalvemente, o fenótipo com identificação mais simples na prática clínica, em parte devido ao grande conhecimento acumulado ao longo dos anos, já que é a causa mais comum de deficiência intelectual causada por anomalia cromossômica e tem uma incidência de 1 a cada 650-1.000 nascidos vivos (Hook, 1981).

Também as síndromes de Patau e Edwards (trissomias dos cromossomos 13 e 18, respectivamente) são doenças genéticas com fenótipos marcantes quando o paciente apresenta as grandes malformações que compõem o quadro clínico de cada uma delas. A síndrome de Patau, tipicamente, inclui malformações cerebrais (holoprosencefalia), defeitos de olhos, nariz e lábios, malformações cardíacas e genitais (Baty et al., 1994; Jones, 2006). A síndrome de Edwards, por sua vez, é classicamente caracterizada por crescimento intrauterino restrito, mãos cerradas com sobreposição do primeiro dedo sobre o terceiro e do quinto sobre o quarto e malformações cardíacas (Baty et al., 1994).

Outra anomalia cromossômica numérica frequente é a síndrome de Turner (ou monossomia X), que é classicamente caracterizada por baixa estatura, dismorfismos faciais típicos, linfedema e disgenesia gonadal. Entretanto, esta é uma doença em que o fenótipo é variável, já que a apresentação clínica pode não exceder a baixa estatura (Davenport, 2010).

Outras doenças genéticas que cursam com alterações fenotípicas mais discretas são as anomalias cromossômicas estruturais, as quais são causadas por pequenas deleções, duplicações, adições ou translocações não balanceadas e não por variação no número de cromossomos do indivíduo (trissomias e monossomias). É o caso das síndromes de Cri Du

Chat e de Wolf-Hirschhorn, causadas, respectivamente, por deleção nos braços curtos dos cromossomos 5 e 4 (também chamadas síndromes 5p- e 4p-). Muito da dificuldade de reconhecimento do fenótipo nessas síndromes e da variabilidade fenotípica está relacionada ao tamanho da alteração cromossômica. Na síndrome de Cri Du Chat, a deleção pode ser tão pequena que envolva apenas uma banda (usualmente, 5p15.2) até a deleção de todo o braço curto (OMIM).

Mesmo com o emaranhado de fatores que se misturam para determinar o fenótipo, ainda é possível utilizá-lo como apoio para o diagnóstico de síndromes genéticas. Portanto, o diagnóstico em Genética Médica pode e deve ser baseado em suspeita clínica firmada a partir dos dados oferecidos pelo fenótipo. O diagnóstico não é um processo de tentativa e erro e, sim, um processo que depende da qualidade e do raciocínio médico.

Como exposto, o fenótipo é mais eficaz como ferramenta diagnóstica naquelas doenças em que padrões de dismorfismos, malformações e alterações comportamentais se agregam formando um quadro mais nítido. É importante que se tenha em mente em quais síndromes o fenótipo pode ser utilizado com maior segurança para definição da suspeita diagnóstica.

Na classe das síndromes de microdeleções/microduplicações (SMM), decorrentes de alterações cromossômicas estruturais e que cursam com apresentações clínicas variadas, é provável que o fenótipo seja ferramenta mais proveitosa em algumas síndromes e menos em outras. Sendo assim, a determinação de em quais doenças o fenótipo é mais eficaz para firmar uma hipótese diagnóstica e, conseqüentemente, para indicação de confirmação laboratorial é útil na prática clínica.

4 As síndromes de microdeleções/microduplicações

As síndromes de microdeleções/microduplicações cromossômicas são causadas por variações submicroscópicas no número de cópias de determinada região do genoma e são uma causa comum de anomalias congênitas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/déficit cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos (Deak et al., 2011). São exemplos de SMM: Velocardiofacial (deleção 22q11.2), Williams-Beuren (deleção 7q13), Prader-Willi e Angelman (deleção 15q11-q13), Síndrome de Duplicação *MECP2* (em Xq28) e Síndrome de Duplicação 1q21.1, entre outras. Tais doenças são recorrentes na população devido a características inerentes à organização do genoma humano (Deak et al., 2011).

Inúmeros elementos repetitivos presentes no genoma, levando a uma instabilidade do genoma humano, são substrato para recombinações intra e intercromossômicas durante a meiose e a mitose. Tal instabilidade não causa somente doenças, como as SMM, mas é também responsável por grande impacto na evolução e flexibilidade do genoma, já que propiciou (e ainda propicia) ganho de novas funções gênicas ao longo do desenvolvimento humano (Marques-Bonet e Eichler, 2009; Gazave et al., 2011).

Aproximadamente 5% do genoma humano é formado por blocos de sequências repetitivas, com tamanho maior que 1 kilobase (Kb) e que compartilham homologia de aproximadamente 90% com outras sequências do genoma. Quando esses blocos repetitivos flanqueiam uma região de sequência única pode ocorrer a recombinação homóloga não alélica (Stankiewicz and Lupski, 2002), que pode ser responsável por deleção, duplicação ou inversão daquela sequência única (Figura 1). Esse é o mecanismo primordial do rearranjo cromossômico nas SMM e os blocos repetitivos, nesse caso, são chamados sequências pequenas de repetições de bases cromossômicas - LCR, do inglês *Low Copy Repeat* (Deak et al., 2011).

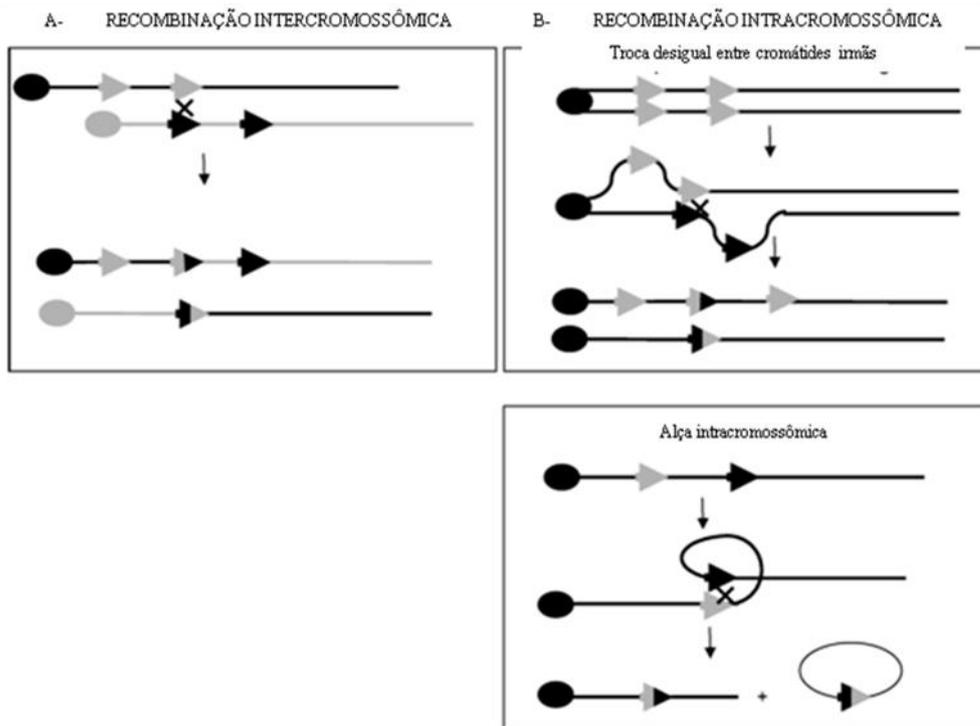


Figura 1- Representação esquemática da recombinação homóloga não alélica por eventos inter e intracromossômicos. As linhas pretas e cinzas representam os cromossomos homólogos. As setas representam LCRs. As diferentes tonalidades das LCRs são utilizadas para indicar a posição do *crossing-over*. X representa o local do *crossing-over*. Em A, é possível observar recombinação de LCRs entre dois cromossomos diferentes; e, em B, entre duas cromátides-irmãs ou em um único cromossomo. Modificado de Devriendt e Vermeesch (2004).

De acordo com o mecanismo descrito de rearranjo intra e intercromossômico dando origem às SMM, poder-se-ia esperar a mesma frequência de síndromes de microdeleção e de síndromes de microduplicação. Entretanto, somente um pequeno número de microduplicações já foi descrito (Devriendt e Vermeesch, 2004), tais como as síndromes de duplicação *MECP2* (duplicação em Xq28), duplicação 1q21.1 e duplicação 15q13.3 (Deak et al., 2011). Uma possibilidade para explicar esse quadro seria que as síndromes de microduplicação são letais. Entretanto, em geral, duplicações cromossômicas causam um fenótipo menos grave que deleções (Liehr et al., 2011). Outras alternativas seriam: 1) nenhum fenótipo distinto seria causado pelas microduplicações e, portanto, os indivíduos não procurariam assistência médica especializada; 2) os indivíduos com microduplicações não seriam capazes de reprodução. Até o momento, não se sabe qual é a justificativa para a menor frequência de microduplicações em relação às microdeleções (Weise et al., 2012).

4.1 O fenótipo nas síndromes de microdeleções

As síndromes de microdeleções são capazes de fornecer *insights* interessantes sobre o fenótipo em Genética Médica. Enquanto grupo, são bastante variáveis no que diz respeito às apresentações clínicas. Entretanto, é possível determinar algumas categorias de manifestações comuns a todas elas.

A presença de malformação maior em um órgão ou sistema, tal como cardiopatia congênita, malformações cerebrais e renais, existe na maioria dessas síndromes. Anomalias cardíacas características são observadas em cada síndrome de microdeleção, tais como estenose valvar supraórtica e estenose pulmonar periférica na síndrome de Williams-Beuren e cardiopatias conotrunciais (como tetralogia de Fallot, *truncus arteriosus* e interrupção do arco aórtico) na síndrome Velocardiofacial.

Como na maioria das anomalias cromossômicas, atraso nos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor é comumente observado. E há, ainda, distúrbios de comportamento em grande parte das síndromes de microdeleção (Cassidy e Morris, 2002). O exemplo mais estudado é o da síndrome de Williams-Beuren, na qual os pacientes apresentam comportamento amigável, são ansiosos e apresentam uma discrepância entre a capacidade de aprendizagem e a habilidade comunicativa. Na síndrome de Smith-Magenis (deleção 17p11.2), é comum haver distúrbio de sono e auto-agressão (Smith et al., 1998; Clayes et al., 1997). A síndrome de Prader-Willi leva a hiperfagia, obesidade mórbida e episódios ocasionais de teimosia (Cassidy e Morris, 2002). Indivíduos com Velocardiofacial e Prader-Willi estão sob risco aumentado de doenças psiquiátricas, especialmente psicoses (Devriendt e Vermeesch, 2004).

Cada paciente com síndrome de microdeleção possui uma deleção na região crítica cujo tamanho pouco varia em comparação com os demais acometidos, o que explicaria as similaridades fenotípicas entre os indivíduos com uma mesma síndrome (Devriendt e Vermeesch, 2004). Por exemplo, a síndrome de Williams-Beuren é causada por deleção que varia entre 1,6 e 1,9 Mb, enquanto pacientes com as síndromes de Prader-Willi e Angelman possuem deleções entre 5,8 e 6 Mb (Deak et al., 2011). A relação genótipo-fenótipo foi objeto de estudo em algumas síndromes de microdeleções. Na síndrome de Williams-Beuren, uma relação genótipo-fenótipo clara somente foi obtida com o gene *ELN* codificador da elastina, o

qual está associado às alterações vasculares e de tecido conjuntivo (Merla et al., 2010). Para a síndrome Velocardiofacial, foi possível a associação entre o gene *TBX1*, um dos cerca de 30 genes deletados na região 22q11.2, e cardiopatia congênita. Nenhuma outra associação foi encontrada até o momento (McDonald-McGinn et al., 2008; Michaelovsky et al., 2012).

A prática mostra que as características clínicas são diversas e complexas em cada uma das síndromes de microdeleção. Portanto, essa grande variabilidade clínica parece não ser explicada, na maioria dos casos, pela haploinsuficiência de um ou mais genes deletados em determinada região do genoma. Sendo assim, outros fatores modificadores devem existir (Devriendt e Vermeesch, 2004). O estudo de diferenças fenotípicas em indivíduos com uma mesma síndrome de microdeleção pode ser de grande valia na identificação de fatores modificadores em fenótipos complexos (Devriendt e Vermeesch, 2004).

Os fatores modificadores mais óbvios são mutações e polimorfismos em alelos não deletados na região crítica. A apresentação mais extrema desse quadro ocorre quando uma microdeleção revela uma mutação autossômica recessiva em um alelo não deletado (Figura 2). Já os polimorfismos estão presentes na grande maioria dos genes humanos. Assim, polimorfismos em alelos não deletados são candidatos a assumir o papel de fatores modificadores. Também polimorfismos em genes localizados em qualquer lugar do genoma, não só na região deletada ou próximo a ela, podem influenciar o fenótipo nas síndromes de microdeleção (Devriendt e Vermeesch, 2004).

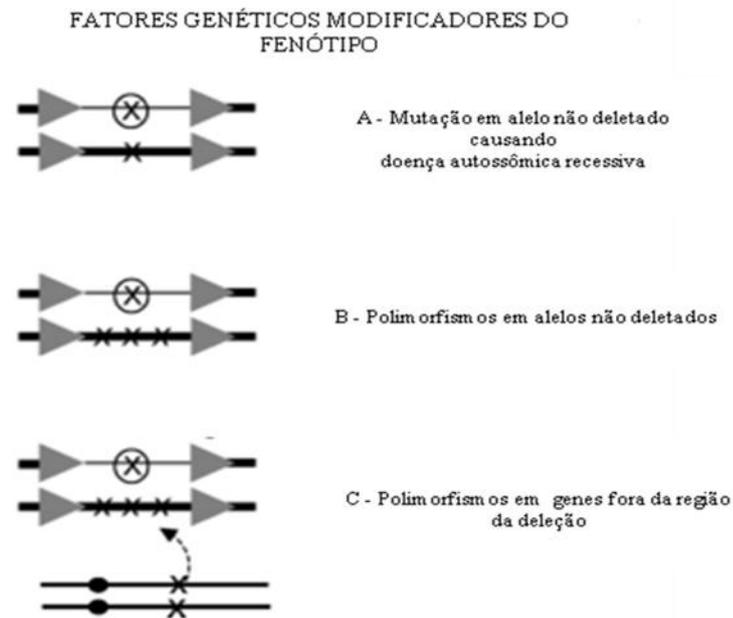


Figura 2 - Representação esquemática de fatores genéticos modificadores do fenótipo. As linhas pretas representam os cromossomos homólogos. As setas representam LCRs. O \otimes representa o local deletado. Modificado de Devriendt e Vermeesch (2004).

Outros fatores que podem também participar na variabilidade clínica das síndromes de microdeleção são efeitos epigenéticos e mutações pós-zigóticas (Devriendt e Vermeesch, 2004). O efeito epigenético é definido como modificações celulares que podem ser herdadas, mas que não se relacionam com mudanças na sequência do DNA, e que podem também sofrer alterações a partir de estímulos ambientais (Holliday, 1994; Bell e Spector, 2011). Já as mutações pós-zigóticas são todas as mutações no DNA adquiridas durante a vida após a formação do zigoto, que originam mosaicismos, e que também podem alterar a apresentação fenotípica de determinada doença (Fosberg et al., 2013).

Além dos modificadores genéticos, os fatores ambientais podem também influenciar a apresentação fenotípica. Por exemplo, indivíduos com síndrome de Prader-Willi desenvolvem obesidade mórbida, a menos que sejam colocados sob uma dieta alimentar restritiva desde jovens (Descheemaeker et al., 1994). Já foi demonstrado que a inteligência em pacientes com Velocardiofacial e Prader-Willi pode ser correlacionada com os quocientes de inteligência dos pais dos pacientes, indicando uma influência multifatorial nessas síndromes de microdeleção (Swillen et al., 1997; Malich et al., 2000).

No Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFMG, onde mais de 6.700 famílias

já foram atendidas desde a criação no serviço em 1986, inúmeros pacientes com suspeita de SMM permanecem sem confirmação diagnóstica, uma vez que somente a citogenética está disponível como propedêutica genética complementar para elucidação diagnóstica. Assim, inúmeras famílias permanecem sem certeza de um diagnóstico, o que impede a realização de adequado aconselhamento genético. Tal estado de incerteza causa ainda angústia e ansiedade aos pais e responsáveis.

O presente estudo foi, então, desenvolvido para avaliar a contribuição do fenótipo na identificação e diagnóstico de pacientes com suspeita de uma das SMM, atendidos no Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFG. A identificação desses pacientes permitiria, assim, utilizar tecnologias direcionadas a regiões específicas do genoma e, por isso, mais baratas e adequadas à realidade brasileira. A pesquisa faz parte de um projeto mais amplo, cujo objetivo foi desenvolver uma tecnologia nova e econômica para o SUS, mas dependente do fenótipo e de adequada indicação clínica, denominada *Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (MQF-PCR).

5 Objetivos

5.1 Objetivo geral

- Avaliar a contribuição do fenótipo na seleção de pacientes para a realização de MQF-PCR, uma metodologia econômica, apropriada à realidade brasileira e que permite diagnóstico definitivo de microdeleções.

5.2 Objetivos específicos

- Selecionar e analisar, dentro de uma subpopulação atendida no Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFGM (Minas Gerais, Brasil), os pacientes que apresentavam características clínicas sugestivas das SMM mais comuns;
- Testar uma nova tecnologia baseada em PCR e desenvolvida em laboratório brasileiro (MQF-PCR) nos pacientes selecionados, guiada pela suspeita clínica;
- Avaliar, dentre as síndromes testadas, as mais comuns;
- Analisar, nas síndromes mais diagnosticadas, a contribuição do fenótipo tanto para indicação do teste genético como para diagnóstico.

6 Metodologia

Este trabalho faz parte de um projeto maior denominado “Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção no SUS” (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, ETIC nº 0139.0.203.000-11, e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC/UFMG), que envolveu o Departamento de Bioquímica e Imunologia (Instituto de Ciências Biológicas, UFMG), o Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFMG e o Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais (GENE). O projeto recebeu financiamento do CNPq, a partir de aprovação no Edital MCT/CNPq/CT-SAÚDE nº 57/2010 - Genética Clínica, cujo objetivo era apoiar projetos de pesquisa científica que contribuíssem para o avanço do conhecimento e dessem subsídios para a formulação, implementação e avaliação de ações públicas voltadas a atenção em Genética Médica no SUS.

O objetivo desse projeto maior foi desenvolver e testar se uma nova metodologia poderia ser usada no SUS como uma alternativa brasileira, simples e pouco dispendiosa ao aCGH no diagnóstico de síndromes de microdeleção cromossômica.

6.1 Síndromes de microdeleções/microduplicações estudadas

Em virtude de sua maior prevalência e/ou fenótipo bem delineado, foram incluídas no presente estudo as seguintes síndromes de microdeleção: síndrome de Williams, síndrome Velocardiofacial, síndrome de Angelman, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Smith-Magenis, síndrome de Miller-Dieker, síndrome de Langer-Giedion, síndrome de Rubinstein-Taybi, síndrome de Aniridia-Tumor de Wilms, síndrome de Rett, síndrome de Deleção 1p36.3, síndrome de Deleção Xp22.3, síndrome de Saethre-Chotzen, síndrome de Neurofibromatose Tipo 1 e síndrome Velocardiofacial 2. A única síndrome de microduplicação estudada foi a de Duplicação *MECP2* (Tabela 1).

Tabela 1 – Síndromes de microdeleções/microduplicações incluídas na pesquisa.

Síndromes	Local
Síndromes de Microdeleções Mais Comuns	
Síndrome de Williams	7q11.23
Síndrome Velocardiofacial	22q11.2
Síndromes de Prader-Willi e Angelman	15q11-q13
Outras Síndromes de Microdeleções	
Síndrome de Smith-Magenis	17p11.2
Síndrome de Miller-Dieker	17p13.3
Síndrome de Langer-Giedion	8q24.1
Síndrome de Rubinstein-Taybi	16p13.3
Síndrome de Aniridia-Tumor de Wilms	11p13
Síndrome de Rett	Xq28
Síndrome de Deleção Xp22.3	Xp22.3
Síndrome de Saethre-Chotzen	7p21.1
Neurofibromatose tipo 1	17q11.2
Síndrome Velocardiofacial 2	10p13-p14
Síndrome de Microduplicações	
Duplicação <i>MECP2</i>	Xq28

6.2 Criação do banco de dados e constituição da população estudada

O Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFMG é referência no estado de Minas Gerais para atendimento de pacientes com malformações, déficit cognitivo, distúrbios de comportamento, dificuldade de aprendizagem, além de casais com história reprodutiva de abortamentos de repetição, filhos falecidos com malformações ou doenças genéticas. Desde a sua inauguração, mantém um arquivo nosológico com todos os probandos atendidos no serviço. Neste arquivo, são registrados o nome do paciente, o número de seu atendimento no serviço de Genética e a hipótese diagnóstica levantada ao término da primeira consulta. Além

disso, o serviço mantém um prontuário do paciente armazenado em seus arquivos, diferente daquele do HC/UFMG, do qual é possível extrair todas as informações, de forma clara e objetiva, relevantes para o atendimento em Genética.

Como parte inicial da pesquisa, foi avaliado o nosológico do serviço de Genética do HC/UFMG entre os anos de 2005 e 2010 e construiu-se um banco de dados com as informações obtidas. Nesse período, foram realizadas 2.399 primeiras consultas. Quando a suspeita era de uma das síndromes incluídas na pesquisa ou em caso de atraso nos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor, dismorfismos, dificuldade de aprendizagem e/ou déficit cognitivo, malformações e distúrbios de comportamento, o prontuário do serviço era analisado. No período entre 2005 e 2010, foram analisados 1.147 prontuários e os seguintes dados dos pacientes foram acrescentados ao banco de dados: nome, diagnóstico/suspeita diagnóstica, registro no HC/UFMG, sexo, data de nascimento, nome da mãe/responsável, telefone, endereço, cariótipo, história familiar, exame físico, crescimento e desenvolvimento, comportamento e inteligência, alterações cardiovasculares, renais, genitais, endocrinológicas, ósseas, neurológicas, oftalmológicas, auditivas, pulmonares e gastrintestinais. Dos 1.147 prontuários analisados, 169 pacientes apresentavam quadros clínicos sugestivos de uma das síndromes de microdeleção incluídas na pesquisa. Por motivos variados, somente 114 pacientes compareceram ao HC/UFMG para obterem mais informações sobre a pesquisa.

Entre janeiro de 2011 e setembro de 2012, os pacientes foram avaliados de forma prospectiva. Os dados dos indivíduos atendidos como primeiras consultas nesse período e que tinham uma das síndromes incluídas na pesquisa como suspeita diagnóstica eram incluídos no banco de dados. Foram atendidas 840 primeiras consultas neste período e 36 pacientes tinham suspeita de uma das síndromes de microdeleção estudadas.

Após esclarecimentos acerca do estudo, todos os responsáveis por pacientes que foram abordados pessoalmente no HC/UFMG aceitaram fazer parte da pesquisa. O mesmo não aconteceu por telefone, pois, após breve explicação sobre a pesquisa e convite para comparecimento ao HC/UFMG, alguns responsáveis não aceitaram participar do estudo. Os responsáveis leram os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido confeccionados de acordo com instruções do Comitê de Ética da UFMG, esclareceram quaisquer dúvidas que surgiram sobre o estudo, seus objetivos e sobre a coleta de material e assinaram os termos.

6.3 Dados da história e do exame físico

Os dados da história e do exame físico foram coletados por único pesquisador a partir de um protocolo construído com base nas alterações mais comumente encontradas nas diversas síndromes estudadas. O protocolo incluía 171 variáveis, entre dados da história, crescimento e desenvolvimento, doenças associadas e sinais ao exame físico (Anexo A). Foi realizado exame físico de todos os pacientes no momento da coleta das amostras.

6.4 Coleta de material para obtenção de DNA

Foram coletadas células da mucosa oral dos pacientes para extração posterior de DNA. A coleta foi feita através de *swab* com escovas de cerdas macias que eram levemente friccionadas contra a parte interna das bochechas dos pacientes repetidas vezes. O material coletado era, então, colocado em frasco com álcool absoluto e encaminhado ao laboratório GENE para realização dos testes. Para cada paciente, foram utilizadas duas escovas (uma para cada bochecha) e dois frascos com álcool (um para cada escova).

6.5 Testes moleculares

O material coletado foi enviado ao laboratório, onde ocorria extração de DNA por meio de método padronizado (Laitinen et al., 1994), submetendo-o, em seguida, ao teste molecular (MQF-PCR) descrito por Stofanko et al. (2013). Todos os resultados, tanto positivos quanto negativos, foram confirmados por exames já consolidados na prática laboratorial.

6.6 Análise estatística

Foi considerado rendimento da abordagem diagnóstica a porcentagem de pacientes, dentre os que foram incluídos no estudo, que puderam ser diagnosticados com a utilização da associação fenótipo-MQF-PCR.

Foi realizado tratamento estatístico na amostra de pacientes com suspeita de Síndrome de Williams, visto que foi a doença com maior número de casos positivos. Para análise da distribuição da frequência observada foi empregado o Teste Exato de Fisher, considerando-se o valor p menor que 0,05 como limiar de significância estatística.

7 Resultados

De um total de 3.239 pacientes atendidos pela primeira vez no Serviço de Genética do HC/UFGM, 205 (6,3%) apresentavam características clínicas sugestivas de uma das síndromes de microdeleção incluídas na pesquisa. Entrou-se em contato com esses pacientes candidatos e, em 44 casos, o telefone anotado no prontuário não estava correto e/ou quem atendia à chamada não conhecia o paciente. Em 5 casos, após breve explicação sobre a pesquisa por telefone e convite para comparecimento ao HC/UFGM, o responsável pelo paciente não aceitou participar do estudo. Uma paciente faleceu e outros 5 pacientes foram agendados, mas não compareceram ao ambulatório. Houve, portanto, uma taxa de perda igual a 26,8% e um total de 150 pacientes formaram o grupo a ser estudado.

Dos 150 pacientes, 37 foram positivos para uma das síndromes pesquisadas, o que confere um rendimento global igual a 24,7%. Entretanto, as porcentagens de rendimento variaram de acordo com as síndromes analisadas. Para a Síndrome de Williams, por exemplo, a taxa de acerto foi de 63,6%, enquanto que para a Síndrome Velocardiofacial foi igual a 12,9%. A tabela a seguir mostra a distribuição dos pacientes de acordo com a suspeita diagnóstica, o número de resultados positivos e o rendimento da abordagem diagnóstica para cada doença (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos pacientes de acordo com a suspeita diagnóstica, número de resultados positivos e rendimento da abordagem diagnóstica global e para cada doença.

Suspeita	Amostras coletadas	Resultados positivos	Rendimento
WBS	33	21	63,6%
VCFS	31	4	12,9%
Angelman	20	4	20%
Prader-Willi	12	5	41,7%
Saethre-Chotzen	12	0	0%
NF1	8	1	12,5%
Smith-Magenis	7	0	0%
WAGR	6	1	16,7%
Duplicação <i>MECP2</i>	4	0	0%
Rubinstein-Taybi	4	0	0%
Langer-Giedion	4	0	0%
VCF2	3	1	33,3%
Miller-Dieker	3	0	0%
Rett	2	0	0%
Del Xp22.3	1	0	0%
TOTAL	150	37	Global: 24,7%

WBS: Síndrome de Williams-Beuren; VCFS: Síndrome Velocardiofacial, NF1: Neurofibromatose 1, WAGR: Síndrome Aniridia-Tumor de Wilms; VCF2: Síndrome Velocardiofacial tipo 2; Del Xp22.3: Síndrome de Deleção Xp22.3.

Como pode ser observado na Tabela 2, as suspeitas mais frequentes foram de Síndrome de Williams-Beuren, Síndrome Velocardiofacial, Síndromes de Angelman e Prader-Willi e Síndrome de Saethre-Chotzen.

O maior número de suspeitos (12) sem resultado positivo foi com a síndrome de Saethre-Chotzen. Trata-se de uma síndrome de craniossinostose com herança autossômica dominante. Por isso, em cada caso suspeito, outros parentes de primeiro grau (pais e irmãos) que também tinham história de craniossinostose foram testados, o que aumentou a amostra. As síndromes de Smith-Magenis, Duplicação *MECP2*, Langer-Giedion, Miller-Dieker, Rett e Deleção Xp22.3 foram suspeitas, mas nenhum caso positivo foi encontrado.

Serão discutidos, na forma de seis artigos, os resultados obtidos com as síndromes de Williams, Prader-Willi/ Angelman e Velocardiofacial, uma vez que foram detectados mais casos positivos com essas doenças, permitindo melhor análise da influência do fenótipo para o diagnóstico.

7.1 Phenotype of Williams-Beuren syndrome in Brazilian patients: comments on the article by Patil et al. (2012) and discussion of variable phenotypes in distinct populations (artigo publicado na revista American Journal of Medical Genetics – Part A)

Phenotype of Williams–Beuren Syndrome in Brazilian Patients: Comments on the Article by Patil et al. [2012] and Discussion of Variable Phenotypes in Distinct Populations

Melissa Machado Viana,^{1*} Martin Stofanko,² Higor Gonçalves-Dornelas,² Pricila da Silva Cunha,³ and Marcos José Burle de Aguiar¹

¹Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

²Núcleo de Genética Médica [GENE], Minas Gerais, Brazil

³Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Manuscript Received: 13 July 2012; Manuscript Accepted: 3 October 2012

TO THE EDITOR:

We read with great interest the article “Facial Phenotype at Different Ages and Cardiovascular Malformations in Children With Williams–Beuren Syndrome: A Study From India” by Patil et al. [2012]. It was stimulating to notice that, like us, researchers from emerging countries are describing clinical phenotypes of genetic syndromes in their own population. In Brazil, one of the emerging economies in the world, we studied 23 patients that had suggestive clinical features of Williams–Beuren syndrome (WBS) and determined which findings were more frequent in patients with a positive molecular testing result. Between 2005 and 2010, 2,399 patients were evaluated for the first time at a public genetic center in Minas Gerais, Brazil. The medical charts were analyzed and a total of 26 patients were selected because of suggestive clinical features of WBS; 19 accepted to take part in the trial. Four more patients were evaluated in 2011 and agreed to participate. A total of 23 samples were collected, DNA was extracted from oral mucosa cells and submitted to a simple and inexpensive novel technique developed by us and called Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR (MFQ-PCR). All results were confirmed by loss of heterozygosity assessed by multiple microsatellites or real-time PCR.

Out of 23 patients, 15 tested positive for WBS (7 males, 8 females; mean age 14.06 years). The main characteristics of positive cases were friendly personality (93%), prominent lips (93%), 5th finger clinodactyly (66.7%), slanted palpebral fissures (60%), long philtrum (53%), hypersensitivity to sound (46.7%), stellate pattern of the iris (40%), hyperextensible joints (40%), anteverted nares (33.3%), hoarse voice (33.3%). Unlike the cases studied by Patil et al. [2012], there was no dysmorphic feature observed in all cases. Long philtrum, stellate pattern of the iris and wide mouth with thick lip vermillion/prominent lips were common to both groups of patients, ours, and Patil and colleagues. We agree with

How to Cite this Article:

Viana MM, Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha PdS, Aguiar MJB. 2013. Phenotype of Williams–Beuren syndrome in Brazilian patients: Comments on the article by Patil et al. [2012] and discussion of variable phenotypes in distinct populations. *Am J Med Genet Part A* 161A:637–638.

Patil et al. [2012] when they stated that most of their patients had dark irides and that dark irides might be the reason for the low rate of stellate iris pattern detected among non-Caucasians. It is difficult to assess stellate iris pattern on dark irides at a routine examination and they did not perform slit lamp examination. We also did not use slit lamp examination and were able to observe stellate patterns because the colors of irides in our patients did not follow a rigid pattern and varied greatly. This variety represents a typical diversity found in Brazilian population [Parra et al., 2003]. Patil et al. [2012] reported wide mouths with thick lip vermillion in 100% of their cases. We found prominent lips in 93% of patients. Thus, prominent lips/wide mouth with thick lip vermillion are important facial anomalies to look for in patients with suspected WBS from both populations.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

*Correspondence to:

Dr. Melissa Machado Viana, Rua Padre Marinho, 480/704, Belo Horizonte, Minas Gerais 30140-040, Brazil. E-mail: mmviana@ufmg.br
Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 24 January 2013
DOI 10.1002/ajmg.a.35740

An important aim of the paper by Patil et al. was to describe phenotype particularities of populations other than Caucasian patients from developed countries, since phenotype reports are mainly from developed countries of Caucasian origin. Yau et al. [2004] stated that most published studies on WBS included only patients from western countries and that was the reason why the authors wanted to describe clinical characteristics of WBS in the Chinese population. They hypothesized that, among other reasons, some of the discrepancies they observed could reflect a genuine ethnic difference in genetic background that plays a role in modifying the phenotypic manifestation of the microdeletion [Yau et al., 2004]. Figueroa et al. [2008] analyzed cardiovascular anomalies in 40 Mexican patients with WBS and then compared their results to studies of other hospitals (such as hospitals in Salt Lake City, Seoul, Helsinki, Madrid, and Toronto) and found similarities and discrepancies among all reports. Brazilians, being one of the most heterogeneous populations in the world (result of five centuries of interethnic crosses between Europeans, Africans, and Amerindians) [Parra et al., 2003], must be studied in order to determine their own most prevalent clinical features in a given disease.

Another important difference between developed countries and emerging ones, such as Brazil and India, is that emerging economies demand cheaper diagnostic approaches when compared to developed countries. We developed a new, inexpensive, and reliable diagnostic technique for WBS, which is targeted to the region of interest and thus requires clinical expertise to make a diagnostic hypothesis before indicating the test. To develop clinical expertise it is necessary to encourage more studies about specific populations because, as discussed here, there are differences in clinical presentations of

well-delineated syndromes (such as WBS) in distinct populations. Thereby, we find extremely valuable that specific populations are studied so that clinical diagnosis can be refined and management of patients can be driven to the most common presentations of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Molecular analysis was performed as a part of the project “Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção no SUS,” granted by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The research protocol was approved by our Internal Review Board/Ethics Committee.

REFERENCES

- Figueroa JR, Rodriguez LMO, Hach JLP, Ruiz VDC, Martinez HO. 2008. Cardiovascular spectrum in Williams–Beuren syndrome. *Tex Heart Inst J* 35:279–285.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci* 100:177–182.
- Patil SJ, Madhusudhan BG, Shah S, Suresh PV. 2012. Facil phenotype at different ages and cardiovascular malformations in children with Williams–Beuren syndrome: A study from India. *Am J Med Genet Part A* 158A:1729–1734.
- Yau EKC, Lo IFM, Lam STS. 2004. Williams–Beuren syndrome in the Hong Kong Chinese population: Retrospective study. *Hong Kong Med J* 10: 22–27.

7.2 *A new case of keratoconus associated with Williams-Beuren syndrome (artigo publicado online na revista *Ophthalmic Genetics*)*

CASE REPORT

A New Case of Keratoconus Associated with Williams-Beuren Syndrome

Melissa Machado Viana¹, Maria Frasson², Letícia Lima Leão¹, Martin Stofanko³, Higgor Gonçalves-Dornelas³, Pricila da Silva Cunha⁴, Marcos José Burle de Aguiar¹

¹Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, ²Serviço de Retina, Hospital São Geraldo, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, ³Núcleo de Genética Médica (GENE), Minas Gerais, Brazil, ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Background: Williams-Beuren syndrome is a multisystemic genetic disorder caused by a contiguous gene deletion at 7q11.23. Keratoconus is a complex disease and it is suspected to have a genetic origin, although the specific gene responsible for keratoconus has not been identified. Although there are several ocular features in Williams-Beuren syndrome, keratoconus is not regularly described as part of this syndrome.

Purpose: To report a new patient with keratoconus and Williams-Beuren syndrome.

Discussion: This is the third case of an association between Williams-Beuren syndrome and keratoconus. The authors believe that the Williams-Beuren syndrome chromosome region can be a possible target for further investigation as the genetic basis of keratoconus.

Keywords: 7q11.23; keratoconus; microdeletion; Williams-Beuren syndrome

INTRODUCTION

In 2010, Pinsard described the first two cases of keratoconus (KTCN) and Williams-Beuren syndrome (WBS), (OMIM 194 050), raising the possibility of a genetic link between both entities.¹ Since it is known that WBS is caused by a contiguous deletion including the *elastin* gene (*ELN*) at 7q11.23, this region may be a possible target for further investigation of the genetic basis of KTCN. WBS has a prevalence of 1:7500.² The prevalence of KTCN is difficult to establish in part due to the different diagnostic criteria used in various studies, ranging from 8.8–54.4 per 100,000.³ Therefore, there is a statistical possibility of chance co-occurrence of both entities ranging from 8.8–54.4 per 750,000,000. Here we report the third case of KTCN in a patient with WBS.

CASE REPORT

A 40-year-old man was referred to the Serviço Especial de Genética Médica (Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil) because of intellectual disability, short stature, obesity, mild aortic stenosis, bicuspid aortic valve and dysmorphisms (brachycephaly, downslanted palpebral fissures, full nasal tip, malar flattening, long philtrum, wide mouth, thick vermilion of the lips, small hands and feet, clinodactyly of the 5th fingers) (Figure 1). During examination, his hoarse voice and overfriendliness were observed. There was no history of eye rubbing, atopy or other known risk factors for keratoconus. Family history for KTCN, intellectual deficit and other genetic diseases were negative. Other family members were not examined and a corneal topography was

Received 7 June 2012; accepted 6 October 2012

Correspondence: Melissa Machado Viana, Rua Padre Marinho, 480/704, Belo Horizonte, Minas Gerais 30140-040, Brazil. Tel: +553132440558. E-mail: mmviana@ufmg.br

not done. Karyotype was 46, XY (normal). Renal ultrasound, levels of calcium, TSH and free T4 were normal. Microdeletion at 7q11.23 was detected using a combination of loss of heterozygosity assessed by multiple microsatellites spanning the Williams-

Beuren Syndrome Critical Region (WBS CR), quantitative Real-Time PCR and Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR. The extent of the deletion was best estimated using quantitative Real-Time PCR that targeted exons of *elastin* (*ELN*) and *LIM domain kinase 1* (*LIMK1*). For our patient, we obtained the following corrected threshold values ($\Delta K Ct$): -0.9114 (*ELN*) and -0.7306 (*LIMK1*). An individual is diagnosed with WBS with 100% diagnostic sensitivity and 100% diagnostic specificity when values of $\Delta K Ct \leq -0.5943$ (*ELN*) and ≤ -0.7262 (*LIMK1*), respectively. Overall, we concluded that the patient bears a deletion spanning at least *ELN* and *LIMK1*. The best spectacle corrected visual acuity was worse than 1/10 in the right eye (counting fingers) and in the left eye limited to 1/10 on Snellen chart. The slit lamp exam showed corneal scarring in the right eye due to a previous hydrops (Figure 2). Munson's sign, Fleischer's ring, and Vogt's striae were found in both eyes. A stellate iris pattern was present in both eyes (Figure 2A). Corneal elevation topography was possible only in the left eye and showed irregular astigmatism and a large ectasia with keratometry of >51.39 D (Figure 2B). Color



FIGURE 1. The patient showing characteristic facial dysmorphisms of Williams-Beuren syndrome at adult age.

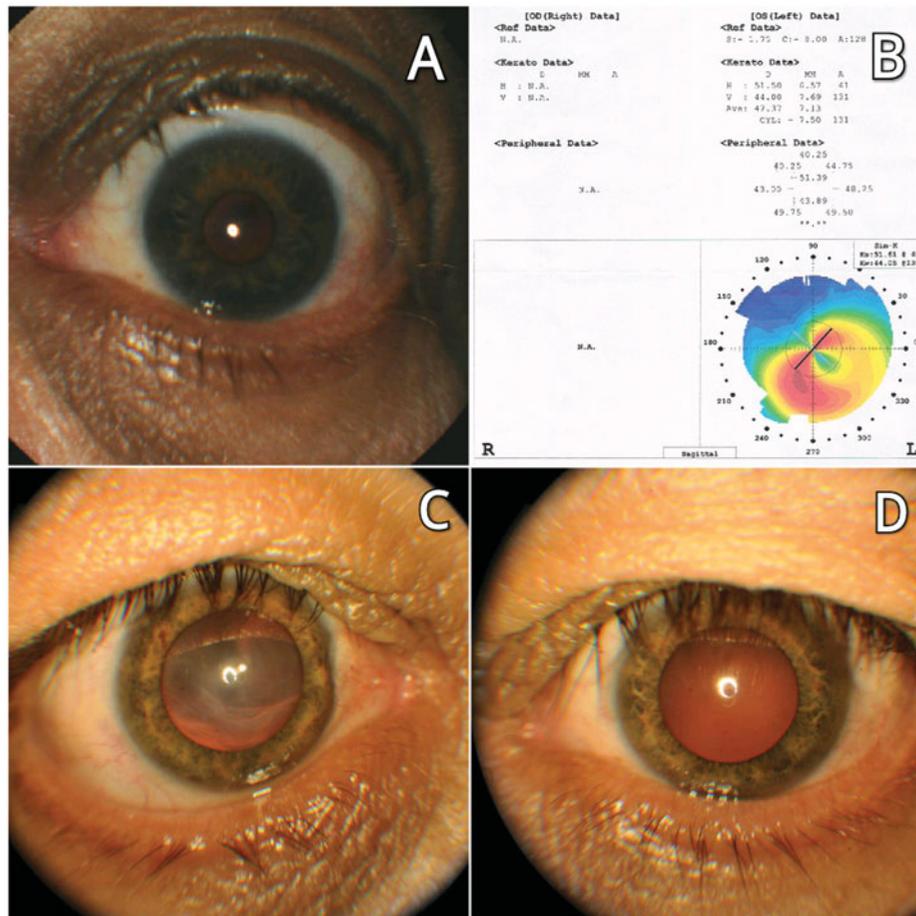


FIGURE 2. (A) Stellate iris pattern of the left eye. (B) Topography of the left eye showing irregular astigmatism and abnormal values of keratometry. (C and D) Anterior segment of both eyes.

fundus retinography of the left eye indicated tortuosity of retinal vessels.

DISCUSSION

KTCN is a complex disease believed to have multifactorial etiology. Both genetic and environmental factors have been associated with KTCN.⁴ Environmental factors include contact lens wear, chronic eye rubbing and atopy of the eye.³

WBS typically occurs due to non-allelic homologous recombination in a region on chromosome 7 containing blocks of low copy repeats with high sequence homology that predispose to rearrangements during meiosis.^{5,6} Although there are several ocular features including stellate iris pattern and retinal vascular tortuosity in this syndrome, KTCN is not regularly described as part of WBS. Therefore, the association of KTCN and WBS is uncommon.

To our knowledge, this is the third case of WBS associated with KTCN. The first report of such association was published in 2010 by Pinsard.¹ The authors described two patients, one male and one female, 23 and 31 years old respectively, with characteristic morphological features of WBS. In both cases a microdeletion at 7q11.23 was confirmed using FISH (fluorescent *in situ* hybridization). Pinsard (2010) hypothesized that abnormalities in Elastin could be involved in the pathogenesis of KTCN.¹ However, histological analysis could not confirm the presence of abnormal Elastin in cornea. Therefore, the authors raised the possibility of other genes in WBSCR being associated with KTCN.

A combination of diagnostic methods was used for this patient's diagnosis. Overall, we concluded that the patient bears a deletion spanning at least *ELN* and *LIMK1*. The techniques used do not allow determination of the exact breakpoints of the microdeletion and it would be expensive and time consuming to perform a new diagnostic protocol. Therefore, the authors believe that future studies could be done in order to explain exactly where the microdeletion occurred. It was possible to demonstrate hemizygoty for *LIM domain kinase 1 (LIMK1)*, a gene that encodes a serine/threonine kinase that regulates microtubule stability and actin polymerization.⁷ Cross-talk between LIMK1 and the Transforming Growth Factor β (TGF β) receptor superfamily has been demonstrated.⁸ TGF β is a family of cytokines known to be a key mediator of fibrotic responses⁹ and Engler (2011) demonstrated increased TGF β pathway markers in severe KTCN cases.¹⁰ Therefore we speculate that the LIMK1 and TGF β cascade may play a role in the pathogenesis of KTCN either in a causative role or as a secondary repair response leading to structural changes in KTCN.

Another hypothesis for a role of LIMK 1 in the pathogenesis of KTCN is related to cofilin 1 (CFL1). CFL1 is a key F-actin remodeling protein that severs F-actin and thereby allows addition and assembly of new actin filaments.¹¹ LIMK1 regulates CFL1 and actin cytoskeletal homeostasis.¹¹ Lee (2009) found that *CFL1*, the gene that encodes CFL1, was differentially expressed in human keratocytes in KTCN.¹² Thus, we believe that an association between LIMK1 and KTCN is possible. Our report of a new patient with KTCN and WBS contributes to expand the phenotype of this syndrome and reinforces the possibility of a link between genes located at 7q11.23 and KTCN. We also hypothesize an association between LIMK1 and KTCN. Knowing the genetic basis of KTCN is essential for developing diagnostic tests, gene therapy and medications in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

The molecular analysis was performed as part of the project "Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção no SUS", granted by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1. Pinsard L, Touboul D, Vu Y, et al. Keratoconus associated with Williams-Beuren syndrome: first case reports. *Ophthalmic Genet* 2010;31(4):252-256.
2. Strømme P, Bjørnstad P, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* 2002;17: 269-271.
3. Nowak DM, Gajecka M. The genetics of keratoconus. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2011;18(1):2-6.
4. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 1998;42:297-319.
5. Dutly F, Schinzel A. Unequal interchromosomal rearrangements may result in elastin gene deletions causing the Williams-Beuren syndrome. *Hum Mol Genet* 1996;5: 1893-1898.
6. Urban Z, Helms C, Fekete G, et al. 7q11.23 deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover. *Am J Hum Genet* 1996;59: 958-962.
7. Gorovoy M, Niu J, Bernard O, et al. LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;280: 26533-26542.
8. Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkowa M, et al. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J* 2004; 23:4792-4801.

4 **M. M. Viana et al.**

9. Nakamura H, Siddiqui SS, Shen X, et al. RNA interference targeting transforming growth factor- β type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol Vis* 2004;10:703–711.
10. Engler C, Chakravarti S, Doyle J, et al. Transforming growth factor- β signaling pathway activation in keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2011;151(5):752–759.
11. Ishaq M, Lin BR, Bosche M, et al. LIM kinase 1-dependent cofilin 1 pathway and actin dynamics mediate nuclear retinoid receptor function in T lymphocytes. *BMC Mol Biol* 2009;12:41–54.
12. Lee JE, Oum BS, Choi HY, et al. Evaluation of differentially expressed genes identified in keratoconus. *Mol Vis* 2009;15:2480–2487.

7.3 Phenotype as a tool for diagnosing Williams-Beuren Syndrome using a low cost methodology (em preparação para envio à revista *European Journal of Medical Genetics*)

Phenotype as a tool for diagnosing Williams-Beuren syndrome using a low cost methodology

Melissa Machado Viana^{1*}, Martin Stofanko², Higgor Gonçalves-Dornelas², Pricila da Silva Cunha³, Letícia Lima Leão¹, Marcos José Burle de Aguiar¹

1- Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais

2- Núcleo de Genética Médica (GENE), Minas Gerais

3- Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

***Corresponding author:** Melissa Machado Viana. Address: Alameda Álvaro Celso, 271.

Belo Horizonte, Minas Gerais. Brazil. 30150-260. mmviana@ufmg.br. +553132440558

ABSTRACT

Introduction: Williams-Beuren syndrome (WBS) is a multisystem disorder caused by hemizygous deletion of 26-28 contiguous genes on chromosome 7q11.23. Despite the consistency of the overall clinical features, the broad spectrum of anomalies and phenotypic variability (within a population and in distinct populations) may frequently complicate clinical diagnosis. The diagnosis of WBS may be done by genome wide screening methods (such as aCGH) or by targeted methods (FISH or PCR-based methods). In emergent economies targeted methods are more appropriate. **Objectives:** To describe our experience in clinically identifying WBS patients and confirming the diagnostic hypothesis through molecular approach suitable for developing countries. **Material and Methods:** A total of 33 oral swab samples were collected, the DNA was extracted and submitted to a set of three simple molecular diagnostic tests, including the inexpensive Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR. **Results:** Out of 33 individuals, 21 were tested positive for WBS (10 males, 11 females; mean age 21.5 years; range 5-40 years). The most common characteristics of positive cases were prominent lips (95.2%), friendly personality (90.5%), long philtrum (61.9%), 5th finger clinodactyly (61.9%), slanted palpebral fissures (57.1%), hypersensitivity to sound (47.6%), stellate iris pattern (42.9%), peripheral pulmonary artery stenosis (42.1%), supraaortic aortic stenosis (21%). The following features achieved statistical significance: prominent lips ($p=0.0003$), friendly personality ($p=0.0152$), peripheral pulmonary artery stenosis ($p=0.0292$). **Discussion:** Since there are differences in phenotype presentation among ethnic groups, we find valuable to study specific populations in regards to different genetic syndromes so that clinical diagnosis can be refined and management of patients can be driven to the most common presentations of the disease. Laboratory tests should also be adapted to different economic realities.

Key words: Williams-Beuren syndrome, Microdeletion syndrome, Clinical features, Developing country, Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR.

INTRODUCTION

Williams-Beuren syndrome (OMIM #194050) is a multisystem disorder caused by hemizygous deletion of 26-28 contiguous genes, including *elastin* gene (*ELN*) and *LIM domain kinase 1* gene (*LIMK1*), on chromosome 7q11.23 [1]. Its prevalence is estimated at 1/7500 [2] and its classic form includes: dysmorphic facial features (100%), a unique personality and cognitive profile (90%), cardiovascular disease - most commonly supravalvular aortic stenosis (80%) -, intellectual disability (75%) and infantile hypercalcemia (15%) [3,4]. Virtually every organ and system can be affected in WBS as a result of haploinsufficiency of deleted genes [4]. Most cases are sporadic, although familial cases with autosomal dominant inheritance have been reported [5].

Despite the consistency of the overall clinical features, the broad spectrum of anomalies and phenotypic variability (within a population and in distinct populations) frequently complicate clinical diagnosis [6-10]. There are a number of laboratory techniques used to confirm WBS clinical suspicion. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is widely used and considered the gold standard for WBS molecular diagnosis [4]. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), microsatellite DNA markers and array comparative genomic hybridization (aCGH) are also methods that can be used in WBS diagnosis [10]. However, these diagnostic strategies are often quite complex, demand specialized equipment and are expensive. Therefore, they are rarely used in many developing countries, including Brazil.

Brazil has a public healthcare system (SUS - *Sistema Único de Saúde*) that covers medical expenses for 80% of the population [11] and demands cheaper diagnostic methods. For our reality, genetic diagnosis based on clinical suspicion and testing focused at specific targets is more appropriate than genome wide screening procedures. Thus, the objective of this report is to describe our experience in clinically identifying WBS patients and confirming

our diagnostic hypothesis through a set of molecular tests suitable for Brazil or any developing country.

MATERIAL AND METHODS

Between January/2005 and September/2012, 3.239 patients were evaluated for the first time at a SUS genetic center in Minas Gerais, Brazil. The medical charts were analyzed and a total of 42 patients with suggestive clinical features of WBS were selected; 33 accepted to take part in the trial. The suspected individuals were screened for over 60 clinical features commonly found among WBS patients (Supplementary Table). The frequency differences in clinical characteristics between WBS patients and controls were assessed by Fisher's exact test [12], and *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

A total of 33 oral swab samples were collected, the DNA was extracted following salting-out protocol [13] and screened for deletion of WBS critical region using Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR (MQF-PCR) [14], which was developed for diagnosis of human microdeletion/microduplication syndromes in Brazil. The results were further confirmed by loss of heterozygosity assay using four polymorphic microsatellite markers in the WBS critical region [15-18] and quantitative Real-Time PCR targeting exons of *ELN* and *LIMK1* [14,19,20]

RESULTS

All 33 patients selected had intellectual disability and developmental delay assessed by clinical history. None of them had family history of WBS. Out of 33 individuals, 21 were tested positive for WBS (10 males, 11 females; mean age 21.5 years; range from five to 40 years).

The main indications for WBS testing of patients were a combination of typical cardiac abnormalities, facial dysmorphisms and friendly behavior (11 patients – 52.4%). Ten

patients (47.6%) had typical behavior, facial dysmorphisms and either normal cardiac evaluation or non typical cardiovascular abnormalities.

The most common characteristics of positive cases (Table 1) were prominent lips (95.2%), friendly personality (90.5%), long philtrum (61.9%), 5th finger clinodactyly (61.9%), slanted palpebral fissures (57.1%), hypersensitivity to sound (47.6%), stellate iris pattern (42.9%), hyperextensible joints (38%), anteverted nares (33.3%), bulbous nasal tip (28.6%), malar hypoplasia (28.6%), small stature (28.6%), hoarse voice (23.8%) Figure 1 shows facial phenotype of seven patients.

Microcephaly was observed in 42.9% of WBS patients; 19% had weight above 97th centile and 4.8% of patients had height under 3rd centile. One patient had hypertension and history of ischemic stroke at young age, one patient had hypothyroidism, none of them had diabetes or documented hypercalcemia. Interestingly, one patient had recurrent rectal prolapse and another had keratoconus (KTCN).

Echocardiographic examination was performed in 19/21 WBS patients. We found three normal results (15.8%). Peripheral pulmonary artery stenosis (PPAS) was the most frequent cardiac abnormality in our population (42.1%), followed by supraaortic stenosis (SVAS) (21%). Isolated PPAS and isolated SVAS occurred in two patients each. A combination of SVAS and PPAS was found in only one subject. These findings are described in table 2.

None of the negative cases had typical cardiac abnormalities. Four of them had normal echocardiography; four had other cardiac defects (atrial septal defect, tricuspid regurgitation, mitral valve insufficiency and patent ductus arteriosus); echocardiography was not performed in three subjects.

Sixteen (16) WBS patients had renal ultrasounds: 15 were normal and one patient had a significant post-voiding residual urine volume.

Prominent lips (p -value=0.0003), friendly personality (p -value=0.0152) and PPAS (p -value=0.0292) were predictive features for WBS positive results [12]. Weight under 3rd centile (p -value=0.0158) was a predictive feature for a negative result (Table 3).

DISCUSSION

Brazil, one of the emerging economies in the world, has a public health system that demands accessible diagnostic approaches when compared to developed countries. We used a novel, inexpensive and reliable internally controlled diagnostic technique for WBS diagnosis [14], which is targeting the WBS critical region and thus requires clinical expertise to make a diagnostic hypothesis before indicating the test. The high cost-per-analysis of current standard methods for diagnosing human microdeletion and microduplication syndromes in developing countries was recently discussed by Dutra [10]. The authors compared the results of MLPA (P029 commercial kit) and loss of heterozygosity assay using five polymorphic microsatellite markers in a group of 88 Brazilian patients with clinical suspicion of WBS. They argued that a combination of both techniques is an extremely valuable tool for the molecular diagnosis of WBS and that implementation of both methods should be considered, especially in developing countries where resources are limited. Our diagnostic approach involved an even more affordable combination of three simple targeted molecular techniques – the MQF-PCR, Real-Time quantitative PCR and microsatellite assay [14]. All three methods provide results within a few hours, are easy to perform and have lower costs when compared to MLPA. Thus, we propose the use of our diagnostic strategy in molecular confirmation of patients with clinical suggestion of WBS.

To develop clinical expertise and enhance clinical suspicion for WBS it is necessary to perform studies on our own population. Firstly, because there are well documented differences in facial structures between ethnic groups [21]. Secondly, there are differences in clinical presentations of WBS in distinct populations [6-9,22]. Yau [6] stated that most

published studies on WBS included only patients from western countries and hypothesized that, among other reasons, some of the discrepancies they observed in their Chinese population could reflect a genuine ethnic difference in genetic background that plays a role in modifying the phenotypic manifestation of the microdeletion.

Brazilian population, being one the most heterogeneous in the world - result of five centuries of interethnic crosses between Europeans, Africans and Amerindians – [23], must be studied in order to determine their own most prevalent clinical features in a given disease. In fact, Moore [24] studied patients with Fetal Alcohol Spectrum Disorders and observed that the most heterogeneous group of patients (in regards to facial dysmorphisms) came from the populations with various levels of ethnic admixture.

Among our patients, the main characteristics of positive cases were prominent lips, friendly personality, long philtrum, 5th finger clinodactyly, slanted palpebral fissures, hypersensitivity to sound, and stellate iris pattern. These features are often described in reports of WBS patients [3] and were found in our Brazilian sample. Our findings suggest that prominent lips and friendly personality may be key features of WBS in our population.

We found cardiovascular abnormalities in 84.2% of our WBS patients, which is similar to that estimated among WBS patients (80%) [3]. Differently from other studies, the most frequent cardiovascular disease was PPAS (42.1% in our study versus overall incidence of 50%) and not SVAS (21% versus overall incidence of 75%) [3]. In fact, PPAS was a predictive feature for WBS positive results (p -value=0.0292).

Our finding also differs from other report of 17 Brazilian WBS patients, in which SVAS had a frequency of 63% and PPAS occurred in 26% of their sample [25]. In agreement with our results, Sugayma [25] observed SVAS and PPAS associated with other cardiac defects in the majority of their sample. The authors found that the most frequent defect associated with SVAS was PPAS (36%), followed by bicuspid aortic valve and mitral valve

prolapse (27%, each); PPAS was also associated with valvular pulmonary stenosis and mitral valve prolapse [25]. Our results showed that the most common cardiovascular defects associated with PPAS and SVAS were ventricular septal defect and valve abnormalities (Table 2). Both results differ from other studies that report incidences of mitral valve prolapse ranging from 1% to 3% [26]. Valve abnormalities are considered common features of WBS and 10-30% of adults with WBS have isolated mitral valve prolapse or regurgitation [27,28]. Since our mean age of patients was 21.5 years, one could expect a higher prevalence of such malformations. Both ours and Sugayama's [25] work have small sample sizes and the results cannot be generalized to the entire Brazilian population.

Obesity has been described as a common finding in WBS [4]. In our study only 19% of WBS patients were obese and 4.8% had weight under 3rd centile. On the other hand, 41.7% of patients with negative results were underweight. Weight under 3rd centile was predictive of a negative molecular testing ($p=0.0158$). Nogueira [28] studied 17 Brazilian WBS patients and found that mean weight for age was significantly lower than reference data. The authors did not consider weight deficit as a relevant finding since Body Mass Index (BMI) was within normal range in their sample. We did not perform BMI calculations, but this is an interesting feature to explore in WBS patients.

Only one patient had hypothyroidism, none of them had diabetes or history of documented hypercalcemia, common problems across the life span of WBS patients [27].

Another patient was diagnosed with KTCN. Although there are several ocular features in WBS, KTCN is not regularly described as part of this syndrome. To our knowledge, this is the third case of WBS associated with KTCN [29]. We suggest that the patient bears a deletion spanning at least *ELN* and *LIMK1* genes and that *LIMK1* and TGF β cascade may play a role in the pathogenesis of KTCN either in a causative role or as a secondary repair response leading to structural changes in KTCN.

Renal anomalies have been described in many WBS series [30,31]. In our sample, only one patient had renal ultrasound abnormalities (6.2%), a significant post-voiding residual urine volume. The prevalence of voiding dysfunction in patients with WBS appears to be increased but few studies have addressed this issue [32]. Sammour [33] evaluated 28 Brazilian WBS patients and found a high prevalence of voiding dysfunction, with more than 75% of patients with urinary symptoms and approximately 50% significantly bothered by these symptoms. Therefore, we believe that it is important to take a complete clinical history of urological symptoms and voiding diary, and not only search for structural abnormalities.

A 34-year-old female was diagnosed with hypertension at a young age and has had an ischemic stroke at age 33. This patient was evaluated elsewhere at the time of the stroke, but magnetic resonance imaging of the brain showed signs of cerebral infarction and neurological examination confirmed flaccid right hemiparesis. Angiography was not performed. To date, at least eight cases of ischemic stroke in WBS patients have been published [34-36]. There is evidence that the same mechanism of peripheral vascular stenosis in WBS (secondary to ELN arteriopathy) was occurring in the cerebral vasculature [34] and there are reports suggesting that cardiac malformations and hypertension could be risk factors for stroke in WBS patients, as well as in the general population. [35,36]. Therefore, in spite of a rare manifestation of the syndrome, ischemic stroke and its risk factors are important issues in the management of WBS patients.

We find important to study specific populations so that clinical diagnosis can be refined, management of patients can be driven to the most common presentations of the disease and laboratory tests can be adapted to the economic reality in which the populations live. We believe that this experience can be extended to other genetic syndromes likely to be diagnosis by PCR or other targeted methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

Molecular analysis was performed as a part of the project "Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção no SUS", granted by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). The research protocol was approved by Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- [1] On-line Mendelian Inheritance in Man (OMIMTM) [Internet]. Accessed 2013 May 1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- [2] StrØme P, Bjornstad P, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol.* 2002; 17: 269–71.
- [3] American Academy of Pediatrics (Committee on Genetics). Health Care Supervision for Children with Williams Syndrome. *Pediatrics.* 2001; 107(5):1192-204.
- [4] Morris CA. Introduction: Williams Syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010; 154C(2): 203-8.
- [5] Morris CA, Loker J, Ensing G, Stock AD. Supravalvular aortic stenosis cosegregates with a familial 6:7 translocation which disrupts the elastin gene. *Am J Med Genet.*1993; 46:737-44.
- [6] Yau EKC, Lo, IFM, Lam STS. Williams-Beuren syndrome in the Hong Kong Chinese population: retrospective study. *Hong Kong Med J.* 2004; 10: 22-7.
- [7] Figueroa JR, Rodriguez, LMO, Hach JLP, Ruiz, VdC, Martinez, HO. Cardiovascular spectrum in Williams-Beuren syndrome. *Tex Heart Inst J.*2008; 35(3): 279-85.
- [8] May PA, Gossage JP, Smith M, Tabachnick BG, Robinson LK, Manning M, Cecanti M, Jones KL, Khaole N, Buckley D, Kalberg WO, Trujillo PM et al. Population differences in dysmorphic features among children with fetal alcohol spectrum disorders. *J Dev Behav Pediatr.* 2010; 31(4): 304-16.
- [9] Patil, SJ, Madhusudhan BG, Shah S, Suresh PV. Facil phenotype at different ages and cardiovascular malformations in children with Williams-Beuren syndrome: a study from India. *Am J Med Genet Part A.* 2012; 158A (7): 1729-34.
- [10] Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, Fonseca FM, Pieri PC, Jehee FS, Bertola DR, Kim CA. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy

for developing countries. *BMC Res Notes*. 2012; 5: 13-7.

- [11] Castilla EE, Luquetti DV. Brazil: Public Health Genomics. *Public Health Genomics* 2009; 12(1):53-8.
- [12] Fisher RA. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *J Royal Stat Soc*. 1922; 85 (1): 87–94.
- [13] Laitinen J, Samarut J, Holtta E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques*. 1994; 17:316, 318, 320-2.
- [14] Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha OS, Pena HB, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ. Simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for detection of microdeletion and microduplication syndromes. *PLoS ONE*. 2013; 8(4): e61328.
- [15] Urban ZC, Fekete G., Boys CD. Short report on DNA marker at candidate locus. *Clin Genet*. 1997; 51:133-4.
- [16] Foster K, Ferrell R, King-Underwood L, Povey S, Attwood J, Rennick R, Humphries SE, Henney AM. Description of a dinucleotide repeat polymorphism in the human elastin gene and its use to confirm assignment of the gene to chromosome 7. *Ann Hum Genet*. 1993; 57:87-96.
- [17] Gilbert-Dussardier B, Bonneau D, Gigarel N, Le Merrer M, Bonnet D, Philip N, Serville F, Verloes A, Rossi A, Ayme S, Weinszenbach J, Mattei M-G et al. A novel microsatellite DNA marker at locus D7S1870 detects hemizyosity in 75% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet*. 1995; 56:542-4.
- [18] Mari A, Amati F, Conti E, Bengala M, Novelli G, Dallapiccola B. A highly polymorphic CA/GT repeat (LIMK1GT) within the Williams syndrome critical region. *Clin Genet*. 1998; 53: 226-7.
- [19] Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC*

Genomics. 2005; 6:180.

[20] Hughes S, Weksberg R, Moldovan L, Squire JA. Use of quantitative PCR for the detection of genomic microdeletions or microduplications. In: S. Hughes and A. Moody editors PCR: Methods Express. UK: Bloxham; 2007, p: 49-62.

[21] Hajnis K, Farkas LG, Ngim RCK, Lee ST, Venkatadri G. Racial and ethnic morphometric differences in the craniofacial complex. In: Farkas LG editor. Anthropometry of the Head and Face. New York: Raven Press; 1994: p 201–18.

[22] Viana MM, Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha PdS, Aguiar MJB. Phenotype of Williams–Beuren syndrome in Brazilian patients: Comments on the article by Patil et al. [2012] and discussion of variable phenotypes in distinct populations. Am J Med Genet Part A. 2013; 161A:637–8.

[23] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. PNAS. 2003; 100(1): 177-82.

[24] Moore ES, Ward RE, Wetherill LF, Rogers JL, Autti-Ramo I, Fagerlund A, Jacobson SW, Robinson LK, Hoyme HE, Mattson SN, Foroud T and the CIFASD. Unique Facial Features Distinguish Fetal Alcohol Syndrome Patients and Controls in Diverse Ethnic Populations Alcoholism. Clin Exp Res. 2007; 31(10): 1707-13.

[25] Sugayama SMM, Moisés RL, Wagenfur J, Ikari NM, Abe KT, Leone C, Silva, CAA, Chauffaille MLFR, Kim CA. Williams-Beuren Syndrome. Cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization. Arq Bras Cardiol. 2003; 81(5): 468-73.

[26] Zalstein E, Mocs CAF, Musewe NN, Freedom RM. Spectrum of cardiovascular anomalies in Williams-Beuren syndrome. Pediatr Cardiol. 1991; 12: 219-23.

[27] Pober BR, Morris CA. Diagnosis and management of medical problems in adults with Williams-Beuren syndrome. Am J Med Genet Part C. 2007; 145C:280-90.

- [28] Nogueira RJN, Zimmerman LF, Moreno YMF, Comparini CR, Viana DV, Vieira TAP et al. Anthropometric and body-mass composition suggests an intrinsic feature in Williams-Beuren syndrome. *Rev Assoc Med Bras.* 2011; 57(6): 681-5.
- [29] Viana MM, Frasson M, Leão LL, Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha PS, Aguiar MJB. A new case of keratoconus associated with Williams-Beuren syndrome. *Ophthalmic Genet.* 2012, Nov [Epub ahead of print].
- [30] Pober BR, Lacro RV, Rice C, Mandell V, Teele RL. Renal findings in 40 individuals with Williams Syndrome. *Am J Med Genet.* 1993; 46: 271-4.
- [31] Pankau R, Partsch CJ, Winter M, Gosch A, Wessel A. Incidence and spectrum of renal abnormalities in Williams-Beuren Syndrome. *Am J Med Genet.* 1996; 63: 301-4.
- [32] Schulman SL, Zderic S, Kaplan P. Increased prevalence of urinary symptoms and voiding dysfunction in Williams Syndrome. *J Pediatr.* 1996; 129:466-9.
- [33] Sammour ZM, Gomes CM, Duarte RJ, Trigo-Rocha FE, Srougi M. Voiding-dysfunction and the Williams-Beuren Syndrome: a clinical and urodynamic investigation. *J Urol.* 2006; 175: 1472-6.
- [34] Putman CM, Chaloupka JC, Eklund JE, Fulbright RK. Multifocal intracranial occlusive vasculopathy resulting in stroke: an unusual manifestation of Williams Syndrome. *Am J Neurorad.* 1995; 16: 1536-8.
- [35] Wollack JB, Kaifer M, LaMonte MP, Rothman, M. Stroke in Williams Syndrome. *Stroke.* 1996; 27(1): 143-6.
- [36] Lee WD, Hsu JH, Huang FC, Chao MC, Chang YL, Huang MH. Ischemic stroke in Williams-Beuren Syndrome: a case report. *Kaohsiung J Med Sci.* 2009; 25(4): 212-5.

Figure 1 – Facial phenotype of patients at different ages and example of stellate iris pattern



Figure 1 shows facial phenotypes of 7 WBS patients (age ranging from 7 to 40 years). A and B - Male, 7 years (yr) and 9 months (mo); C- 9yr 8mo; D – Male, 8yr 8mo (Note his not so typical facial phenotype); E – Male; 13yr 10mo; F – Male, 14yr 2mo; G – Female, 34yr 3mo; H – 40yr 9mo; I – Stellate iris pattern.

Table 1 – Most frequent clinical features of WBS patients

Clinical features	Frequency	Percentage (%)
Prominent lips	20/21	95.2
Friendly personality	19/21	90.5
Long philtrum	13/21	61.9
Clinodactily of 5 th finger		
Slanted palpebral features	12/21	57.1
Hypersensitivity to sounds	10/21	47.6
Stellate iris pattern	9/21	42.9
Microcephaly		
Hyperextensible joints	8/21	38.1
Anteverted nares	7/21	33.3
Small stature	6/21	28.6
Bulbous nasal tip		
Malar hypoplasia		
Hoarse voice	5/21	23.8

Table 1 shows the most frequent features of WBS in a population of 21 Brazilian patients

Table 2 – Echocardiographic findings in WBS patients

Echocardiographic findings	Frequency	Percentage (%)
PPAS (overall)	8/19	42.1
Isolated PPAS	2/8	
PPAS associated with:	6/8	
VSD	2/6	
Mitral valve regurgitation	1/6	
Aortic valve regurgitation	1/6	
Bicuspid aortic valve	1/6	
Mitral valve insufficiency	1/6	
SVAS (overall)	4/19	21.1
Isolated SVAS	2/4	
SVAS associated with:	2/4	
Aortic valve regurgitation + mitral valve regurgitation	1/2	
PPAS	1/2	
Mitral valve regurgitation (overall)	3/19	15.8
Normal echocardiography	3/19	15.8
Aortic valve stenosis (overall)	2/19	10.5
Aortic valve regurgitation (overall)	2/19	
Mitral valve prolapse (overall)	2/19	
Tricuspid valve regurgitation (overall)	2/19	

Table 2 shows all echocardiographic findings in WBS patients submitted to cardiologic evaluation. PPAS: peripheral pulmonary artery stenosis; VSD: ventricular septal defect, SVAS: supra-avalvular aortic stenosis

Table 3 - Clinical features that achieved statistical significance

Clinical features	Positive results	Negative results	<i>p</i>-value after Fisher's exact test
Prominent lips			
+	20	4	0.0003
-	1	8	
Friendly personality			
+	19	6	0.0152
-	2	6	
Pulmonary stenosis*			
+	8	0	0.0292
-	11	9	
Weight under 3rd centile			
+	1	5	0.0158
-	20	7	

Table 3 shows clinical features that achieved statistical significance after Fisher's exact test. + present; - absent. *Echocardiography was not performed in 3 patients with negative results and in 2 WBS patients.

Supplementary Table: Protocol for clinical analysis

History data
1. Family history of WBS
2. Family history of common features of WBS
<u>Development and intelligence</u>
3. Developmental delay
4. Cognitive deficit
5. Normal intelligence
<u>Behavior</u>
6. Friendly behavior
7. Hypersensitivity to sound
<u>Diseases</u>
8. Hypertension
9. Ischemic stroke
10. Diabetes mellitus
11. Rectal prolapse
12. Hypothyroidism
13. Documented hypercalcemia
<u>Supplementary examinations</u>
14. Echocardiogram
15. Renal ultrasound

Physical Examination

Measurements

16. Weight
17. Height
18. Head circumference

Clinical signs

19. Dry skin
20. Soft skin
21. Sparse hair
22. Light hair
23. Microcephaly
24. Brachycephaly
25. Trigonocephaly
26. Triangular face
27. Round face
28. Frontal bossing
29. Broad forehead
30. Facial asymmetry
31. Arched eyebrows
32. Synophrys
33. Impression of hypotelorism
34. Strabismus
35. Deep-set eyes
36. Periorbital fullness
37. Slanted palpebral fissures
38. Low-set ears
39. Small ears
40. Large ears
41. Prominent ears
42. Epicanthal folds
43. Stellate iris pattern
44. Broad nasal root
45. Depressed nasal root
46. High nasal root
47. Depressed nasal bridge
48. High nasal bridge
49. Small nose
50. Bulbous nasal tip
51. Anteverted nares
52. Malar hypoplasia
53. Small philtrum
54. Long philtrum
55. Downturned corners of mouth
56. Thin lips
57. Prominent lips
58. Malocclusion
59. High palate
60. Retrognathia
61. Prognathia
62. Short neck

63. Camptodactily of fingers
64. Clinodactily of 5th fingers
65. Single palmar crease
66. Hyperextensible joints
67. Hoarse voice
68. Cryptorchidism

7.4 Ocular features in 16 Brazilian patients with Williams-Beuren Syndrome (artigo publicado online na revista *Ophthalmic Genetics*)

RESEARCH REPORT

Ocular Features in 16 Brazilian Patients with Williams-Beuren Syndrome

Melissa Machado Viana¹, Maria Frasson², Henrique Galvão¹, Letícia Lima Leão¹, Martin Stofanko³, Higgor Gonçalves-Dornelas³, Pricila da Silva Cunha⁴, and Marcos José Burle de Aguiar¹

¹Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, ²Serviço de Retina, Hospital São Geraldo, Universidade Federal de Minas Gerais, ³Núcleo de Genética Médica (GENE), Minas Gerais, and ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Objectives: Williams-Beuren Syndrome (WBS) is a multisystem disorder caused by the deletion of contiguous genes on chromosome 7q11.23. Ophthalmologic abnormalities and deficits in visual motor integration are important features of WBS. Here we describe our experience with Brazilian WBS patients and their ophthalmologic features.

Methods: Sixteen patients with confirmed WBS went through thorough ophthalmologic examination.

Results: The most frequent ocular findings in our group of patients were stellate iris pattern (81.2%), hyperopic astigmatism (50%), hyperopia (37.5%), tortuosity of retinal vessel (37.5%) and strabismus (18.7%).

Conclusions: This is the second report of ophthalmologic abnormalities in a group of Brazilian individuals with WBS. It is extremely valuable that specific populations are studied so that clinical diagnosis can be refined and management of patients can be driven to the most common presentations of the disease.

Keywords: 7q11.23, microdeletion, ocular features, Williams-Beuren syndrome

INTRODUCTION

Williams-Beuren Syndrome (WBS – OMIM #194050)¹ is a multisystem disorder caused by the deletion of 26–28 contiguous genes, including elastin gene (*ELN*), on chromosome 7q11.23.² Its prevalence is estimated as 1/7500³ and its classic form includes: dysmorphic facial features (100%), intellectual disability (75%), cardiovascular disease [most commonly supravalvular aortic stenosis (80%)], infantile hypercalcemia (15%) and a unique personality and cognitive profile (90%).^{4,5} Ophthalmologic abnormalities and deficits in visual motor integration are common and important features of WBS.⁵ Stellate iris pattern occurs in 70% of WBS patients and is one of the facial features in a

diagnostic scoring method proposed by the American Academy of Pediatrics (AAP)⁴ in order to establish clinical diagnosis. Strabismus (usually esotropia) typically affects 50% of infants and it is also present at AAP's diagnostic scoring table. Hyperopia is present in 50% of individuals and tortuosity of retinal vessels is reported in 20%.⁵

However, there are differences in clinical presentations of well delineated syndromes (such as WBS) in distinct populations.^{6–9} Brazilians, being one of the most heterogeneous populations in the world due to more than 5 centuries of interethnic crosses between Europeans, Africans and Amerindians,¹⁰ must be studied in order to determine their own most prevalent clinical features in a given disease. To the best

Received 21 October 2013; accepted 7 December 2013; published online 13 January 2014

Correspondence: Melissa Machado Viana, Alameda Álvaro Celso, 271, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30150-260, Brazil. Tel: +553132440558. E-mail: mmviana@ufmg.br

of our knowledge, the only article of ocular features in Brazilian patients with WBS was published by Sugayama and colleagues in 2002.¹¹

Here we describe an extensive range of ophthalmologic features in 16 Brazilian patients tested positive for WBS using a novel diagnostic method developed in Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Sixteen patients with WBS were evaluated by an experienced ophthalmologist after being referred to a public genetic center in Minas Gerais, Brazil. Medical charts of all patients were analyzed; clinical history was obtained through parents and/or caregivers. The research protocol was approved by Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. All parents signed informed consent forms. Thorough ophthalmologic examination including best correct visual acuity, anterior segment biomicroscopy, ceratometry, tonometry, indirect binocular ophthalmoscopy and fundus photography was performed.

WBS was confirmed by Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) in four cases as described.¹² In the remaining 12 patients, WBS was detected as outlined in Stofanko and co-authors (2013).¹³ Briefly, WBS patients were tested using a combination of PCR-based methods including the novel Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR (MQF-PCR), loss of heterozygosity of four polymorphic microsatellites and Real-Time quantitative PCR as described by Stofanko and co-authors (2013).¹³ Loss of heterozygosity of *ELN* and *LIMK1* was confirmed in all cases.

RESULTS

Out of 16 patients, 10 were female (62.5%) and 6 were male (37.5%). Mean age was 17.4 years (median age: 15.7), ranging from 5–40 years. All patients had intellectual disability and developmental delay. Clinical features, such as facial dysmorphisms, cardiovascular abnormalities, cognitive and behavioral profile, were typical of WBS (data not shown). The most frequent ocular findings are summarized in Table 1 and a complete list can be found in Table 2.

Strabismus was observed in three of our patients (18.7%); all had esotropia (one small-angle, one medium-angle, and one intermittent esotropia). One patient had cataract, one had epicanthal folds, one had a subconjunctival cyst, one had epiphora and one had suspected glaucoma (6.2%, each).

Anterior segment biomicroscopy revealed 13 patients (81.2%) with stellate iris pattern (Figure 1A), 1 with floccular opacities, one with suspected megalocornea (along with increased disc excavation and

TABLE 1. Most frequent ocular findings.

Ocular findings	Present study (%)	Winter 1996 ¹⁹	AAP 2001 ⁴	Sugayama 2002 ^{11,*}
Stellate iris pattern	81.2	74	NM	50
Visual acuity 20/20	73.3	NP	NM	NP
Hyperopic astigmatism	50.0	NP	NM	NP
Hyperopia	37.5	NP	50	NP
Tortuous retinal vessels	37.5	22	NM	50
Ceratometry ≥ 45.00	35.7	NP	NM	NP
Strabismus	18.7	54	50	50
Optic disk hypoplasia	12.4	NP	NM	6

*Only FISH-positive patients included. NM, not mentioned; NP, not performed.

intraocular pressure), one with ocular asymmetry and one with keratoconus (KTCN) – 6.2%, each. As can be observed, some patients had more than one ocular feature (Table 2).

Visual acuity was measured in all but one patient. Eleven patients (73.3%) had 20/20 best corrected visual acuity in both eyes (OU, *oculus uterque*), three (20%) had acuity of 20/30 in OU and one had 20/200 acuity in his left eye (LE) [in his right eye (RE), visual acuity was worst than 20/400].

Ceratometry was performed on OU in 13 subjects and was impracticable in the RE of the KTCN's patient. Medium ceratometry values were equal or greater than 45.00 in the RE of three patients (23.1%) and in the LE of five individuals (35.7%).

The most frequent refraction error in our sample was hyperopic astigmatism, with a prevalence of 50%. Hyperopia was found in six individuals (37.5%); mild astigmatism and irregular astigmatism were observed in one patient each (6.2%).

Ocular tonometry was normal in all patients. Seven individuals (43.7%) had tonometry values of 12 mmHg on OU. Tonometry values ranged from 10–16 mmHg.

Indirect binocular ophthalmoscopy revealed normal vitreous, macula and choroid in all patients. Fifteen patients (93.7%) had normal color optic disc, one (6.2%) had increased excavation, two (12.4%) had optic disk hypoplasia. Retinal examination showed normal caliber vessels in 10 patients (62.5%) and tortuous vessels in six individuals (37.5%) (Figure 1B). Fourteen patients (87.5%) had normal fundus. One patient (6.2%) had peripheral retinal degeneration.

All patients with ophthalmologic abnormalities were treated as usual.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the second report of ophthalmological findings in a population of Brazilian WBS patients. The first article of ocular features in Brazilian patients with WBS was published by Sugayama and colleagues in 2002.¹¹ The authors

TABLE 2. All ocular findings in 16 Brazilian WBS patients.

Patient	Sex	Age	Other Ophthalmol. findings	Biomicroscopy	Visual acuity RE	Visual acuity LE	Refraction errors	Tonometry	Papilla	Vessels	Retina	Medium Ceratometry RE	Medium Ceratometry LE
1	F	34y3m	Cataract	SIP	20/30	20/30	Hyperopic astigmatism	12 OU	Optic disk hypoplasia	N	N	NP	NP
2	F	5y1m	Epicantthal folds	SIP	*	*	Hyperopia	N (bidigital)	N	T	N	45.00	45.00
3	F	21y9m	Subconjunctival cyst	SIP	20/20	20/20	Hyperopic astigmatism	14, 13	N	N	N	42.50	42.50
4	M	9y6m	-	SIP	20/20	20/20	Hyperopia	12 OU	N	N	Peripheral degeneration	44.75	45.25
5	F	5y5m	-	SIP	20/20	20/20	Hyperopia	10 OU	N	T	N	45.00	45.50
6	M	9y1m	-	SIP	20/20	20/20	Hyperopic astigmatism	12 OU	Optic disk hypoplasia	N	N	41.50	41.25
7	M	15y6m	-	SIP	20/20	20/20	Hyperopic astigmatism	14 OU	N	T	N	42.50	42.50
8	M	15y11m	-	SIP; cataract, floccular opacities	20/20	20/20	Hyperopic astigmatism	14 OU	N	T	N	43.75	43.50
9	F	14y5m	Epiphora	SIP	20/20	20/20	Mild astigmatism	IM	N	T	N	43.25	43.00
10	F	15y11m	Glaucoma?	Megalocornea?	20/20	20/20	Hyperopia	16 OU	Increased excavation	N	N	41.25	40.25
11	F	14y1m	-	SIP	20/20	20/20	Hyperopia	12 OU	N	N	N	45.25	45.75
12	M	16y7m	Strabismus	SIP	20/30	20/30	Hyperopic astigmatism	12 OU	N	N	N	41.50	42.50
13	F	23y6m	-	SIP	20/20	20/20	Hyperopic astigmatism	12 OU	N	T	N	42.25	43.00
14	F	14y11m	Strabismus	Ocular asymmetry	20/30	20/30	Hyperopic astigmatism	14 OU	N	N	N	NP	NP
15	F	18y6m	Strabismus	SIP	20/20	20/20	Hyperopia	12 OU	N	N	N	43.75	43.75
16	M	40y9m	KTCN	KTCN	20/400	20/200	Irregular astigmatism	14, 12	N	N	N	IM	48.00

y: years; m: months; *: patient with absent speech; -: Absent; NP: Not Performed; SIP: Stellate Iris Pattern; N: Normal; RE: Right Eye; LE: Left Eye; OU: *oculus uterque*; KTCN: Keratoconus; IM: Impracticable; T: Tortuous Vessels. Vitreous, macula and choroid were normal in all patients.

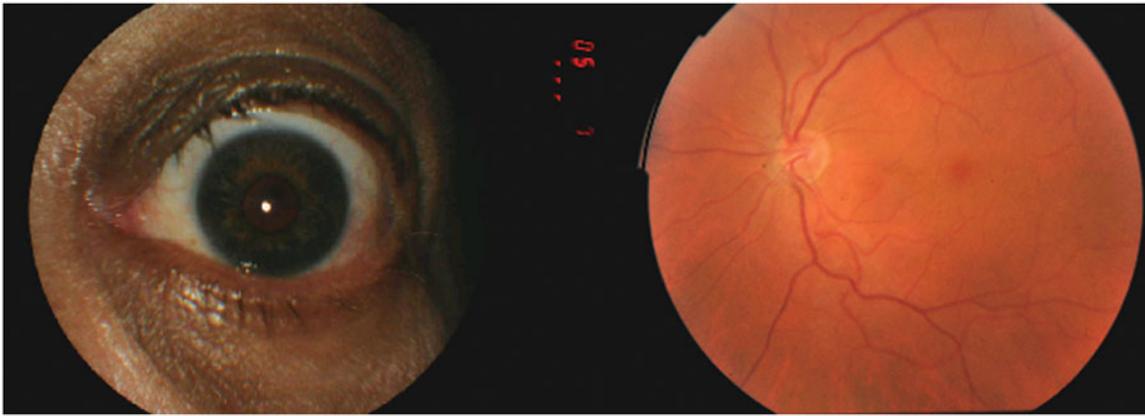


FIGURE 1. Images of (left) stellate iris pattern and (right) tortuous retinal vessels.

reported a limited number of ocular features in 17 patients tested positive for the 7q11.23 deletion using the standard LSI ELN FISH probe (Vysis, Inc.). Unfortunately, they included results of three cases that were not hemizygous for the LSI ELN probe and did not perform additional tests aimed at delineation of the WBS deletion interval. Despite showing most of the clinical symptoms of WBS (apart from cardiopathy), these cases should be considered as atypical cases of WBS, which may have resulted in misleading overall conclusions by Sugayama and co-authors (2002).¹¹ This work was followed by studies on cardiovascular abnormalities, renal and urinary findings, voiding-dysfunction, cognitive and behavioral phenotype, body mass index and anthropometric measurements.^{14–18} However, no other report of ophthalmologic findings in a Brazilian population has been published.

Here we present an extensive set of ophthalmologic data for 16 patients positive for 7q11.23 deletion, out of which 12 patients were diagnosed using a molecular detection method developed for the public healthcare system in Brazil and four patients diagnosed through FISH. All patients studied share typical clinical symptoms of WBS and upon molecular testing showed hemizygous deletion at the WBS critical region. The most frequent ocular findings in our group of patients were stellate iris pattern (81.2%), hyperopic astigmatism (50%), hyperopia (37.5%), tortuosity of retinal vessel (37.5%) and strabismus (18.7%). Table 1 shows a comparison between our findings and data from previous reports.

Stellate iris pattern is usually found in 74% of WBS patients¹⁹ with slit lamp examination (which is the gold standard test to detect such feature) and is a manifestation of hypoplasia and coarse architecture of the iris stroma.^{5,20} Our rate was slightly higher when compared to the overall prevalence and much higher than Sugayama and colleagues (2002) who found stellate iris pattern in 50% of their FISH-positive patients.¹¹

The most common refraction error found in WBS patients is hyperopia with a frequency of 50%.⁴ We found hyperopia in 37.5% of our patients. Differently from other reports, the most frequent refraction error in our sample was hyperopic astigmatism, with a prevalence of 50%.

Strabismus is a common feature of WBS and was observed in 18.7% of our patients. Sugayama and colleagues (2002)¹¹ found strabismus in 50% of their FISH-positive patients, a similar rate found in other reports.^{4,5,19} Since strabismus is more frequent in childhood, there is a possibility that our older mean age of 17.4 years (median age of 15.7) may be the reason for a low rate of squint. The most frequent form of strabismus in WBS is esotropia¹⁹ and our data is not different from most reports.

Tortuosity of retinal vessels was found in 37.5% of our patients, which has been previously described.^{5,11,19} This abnormality is probably related to elastin arteriopathy, which is an important aspect of WBS pathogenesis.¹⁹

One patient had visual acuity of 20/200 associated with KTCN. He also had a history of acute KTCN on his RE. KTCN is not regularly described as part of WBS. To our knowledge, this is the third case of KTCN associated with WBS.²¹

WBS is a microdeletion syndrome and 26–28 genes are usually deleted at 7q11.23 region. As discussed, some of the ophthalmological findings of WBS patients can be associated with *ELN* haploinsufficiency, the most important deleted gene in WBS that encodes elastin. However, we believe that an association between *LIMK1* and KTCN is possible.²¹ The fact that we found 35.7% of subjects with keratometry equal or greater than 45.00 in at least one eye can be suggestive that KTCN must be investigated on a regular basis in WBS patients, since values above 46.00 are suggestive of KTCN.

The majority of our patients had normal color optic disc (93.7%) and normal fundus (87.5%). Two had optic disk hypoplasia. Sugayama and co-authors (2002)¹¹ also found one WBS patient with optic

disk hypoplasia. One patient, a 9-year-old male, had peripheral retinal degeneration. We found no other reports of retinal degeneration in WBS patients.

One patient, a 34-year-old female, had cataract. Another patient, a 15-year-old male, had floccular opacities suggestive of cataract. Cataracts have been reported in adults with WBS.²² Glaucoma was suspected in a patient with increased papilla excavation. And another patient had megalocornea. These findings are uncommon in WBS patients. However, they are relatively frequent in the general population. One patient had epiphora and narrowing of lacrimal duct which have been previously reported.² Two patients had ocular dysmorphisms usually found in WBS individuals: epicanthal folds and ocular asymmetry due to facial asymmetry.⁵

Yau and colleagues (2004)⁶ stated that most published studies on WBS included only patients from western countries and that was the reason why the authors wanted to describe clinical characteristics of WBS in the Chinese population. They hypothesized that, among other reasons, some of the discrepancies they observed could reflect a genuine ethnic difference in genetic background that plays a role in modifying the phenotypic manifestation of the microdeletion. Brazilians, being one of the most heterogeneous populations in the world,¹⁰ must be studied in order to determine their own most prevalent clinical features in a given disease.

We believe that our extensive evaluation of ocular findings in patients with WBS has contributed to an increase in clinical expertise resulting in better management of patients. We propose ophthalmologic evaluation at time of diagnosis to be mandatory for every individual with suspected WBS and follow-up should be based on specific findings.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Molecular analysis was performed as a part of the project "Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção no SUS," granted by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

1. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 194050: Date last edited: 07/12/2013. World Wide Web URL: <http://omim.org/>
2. Pober BR. Williams-Beuren Syndrome. *N Engl J Med* 2010; 362:239–252.
3. Strømme P, Bjørnstad P, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol* 2002;17:269–271.
4. American Academy of Pediatrics (Committee on Genetics). Health Care Supervision for Children with Williams Syndrome. *Pediatrics* 2001;107:1192–1204.
5. Morris CA. Introduction: Williams Syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C:203–208.
6. Yau EKC, Lo IFM, Lam STS. Williams-Beuren syndrome in the Hong Kong Chinese population: retrospective study. *Hong Kong Med J* 2004;10:22–27.
7. Figueroa JR, Rodriguez LMO, Hach JLP, et al. Cardiovascular spectrum in Williams-Beuren syndrome. *Tex Heart Inst J* 2008;35:279–285.
8. May PA, Gossage JP, Smith M, et al. Population differences in dysmorphic features among children with fetal alcohol spectrum disorders. *J Dev Behav Pediatr* 2010;31:304–316.
9. Patil, SJ, Madhusudhan BG, Shah S, et al. Facial phenotype at different ages and cardiovascular malformations in children with Williams-Beuren syndrome: a study from India. *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:1729–1734.
10. Parra, FC, Amado, RC, Lambertucci, JR, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 2003;100:177–182.
11. Sugayama SMM, Sá LCF, Abe KT, et al. Anormalidades oculares em 20 pacientes com síndrome de Williams-Beuren. *Pediatrics* 2002;24:98–104.
12. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, et al. Hemizygosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 1993;5:11–16.
13. Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha OS, et al. Simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for detection of microdeletion and microduplication syndromes. *PLoS ONE* 2013;8:e61328.
14. Sugayama SMM, Moisés RL, Wagenfur J, et al. Williams-Beuren Syndrome. Cardiovascular abnormalities in 20 patients diagnosed with fluorescence in situ hybridization. *Arq Bras Cardiol* 2003;81:468–473.
15. Sugayama SMM, Koch VHK, Furusawa EA, et al. Renal and urinary findings in 20 patients with Williams-Beuren syndrome diagnosed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 2004;59:272–277.
16. Sammour ZM, Gomes CM, Duarte RJ, et al. Voiding-dysfunction and the Williams-Beuren Syndrome: a clinical and urodynamic investigation. *J Urol* 2006;175:1472–1476.
17. Teixeira MCTV, Monteiro CRC, Velloso RL, et al. Fenótipo comportamental e cognitivo de crianças e adolescentes com síndrome de Williams-Beuren. *Pró-Fono Revista de Atualização Científica* 2010;22:215–220.
18. Nogueira RJN, Zimmerman LF, Moreno YMF, et al. Anthropometric and body-mass composition suggests an intrinsic feature in Williams-Beuren syndrome. *Rev Assoc Med Bras* 2011;57:681–685.
19. Winter M, Pankau R, Amm M, et al. The spectrum of ocular features in the Williams-Beuren syndrome. *Clin Genet* 1996;49:28–31.
20. Pober BR, Morris CA. Diagnosis and management of medical problems in adults with Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet Part C* 2007;145C:280–290.
21. Viana MM, Frasson M, Leão LL, et al. A new case of keratoconus associated with Williams-Beuren syndrome. *Ophthalmic Genetics* 2013;34:174–177.
22. Cherniske EM, Carpenter TO, Klaiman C, et al. Multisystem study of 20 older adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet A* 2004;131:255–264.

7.5 Using phenotype to indicate a low cost diagnostic test for Velocardiofacial Syndrome in Brazilian Patients (em preparação para envio à revista *Journal of Community Genetics*)

**Using phenotype to indicate a low cost diagnostic test for Velocardiofacial Syndrome in
Brazilian patients**

Melissa M. Viana^{1*}, Letícia L. Leão¹, Martin Stofanko², Higgor Gonçalves-Dornelas², Pricila
da S. Cunha³, Marcos J. B. de Aguiar¹

1- Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade
Federal de Minas Gerais

2- Núcleo de Genética Médica (GENE), Minas Gerais

3- Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

***Corresponding author:** Melissa Machado Viana. Address: Alameda Álvaro Celso, 271.
Belo Horizonte, Minas Gerais. 30150-260. Brazil. mmviana@ufmg.br. +553132440558

Running Title: Phenotype and low cost test for Velocardiofacial Syndrome

ABSTRACT

Objectives: Velocardiofacial syndrome (VCFS) is one of the most common multiple anomaly syndromes in humans with an estimated prevalence of 1:2000-1:7000. It has an extremely broad phenotypic spectrum. Its diagnostic strategies are often complex and expensive. Since Brazil has a public healthcare system that demands cheaper diagnostic methods, the objective of this report is to describe our experience in clinically identifying VCFS patients and confirming our diagnostic hypothesis through a set of molecular tests suitable for our country.

Methods: A total of 31 patients with suspected VCFS took part in the trial. Oral swab samples were collected, DNA was extracted and submitted to a combination of simple molecular detection tests including Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (MQF-PCR). **Results:** The main reasons for indicating molecular testing were facial dysmorphisms (100%), velopharyngeal and laryngeal abnormalities (64.5%), cardiac malformations (51.6%). Four individuals tested positive for VCFS (3 males, 1 female; mean age 8.9 years). Among the positive results, 2 patients were tested for VCFS because of velopharyngeal and laryngeal abnormalities and 2 because of cardiac malformations. The most frequent dysmorphisms observed in our positive cases were dysmorphisms of nose and ears. Diagnostic yield of phenotype associated with MQF-PCR was 12.9%. **Conclusions:** Since there is extreme phenotypic variability and there are no well established diagnostic criteria, diagnosing VCFS depends on confirmatory molecular tests. We obtained a satisfactory diagnostic yield when clinical features were associated with a low-cost PCR method. We find important to study specific populations so that clinical diagnosis can be refined, management of patients can be driven to the most common presentations of the disease and laboratory tests can be adapted to the economic reality in which the populations live.

Key words: Velocardiofacial syndrome, phenotype, PCR, Diagnostic yield.

INTRODUCTION

Velocardiofacial syndrome (VCFS, OMIM: 192430) is a microdeletion syndrome caused by a deletion of approximately 35 genes within the long arm of chromosome 22 at band 11 (Scambler et al., 1992). It is one of the most common multiple anomaly syndromes in humans with an estimated prevalence of 1:2000-1:7000 (Shprintzen, 2008). VCFS has an extremely broad phenotypic spectrum. More than 180 clinical features have been described (Robin & Shprintzen, 2005). Congenital heart disease (Tetralogy of Fallot – TF, TF with pulmonary atresia, ventricular septal defect – VSD, type B interruption of aortic arch, truncus arteriosus), palatal anomalies (submucous cleft palate, occult submucous cleft palate, velopharyngeal insufficiency and hypernasal speech), developmental disorders, psychiatric diseases (psychosis, autism spectrum disorder, schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder - ADHD) and immunodeficiency are the most frequent clinical features of VCFS (Shprintzen, 2008; Momma, 2010; Marom et al., 2012). Virtually every organ system can be affected: ocular, cranial, limb, anal, brain, renal, spine and skeletal anomalies have been described; platelet and thyroid disorders and hypoparathyroidism are also linked to VCFS (Shprintzen, 2008). The phenotype therefore shows markedly variable expression and no single clinical feature occurs in 100% of cases and there is no reported case of the syndrome that has all or even most of the clinical findings (Shprintzen, 2008).

Because of the broad spectrum of anomalies and phenotypic variability (within a population and in distinct populations), clinical diagnosis is often difficult. There are a number of laboratory techniques used to confirm VCFS clinical suspicion. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is widely used and considered the gold standard for 22q11.2 deletion molecular diagnosis. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), microsatellite DNA markers and array comparative genomic hybridization (aCGH) are also

methods that can be used for VCFS diagnosis (Shprintzen, 2008). However, these diagnostic strategies are often quite complex, demand specialized equipment and are expensive.

Brazil has a public healthcare system (SUS - *Sistema Único de Saúde*) that covers medical expenses for 80% of the population (Castilla & Luquetti, 2009) and demands cheaper diagnostic methods. In Brazil, the only genetic test currently available in SUS for congenital defects investigation is karyotyping. For our reality, genetic diagnosis based on clinical suspicion and testing focused at specific targets is more appropriate than genome wide screening procedures. Thus, the objective of this report is to describe our experience in clinically identifying VCFS patients and confirming our diagnostic hypothesis through a set of molecular tests suitable for Brazil or any developing country.

MATERIAL AND METHODS

Between January/2005 and September/2012, 3,239 patients were evaluated for the first time at a SUS genetic center in Minas Gerais, Brazil. The medical charts were analyzed and a total of 46 patients with suggestive clinical features of VCFS were selected; 31 accepted to take part in the trial. The suspected individuals underwent a thorough physical examination. The research protocol was approved by Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG); all parents signed informed consents.

A total of 31 oral swab samples were collected, the DNA was extracted following salting-out protocol and submitted to Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR (MQF-PCR), which was developed for diagnosis of human microdeletion/microduplication syndromes in Brazil (Laitinen et al., 1994; Stofanko et al., 2013). Deletion of the 22q11.2 critical region was determined using MQF-PCR and Real-Time quantitative PCR as described (Weksberg et al., 2005; Hughes et al., 2007; Stofanko et al., 2013). Additionally, the samples were evaluated for loss of heterozygosity in 22q11.2

using *D22S264*, *D22S941*, and *D22S944* polymorphic microsatellite analysis as described in Stofanko et al. (2013).

RESULTS

Out of 31 individuals selected (13 males, 18 females; mean age 13.3 years; range from 7 months to 52 years), 4 were tested positive for VCFS (3 males, 1 female; mean age 8.9 years; range from 1 month to 15 years and 11 months). Table 1 shows the most frequent clinical features of patients that tested positive and negative for VCFS. The diagnostic yield obtained with this methodology (phenotype and MQF-PCR) was 12.9%.

The main reasons for indicating VCFS molecular testing were nasal dysmorphisms (all patients had some sort of nasal dysmorphism), velopharyngeal and laryngeal abnormalities (64.5%), dysmorphisms of ears (51.6%) and cardiac malformations (35.5%).

Velopharyngeal and laryngeal abnormalities that warranted VCFS testing were hypernasal speech (25.8%), bifid uvula and/or cleft palate (25.8%), velopharyngeal weakness (9.7%) and laryngeal webs (3.2%).

Cardiac malformations that raised suspicion for VCFS were complex cardiac malformations (19.4%), coarctation of the aorta (9.7%) and TF (6.4%). Echocardiogram was not performed in 5 patients; normal echocardiograms were found in another 6 patients (1 patient with confirmed VCFS e 5 negative patients).

The most common facial dysmorphisms in suspected VCFS patients were nasal dysmorphisms (especially prominent nasal bridge – 32.3% - and bulbous nose – 29%) followed by dysmorphisms of ears (cupped and rotated ears), upslanted palpebral fissures (29%) and malar hypoplasia (25.8%). Microcephaly was also present in 25.8% of the patients.

Anecdotal evidence should not be a substitute for evidence-based approaches (McDonald-McGinn et al., 2011); however description of some illustrative cases can help

clinicians improve their abilities to suspect VCFS. Below we provide detailed description of the positive cases diagnosed in our study.

Patient 1

A 15 years 11 months old male was referred to Serviço Especial de Genética Médica (Hospital das Clínicas, UFMG), a Brazilian public genetic center, for evaluation because of facial dysmorphisms. Physical examination showed brachycephaly, high forehead, telecanthus, high nasal bridge, malar hypoplasia, protruding ears, long fingers, genu varum and hypernasal speech. Clinical history obtained through parents revealed developmental delay, especially in speech acquisition, and moderate cognitive deficit. Echocardiogram was normal. Magnetic Resonance Imaging (MRI) of the brain showed pituitary hypoplasia. Velopharyngeal insufficiency was noted through nasopharyngoscopy.

Patient 2

A 6 year-old male was referred for evaluation because of cardiac malformations. Echocardiogram examination revealed atrial septal defect (ASD), VSD, persistent ductus arteriosus, coarctation of the aorta, aortic arch hypoplasia, mild tricuspid insufficiency and aortic regurgitation. Physical examination showed cuped and posteriorly rotated ears, bushy eyebrows, long eyelashes, bulbous nasal tip, anteverted nares, hypoplasia of alae nasi, long philtrum, downturned corners of mouth, high arched palate, right single palmar crease, long and slender fingers. Clinical history revealed normal motor development and intelligence. Speech development was also normal in spite of electrophysiological signs of bilateral retrocochlear involvement.

Patient 3

A 13 years 6 months old female was referred to our center because of a complex cardiac malformation. Cardiovascular examination (through echocardiogram and cardiac catheterization) revealed right aortic arch, anomalous left branch of pulmonary artery

compressing left bronchus, ASD, VSD, bicuspid aortic valve, left pulmonary artery originating from right pulmonary artery, persistent left superior vena cava. Physical examination showed head circumference on -2 standard deviation (SD), downward palpebral fissures, protruding left ear, malar hypoplasia, bifid uvula, submucous cleft palate, hypernasal speech, hyperextensible joints and 5th fingers clinodactily. Clinical history revealed developmental delay, mild cognitive deficit and ADHD. Renal ultrasound, brain computed tomography, audiometry and ophthalmological evaluation were normal.

Patient 4

A newborn male was examined at UFMG's intensive care unit because of nasal obstruction, inspiratory stridor and respiratory distress. Nasopharyngoscopy revealed laryngeal web blocking glottis and mild collapse of arytenoid. Echocardiogram showed VSD, left ventricular and atrial enlargement. Transfontanel and abdominal ultrasound, ophthalmological evaluation and thorax radiographs were normal.

DISCUSSION

Brazil, one of the emerging economies in the world, has a public health system that demands accessible diagnostic approaches when compared to developed countries. We used a novel, inexpensive and reliable internally controlled diagnostic technique for VCFS diagnosis (Stofanko et al., 2013), which is targeting the 22q11.2 critical region and thus requires clinical expertise to make a diagnostic hypothesis before indicating the test.

The high cost-per-analysis of current standard methods for diagnosing human microdeletion and microduplication syndromes in developing countries was recently discussed by Dutra et al. (2012). The authors compared the results of MLPA (P029 commercial kit) and loss of heterozygosity assay using five polymorphic microsatellite markers in a group of 88 Brazilian patients with clinical suspicion of Williams-Beuren Syndrome (WBS), another microdeletion syndrome. They argued that a combination of both

techniques is an extremely valuable tool for the molecular diagnosis of WBS and that implementation of both methods should be considered, especially in developing countries where resources are limited. Our diagnostic approach involved an even more affordable combination of three simple targeted molecular techniques – the MQF-PCR, Real-Time quantitative PCR and microsatellite assay (Stofanko et al., 2013). All three methods provide results within a few hours, are easy to perform and have lower costs when compared to MLPA. Thus, we propose the use of our diagnostic strategy in molecular confirmation of patients with clinical suggestion of VCFS.

Diagnostic yield of the association ‘phenotype and MQF-PCR’ was 12.9%. Our results are in between that of two other Brazilian groups that studied VCFS. Rosa et al. (2008) evaluated patients with congenital cardiac malformations consecutively admitted to a Cardiac Pediatric Intensive Care Unit in Brazil and found a diagnostic yield of 2%. The diagnostic yield rose to 25% when Nogueira et al. (2009) tested only patients with conotruncal cardiac defects. Therefore, taking into account that we evaluated our patients in regards to most of the abnormalities related to VCFS spectrum, our diagnostic yield was satisfactory.

The scenario of VCFS diagnosis in SUS is a constant subject of studies for Brazilian geneticists. Vieira et al. (2013) presented a comprehensive portrayal of inequity among the different regions of the country in regards to 22q11.2 deletion diagnosis and proposed solutions to start planning a national approach for genetic testing in the Brazilian public health care system. Monteiro et al. (2013) proposed a new set of guidelines for screening patients with distinct manifestations of VCFS in a more cost-effective approach.

To develop clinical expertise and enhance clinical suspicion for VCFS it is necessary to perform studies on our own population since there are well documented differences in facial structures between ethnic groups (Hajnis et al., 1994).

Brazilian population, being one of the most heterogeneous in the world - result of five centuries of interethnic crosses between Europeans, Africans and Amerindians – (Parra et al., 2003), must be studied in order to determine their own most prevalent clinical features in a given disease. In fact, Moore et al. (2007) studied patients with Fetal Alcohol Spectrum Disorders and observed that the most heterogeneous group of patients (in regards to facial dysmorphisms) came from the populations with various levels of ethnic admixture.

The main reasons for indicating VCFS molecular testing in our patients were facial dysmorphisms (especially nasal dysmorphisms), velopharyngeal and laryngeal abnormalities (hypernasal speech cleft palate, bifid uvula, velopharyngeal insufficiency and laryngeal webs), cardiac malformations (complex cardiac malformations, TF and coarctation of the aorta). This is in conformity with McDonald-McGinn et al. (2010) when the authors stated that the most frequent significant clinical features in individuals with VCFS include congenital heart disease and palatal defects (approximately three-quarters of patients).

In regards to our positive cases, it is important to highlight a few observations. Case 1 is a patient with facial dysmorphisms, developmental delay, cognitive deficit, velopharyngeal incompetence and no cardiac abnormalities. The absence of cardiac malformations does not exclude VCFS (since 30% of patients do not have cardiovascular abnormalities) and the presence of velopharyngeal incompetence is an important evidence for clinicians. Case 2 is a patient with normal intelligence and normal motor development that presented with a complex cardiac malformation, most importantly a hypoplastic aortic arch, which is very suggestive of VCFS. Case 3 is the closest one can get to a typical VCFS patient: complex cardiovascular malformations, bifid uvula, submucous cleft palate, hypernasal speech, developmental delay, cognitive deficit and ADHD. Concerning case 4, the main reason for suspecting VCFS was laryngeal webs, which are infrequent in the overall population, but relatively common among VCFS patients – 1% to 8.6% (Leopold et al., 2012).

We find important to study specific populations so that clinical diagnosis can be refined, management of patients can be driven to the most common presentations of the disease and laboratory tests can be adapted to the economic reality in which the populations live. We believe that this experience can be extended to other genetic syndromes likely to be diagnosis by PCR or other targeted methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

Molecular analysis was performed as a part of the project "Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção no SUS", granted by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERENCES

- 1 Castilla EE, Luquetti DV. Brazil: Public Health Genomics. *Public Health Genomics* 2009; 12(1):53-8.
- 2 Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, Fonseca FM, Pieri PC, Jehee FS, Bertola DR, Kim CA. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Res Notes*. 2012; 5: 13-7.
- 3 Hajnis K, Farkas LG, Ngim RCK, Lee ST, Venkatadri G. Racial and ethnic morphometric differences in the craniofacial complex. In: Farkas LG editor. *Anthropometry of the Head and Face*. New York: Raven Press; 1994: p 201–18.
- 4 Hughes S, Weksberg R, Moldovan L, Squire JA. Use of quantitative PCR for the detection of genomic microdeletions or microduplications. In: S. Hughes and A. Moody , eds. *PCR: Methods Express*, 1st ed. UK: Bloxham, 2007. p 49-62.
- 5 Laitinen J, Samarut J, Holttä E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques*. 1994; 17: 320-322.
- 6 Leopold C, De Barros A, Cellier C, Drouin-Garraud V, Dehesdin D, Marie J-P. Laryngeal abnormalities are frequent in the 22q11 deletion syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012; 76: 36-40.
- 7 Marom T, Roth Y, Goldfarb A, Cinamon U. Head and neck manifestations of 22q11.2 deletion syndromes. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012; 268: 381-387.
- 8 McDonald-McGinn,DM, Kohut T, Zackai EH. Deletion 22q11.2 (Velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge Syndrome). In: Cassidy SB, Allanson JE, eds. *Management of Genetic Syndromes*, 3rd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010. p. 263-284.
- 9 McDonald-McGinn, DM; Sullivan, KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome). *Medicine*. 2011; 90(1): 1-18.

- 10 Momma, K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol.* 2010; 105:1617-1624.
- 11 Monteiro FP, Vieira TP, Sgardioli IC, Molck MC, Damiano AP, Souza J, Monlleó IL, Fontes MIB, Fett-Conte AC, Félix TM, Leal GF, Ribeiro EM, Banzato CEM, Dantas CR, Lopes-Cendes I, Lopes VLGS. Defining new guidelines for screening the 22q11.2 deletion based on a clinical and dysmorphic evaluation of 194 individuals and review of the literature. *Eur J Pediatr*, Jan 2013 [Epub ahead of print].
- 12 Moore ES, Ward RE, Wetherill LF, Rogers JL, Autti-Ramo I, Fagerlund A, Jacobson SW, Robinson LK, Hoyme HE, Mattson SN, Foroud T and the CIFASD. Unique Facial Features Distinguish Fetal Alcohol Syndrome Patients and Controls in Diverse Ethnic Populations. *Alcoholism. Clin Exp Res.* 2007; 31(10): 1707-13.
- 13 Nogueira Belangero SI, Belucco TS, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach MCSP, Melaragno MI. 22q11.2 deletion in patients with conotruncal heart defect and del22q syndrome phenotype. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 92(4):289-93.
- 14 On-line Mendelian Inheritance in Man (OMIMTM) [Internet]. Baltimore (MD): Johns Hopkins University (US). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- 15 Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS.* 2003; 100(1): 177-82.
- 16 Robin NH, Shprintzen RJ. Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *J Pediatr.* 2005; 147:90-96.
- 17 Rosa, RFM, Pilla CB, Pereira VLB, Flores JAM, Golendziner E, Koshiyama DB, Hertz MT, Ricachineysky CP, Roman T, Varella-Garcia M, Paskulin GA. 22q11.2

Deletion Syndrome in Patients Admitted to a Cardiac Pediatric Intensive Care Unit in Brazil. *Am J Med Genet Part A*. 2008; 146A:1655–61.

- 18 Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, et al. Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet* .1992;339(8802):1138-1139.
- 19 Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial Syndrome: 30 years of study. *Dev Disabil Res Ver*. 2008; 4(1):3-10.
- 20 Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha OS, Pena HB, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ. 2013. Simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for detection of microdeletion and microduplication syndromes. *PLoS ONE* 8(4): e61328.
- 21 Vieira TP, Sgardoli IC, Lopes VLGS. Genetics and public health: the experience of a reference Center for diagnosis of 22q11.2 deletion in Brazil and suggestions for implementing genetic testing. *J Community Genet*. 2013; 4:99–106.
- 22 Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*. 2005; 6(180): 1-10.

Legend for Table 1 - VCF: Velocardiofacial; pos: positive; neg: negative; M: male; F: female; y: years; m: months; Microc.: microcephaly; Small foreh.: small forehead; Upslant.: upslanted palpebral fissures; Ears: dysmorphisms of ears; Depress. Nasal bridge: depressed nasal bridge; Nares: dysmorphisms involving nares; Malr hypo.: malar hypoplasia; Microgn.: micrognathia; Long fing.: long fingers; Complex cardiop.: complex cardiopathy; TF: Tetralogy of Fallot; Coarc.: coarctation of aorta; Echoc. N: normal echocardiography; VP weak.: Velopharyngeal weakness; Bifid/cleft: bifid uvula and/or cleft palate; Lar. web: laryngeal webs; Hypern.: hypernasality; +: present; -: absent.

Table 1 – Most frequent clinical features of patients with suspected Velocardiofacial Syndrome.

Patient	VCF	Sex	Age	Microc.	Small foreh	Uplslant	Ears	Bulbous nose	High nasal bridge	Depress. nasal bridge	Nares	Malar hypo.	Microgn.	Long fing.	Complex Cardiop.	TF	Coarc.	Echoc. N	VP weak.	Bifid/cleft	Lar. web	Hypern
1	pos	M	15y11m	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
2	pos	M	6y	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
3	pos	F	13y6m	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
4	pos	M	7m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
5	neg	F	6y8m	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
6	neg	F	9y7m	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	neg	M	20y1m	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
8	neg	F	18y3m	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
9	neg	F	10m	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NP	-	-	-	-
10	neg	F	31y2m	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
11	neg	F	12y10m	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
12	neg	M	5y8m	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
13	neg	F	5y5m	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
14	neg	M	7y5m	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
15	neg	F	17y1m	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
16	neg	F	18y2m	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	neg	F	47y5m	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	neg	F	52y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
19	neg	M	14y4m	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	NP	-	-	-	-
20	neg	F	6y5m	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21	neg	M	10y4m	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
22	neg	F	13y5m	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NP	-	+	-	+
23	neg	F	12y10m	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	neg	F	1y2m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
25	neg	F	7m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
26	neg	M	18y4m	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	neg	M	16y6m	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NP	-	+	-	-
28	neg	F	1y7m	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	NP	-	-	-	-
29	neg	M	3y1m	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
30	neg	F	12y1m	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
31	neg	M	7m	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

7.6 Papel do fenótipo no diagnóstico das síndromes de Prader-Willi e Angelman determinadas por microdeleções, utilizando metodologia custo-efetiva em economias emergentes (em preparação para envio à revista Cadernos de Saúde Pública)

Papel do fenótipo no diagnóstico das síndromes de Prader-Willi e Angelman determinadas por microdeleções, utilizando metodologia custo-efetiva em economias emergentes

Melissa Machado Viana¹, Letícia Lima Leão¹, Martin Stofanko², Higgor Gonçalves-Dornelas², Pricila da Silva Cunha³, Marcos José Burle de Aguiar¹

1. Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais
2. Núcleo de Genética Médica (GENE), Minas Gerais
3. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

***Correspondência:** Melissa Machado Viana. Address: Alameda Álvaro Celso, 271. Belo Horizonte, Minas Gerais. 30150-260. Brazil. mmviana@ufmg.br. +553132440558

RESUMO

Objetivos: O Sistema Único de Saúde cobre despesas médicas para cerca de 80% da população brasileira e atualmente conta somente com métodos citogenéticos para diagnóstico em Genética Médica. O diagnóstico genético baseado em suspeita clínica, a qual indicaria a realização de testes direcionados a alvos específicos no genoma, mais econômicos, seria apropriado à realidade brasileira. Para testar tal hipótese, avaliamos a contribuição do fenótipo para o diagnóstico das síndromes de Prader-Willi (SPW) e Angelman (SA) por meio de uma técnica nova, econômica e dirigida especificamente para o diagnóstico de síndromes de microdeleções e microduplicações cromossômicas. **Metodologia:** Dentre 3.239 pacientes atendidos entre 2005 e 2012, um total de 12 pacientes com suspeita de SPW e 20 com suspeita clínica de SA aceitaram participar do estudo, todos com cariótipos normais. *Swabs* orais foram coletados, DNA foi extraído e submetido a uma nova e simples metodologia para diagnóstico de microdeleções/microduplicações. **Resultados:** Cinco pacientes foram positivos para SPW, conferindo um rendimento da associação do fenótipo à técnica utilizada igual a 41,7%. As características mais comuns foram obesidade (100%), hiperfagia, compulsão alimentar, fendas palpebrais inclinadas para cima, palato ogival e hipogonadismo (80%). Quatro pacientes foram confirmados com SA (rendimento igual a 20%) e as principais alterações encontradas foram riso imotivado (100%), prognatismo e estereotípias (75%). **Conclusões:** Os resultados obtidos mostram que o estudo do fenótipo associado ao uso de técnica com alvo permitiu o diagnóstico de pacientes com síndromes de microdeleção que não são diagnosticados quando se usa apenas o cariótipo. Os achados clínicos no grupo estudado foram compatíveis com o que é descrito em outras populações.

Palavras-chave: Síndromes de microdeleções/microduplicações, diagnóstico com alvo, fenótipo, Sistema Único de Saúde.

INTRODUÇÃO

Vivemos em um momento de explosão de métodos diagnóstico para doenças genéticas. Estes métodos podem ser direcionados a todo o genoma (diagnóstico amplo) ou voltados a uma região específica do DNA (diagnóstico com alvo ou *targeted*). Técnicas amplas, tais como cariótipo, sequenciamento e *array*-CGH (aCGH) são vantajosas ao permitir uma avaliação completa do genoma. Entretanto, as técnicas modernas com alta resolução são caras e seu uso sistemático é proibitivo para o cenário de economias emergentes, como o Brasil. Já as técnicas com alvo (como *Southern blotting*, FISH, PCR, MLPA) são mais viáveis para países com poucos recursos. É mais lógico e barato ter uma suspeita clínica e indicar um teste diagnóstico específico do que realizar uma varredura de todo o genoma humano em busca de alguma alteração.

O Brasil tem um sistema público de saúde peculiar, o Sistema Único de Saúde (SUS), que cobre despesas médicas de consultas, diagnóstico e tratamento para cerca de 80% da população brasileira (Castilla e Luquetti, 2009), o que torna a racionalização dos recursos econômicos despendidos na área muito importante. No entanto, há um hiato entre o seu desenvolvimento econômico recente e os recursos direcionados para diagnósticos dismórficos e genéticos. Hoje o recurso diagnóstico quase exclusivo na área é o cariótipo, o qual, embora de espectro amplo, tem baixa resolução.

Pensando em diminuir essa lacuna foi desenvolvido um método novo baseado em PCR para diagnóstico de microdeleções e microduplicações em humanos, a *Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (MQF-PCR) descrita por Stofanko et al. (2013). Trata-se de uma técnica dirigida especificamente para o diagnóstico de síndromes de microdeleções e microduplicações cromossômicas, mais econômica que as técnicas de espectro amplo com alta resolução. Esta metodologia é

fortemente dependente do fenótipo e de uma suspeita clínica bem fundamentada para ser custo-efetiva.

As síndromes de Prader-Willi (SPW; OMIM #176270) e de Angelman (SA; OMIM #105830) têm um papel de destaque em Genética Médica, porque foram dos primeiros exemplos de síndromes que evidenciaram o papel da impressão genômica na etiologia das doenças (Nicholls et al., 1989; Williams et al., 1990). Ambas podem ser determinadas por uma microdeleção no braço longo do cromossomo 15, na região 15q11-q13, a chamada região crítica para síndrome de Prader-Willi/Angelman – PWACR, do inglês *Prader-Willi/Angelman Critic Region* (Dagli et al, 2011; Cassidy et al, 2012). Isto ocorre em aproximadamente 75% dos casos em SPW e entre 65% e 75% em SA (Williams et al, 2010; Elena et al, 2012). Nos demais casos elas podem ocorrer por dissomia uniparental ou defeito no centro de *imprinting*. A SA pode ainda ser causada por mutações no gene *UBE3A* localizado em 15q11-q13 (Williams e Dagli, 2010; Cassidy e McCandless, 2010). A diferença molecular básica entre as duas doenças é ausência da expressão do material genético de origem paterna na SPW e do material de origem materna na SA (Williams e Dagli, 2010; Cassidy e McCandless, 2010).

Embora, na maioria dos casos, SPW e SA sejam determinadas por microdeleções cromossômicas, grande parte destas microdeleções são menores que a resolução habitual do cariótipo. Assim, a citogenética não é um método adequado para o seu diagnóstico. Sendo o cariótipo a única abordagem disponível rotineiramente no SUS, tais síndromes muitas vezes não são diagnosticadas corretamente. Esta deficiência é agravada pela inexistência também de outros métodos que avaliam os demais mecanismos patogênicos.

A SPW, com prevalência estimada em 1:10.000-30.000 (Whittington et al, 2001), é caracterizada por hipotonia grave e dificuldades alimentares no período neonatal, hiperfagia e desenvolvimento gradual de obesidade mórbida a partir da primeira infância, atraso nos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor e déficit cognitivo. Hipogonadismo, baixa

estatura e olhos amendoados, fendas palpebrais inclinadas para cima, diminuição do diâmetro bitemporal, estrabismo, mãos e pés pequenos são frequentes (Cassidy e Driscoll, 2009).

Já a SA, que acomete 1 indivíduo a cada 12.000-20.000 (Clayton-Smith e Pembrey 1992), é caracterizada por atraso grave nos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor e déficit cognitivo, atraso grave na fala, marcha atáxica e/ou tremores em membros, e um padrão comportamental inadequado e caracterizado por sorriso imotivado e frequente e excitabilidade. Microcefalia e convulsões são também vistos frequentemente (Williams et al., 2010). Dentre os dismorfismos mais comuns, é possível destacar braquicefalia, protrusão de língua, prognatismo, boca grande com espaçamento entre os dentes, estrabismo e olhos e pele claros (Dagli et al, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição do fenótipo para o diagnóstico de SPW e SA pela MQF-PCR em pacientes com cariótipos normais atendidos em um serviço de Genética ligado ao SUS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Entre 2005 e 2012, 3.239 pacientes foram avaliados pela primeira vez no Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). Os prontuários médicos desses indivíduos foram analisados e 16 pacientes possuíam características clínicas sugestivas de SPW e 34 de SA, todos com cariótipo normal. Doze (12) pacientes com suspeita de SPW aceitaram participar do estudo, o mesmo acontecendo com 20 pacientes com suspeita de SA. Termos de consentimento livre e esclarecido foram assinados por pais e/ou responsáveis de todos os pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Todos os participantes passaram por exame morfológico minucioso e peso, altura e perímetro cefálico foram mensurados.

As amostras de pacientes com suspeita tanto de SPW como de SA foram coletadas através de swab oral. O DNA foi extraído a partir de protocolo bem estabelecido (Laitinen et al, 1994) e posteriormente submetido à metodologia denominada Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (MQF-PCR) descrita por Stofanko et al (2013). Deleção da PWACR foi determinada através de MQF-PCR e PCR quantitativo em tempo real conforme já descrito (Weksberg et al., 2005, Hughes et al., 2007; Stofanko et al., 2013). A hemizigidade para 15q11-q13 foi confirmada em todos os casos positivos.

RESULTADOS

Todos os pacientes estudados apresentavam atraso nos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor. Foram coletadas 12 amostras de indivíduos com suspeita clínica de SPW (8 do sexo feminino, 4 do sexo masculino; idade média igual a 11,2 anos, variando de 2 anos e 1 mês a 22 anos e 6 meses). Das 12 amostras coletadas, 5 foram positivas (4 do sexo feminino, 1 do sexo masculino; idade média igual a 12,1, variando de 5 anos a 22 anos e 6 meses).

Os principais dados do fenótipo que levaram à realização do teste molecular para SPW foram obesidade e hipotonia neonatal (66,7% cada), hiperfagia e compulsão alimentar (58,3%) e hipogonadismo (50%). O hipogonadismo envolvia tanto a confirmação endocrinológica com exames complementares quanto a observação ao exame clínico de micropênis ou hipoplasia de pequenos lábios.

Dentre os casos confirmados, todos apresentavam obesidade à época da avaliação clínica. Havia relato de hiperfagia e compulsão alimentar em 4 pacientes (4/5, 80%) e de hipotonia no período neonatal em 3 (3/5, 60%). Hipogonadismo foi observado em 4 pacientes (4/5, 80%). Dentre os distúrbios, foram mais frequentes: fendas palpebrais inclinadas para cima e palato ogival (4/5, 80% cada), filtro nasolabial curto, pés planos e mãos pequenas (3/5, 60% cada), pés pequenos e olhos amendoados (2/5, 40% cada).

No que diz respeito à SA, foram coletadas 20 amostras de pacientes com suspeita da doença (15 do sexo feminino e 5 do sexo masculino; idade média igual a 8,9 anos, variando de 4 anos e 9 meses a 13 anos e 1 mês). Das 20 amostras coletadas, 4 foram positivas (todas do sexo feminino; idade média igual a 9,2 anos, variando de 6 anos e 10 meses a 11 anos e 4 meses).

As principais indicações clínicas para a realização do exame molecular para SA foram: sorriso imotivado (55%), estrabismo (40%) e alteração de marcha (40%). A alteração de marcha incluía desde marcha com base alargada até marcha francamente atáxica.

As características clínicas mais comuns nos pacientes confirmados com SA foram: sorriso imotivado (100%), prognatismo e estereotípias (3/4 pacientes, 75%), braquicefalia, microcefalia, bossa frontal, fendas palpebrais inclinadas para cima, olhos de implantação profunda, dedos das mãos afilados, alteração de marcha e ausência de fala em idade na qual esta já estaria bem estabelecida (2/4 pacientes, 50%).

DISCUSSÃO

Até o momento, o diagnóstico de SPW e SA no SUS somente pode ser feito quando ocorrem deleções significativas no braço longo do cromossomo 15, pois o único exame disponível é o cariótipo. Este exame apresenta baixa resolução para as microdeleções que são as causas mais comuns nestas duas síndromes. Também não estão disponíveis os métodos que avaliam dissomia uniparental, defeitos no centro do *imprinting* ou mutações no gene *UBE3A*. Assim, grande parte dos pacientes com estas síndromes não são diagnosticados com certeza, levando a tratamento inadequado (ou mesmo falta de tratamento) e dificuldades para o aconselhamento genético.

O presente trabalho mostra que o estudo do fenótipo associado a metodologia laboratorial adequada permitiu o diagnóstico de nove pacientes com SPW e SA, atendidos em um período de sete anos, que permaneciam sem diagnóstico em nosso serviço e contribuiu

para o fornecimento de adequado aconselhamento genético às famílias e diminuição da ansiedade advinda da falta de um diagnóstico de certeza.

Em relação à SPW, o rendimento da associação do fenótipo à MQF-PCR foi de 41,7%, mostrando que o fenótipo nesta síndrome é consistente e pode aumentar o rendimento do método. Este rendimento é superior ao descrito por Rauch et al (2006), que observaram que análises direcionadas a regiões-alvo (independente de qual método laboratorial utilizado) após exame clínico levaram a um diagnóstico em 20% dos casos estudados.

Na SA, o rendimento do método foi menor, 4/20 ou 20%, igual ao encontrado por Rauch et al. (2006).

Estes resultados são mais significativos quando se leva em consideração que os mesmos pacientes realizaram o cariótipo e não tiveram a deleção identificada.

O fenótipo de nossos pacientes foi compatível com o descrito na literatura. Para SPW, obesidade, hiperfagia, compulsão alimentar, hipogonadismo, fendas palpebrais inclinadas para cima e palato ogival, hipotonia no período neonatal, filtro nasolabial curto, pés planos e mãos pequenas, pés pequenos e olhos amendoados foram as características mais frequentes. Cassidy e Driscoll (2009) expõem que as manifestações maiores mais consistentes nessa síndrome são hipotonia, déficit cognitivo, hipogonadismo, hiperfagia e obesidade, dismorfismos faciais típicos e distúrbios de comportamento também característicos.

As características clínicas mais comuns em nossos pacientes com SA foram sorriso imotivado, olhos de implantação profunda, prognatismo, estereotípias, alteração de marcha e ausência de fala em idade na qual esta já estaria bem estabelecida em acordo com o descrito na literatura (Williams e Dagi, 2010, Williams et al., 2010).

É possível que tenhamos resultados falso-negativos, pois, como já abordamos, em cerca de 25% dos pacientes com SPW e em 25% a 35% dos pacientes com SA o mecanismo etiológico é diferente daquele diagnosticado pelo método aqui utilizado.

Os resultados obtidos mostram que o estudo do fenótipo associado ao uso da MQF-PCR permite o diagnóstico dos pacientes com síndromes de microdeleção que não são diagnosticados quando se usa apenas o cariótipo.

É importante o desenvolvimento da MQF-PCR e de outras metodologias alvo-específicas para o diagnóstico de síndromes de microdeleção, aumentando assim o arsenal diagnóstico disponível no SUS, com uma boa relação custo-benefício.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cassidy SB e Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17(1): 3–13.
2. Cassidy SB e McCandless SE. Prader-Willi syndrome. In: Cassidy SB, Allanson JE, editors. *Management of Genetic Syndromes.* 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010, p. 625-50.
3. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Genet Med.* 2012; 14 (1): 10-26.
4. Castilla EE, Luquetti DV. Brazil: Public Health Genomics. *Public Health Genomics* 2009; 12(1):53-8.
5. Clayton-Smith J e Pembrey ME. Angelman syndrome. *J Med Genet.* 1992; 29:412–5.
6. Dagli AI, Buiting K, Williams CA. Molecular and clinical aspects of Angelman syndrome. *Mol Syndromol.* 2011; 2: 100-12.
7. Elena G, Bruna C, Benedetta M, Stefania DC, Giuseppe C. Prader-Willi syndrome: clinical aspects. *Journal of Obesity.* 2012, Article ID 473941, 13 pages.
8. Hughes S, Weksberg R, Moldovan L, Squire JA. Use of quantitative PCR for the detection of genomic microdeletions or microduplications. In: S. Hughes and A. Moody , editors. *PCR: Methods Express.* UK: Bloxham; 2007, p 49-62
9. Laitinen J, Samarut J, Holtta E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques.* 1994;17:316, 318, 320-2.
10. Nicholls RD, Knoll JHM, Butler MG, Karam S, Lalande M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodissomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature.* 1989; 342:281-5.
11. On-line Mendelian Inheritance in Man (OMIM™) [database on the Internet]. Baltimore (MD): Jonhs Hopkins University (US). Available from:

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

12. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Huffmeier U, Thiel C, Ruschendorf F, Nurnberg P, Reis A, Trautmann U. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet Part A*. 2006; 140A:2063-74.
13. Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha OS, Pena HB, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ. Simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for detection of microdeletion and microduplication syndromes. *PLoS ONE*. 2013;8(4): e61328.
14. Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*. 2005; 6(180): 1-10.
15. Whittington JE, Holland AJ, Webb T, Butler J, Clark D. Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi syndrome in one UK Health Region. *J Med Genet*. 2001;38: 792-8.
16. Williams CA, Zori RT, Stone JW, Gray BA, Cantu ES, Ostrer H. Maternal origin of 15q11-13 deletions in Angelman syndrome suggests a role for genomic imprinting. *Am J Med Genet*. 1990;35(3):350-3.
17. Williams CA e Dagli AI. Angelman syndrome. In: Cassidy SB, Allanson JE, editors. *Management of Genetic Syndromes*. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010, p. 69-80.
18. Williams CA, Driscoll DJ, Dagli, AI. Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genet Med*. 2010; 12(7):385–95.

8 Discussão

Vivemos a era da genética, com o seu espectro de cobertura e importância reconhecidos pela sociedade. Simultaneamente, e atuando como causa e consequência, o número de exames diagnósticos, progressivamente mais amplos e acurados, aumenta de forma considerável. Grande parte desses exames é de varredura, explorando regiões diversas do genoma e até mesmo o genoma completo. Existe uma tendência impulsiva de solicitar exames de varredura do genoma para diagnóstico em pacientes com quaisquer sinais sugestivos de doenças genéticas, seja atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, déficit cognitivo ou malformações congênitas. Em muitos casos, tais exames têm real indicação. Entretanto, em várias outras circunstâncias, a indicação de um teste diagnóstico a partir da avaliação fenotípica constitui-se uma melhor opção.

Países emergentes, como o Brasil, não podem ficar alheios a essa revolução em curso. É necessário estar atualizado e atender à população de forma efetiva. Apesar disso, o custo de técnicas de varredura do genoma (como o aCGH), de forma rotineira, é proibitivo para um sistema público de saúde que cobre despesas médicas para cerca de 80% da população (Castilla e Luquetti, 2009). O mais adequado é que aspectos clínicos e econômicos sejam valorizados na definição dos métodos diagnósticos a serem utilizados. O diagnóstico genético baseado em dados clínicos e testes direcionados a alvos específicos é mais apropriado do que os procedimentos de triagem do todo o genoma nas situações mais frequentes. Para aplicar tais testes, no entanto, é necessário avaliar a relação fenótipo/genótipo nas diversas doenças a serem testadas, bem como a acurácia do método, para uma melhor avaliação custo/efetividade. A boa prática médica ensina que a solicitação de exames laboratoriais deve ser orientada pela suspeita clínica. Logo, ela não pode ser reduzida à utilização de exames de rastreamento de forma indiscriminada.

Este trabalho objetivou avaliar a contribuição do fenótipo para o diagnóstico por meio de um destes métodos com alvo, a MQF-PCR, contribuindo para a sua avaliação de custo e efetividade.

Dentre 3.239 pacientes atendidos pelo Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFGM, a partir de seus fenótipos, foram estudados 150 pacientes com suspeita diagnóstica de 14 síndromes de microdeleção e uma síndrome de microduplicação. Foram

diagnosticados 37 pacientes com as seguintes síndromes: Williams (21), Velocardiofacial (4), Angelman (4), Prader-Willi (5), Neurofibromatose 1 (1), WAGR (1) e Velocardiofacial 2 (1).

A taxa global de indicação adequada do método levando ao diagnóstico correto obtida no presente estudo foi de 24,7% quando se levou em consideração todas as síndromes de microdeleção estudadas. Tal achado é compatível com o encontrado por Rauch et al. (2006), que analisaram a taxa de diagnóstico de vários estudos genéticos (cariótipo convencional, *screening* subtelomérico, cariótipo molecular, estudos de inativação do X) e da avaliação morfológica seguida por indicação de método diagnóstico dirigido a alvo específico em um grupo de pacientes com atraso do desenvolvimento ou déficit cognitivo. Aqueles autores observaram que análises direcionadas a regiões-alvo (independente de qual método laboratorial utilizado) após exame clínico levaram a um diagnóstico em 20% dos casos estudados. Sugeriram, ainda, que todos os pacientes com atraso do desenvolvimento e/ou déficit cognitivo sejam submetidos a investigação clínica e exame morfológico e, posteriormente, encaminhados para a realização de análise *targeted*, considerada por eles uma medida com boa relação custo-benefício.

As síndromes com maior número de diagnósticos foram as de Williams, Prader-Willi/Angelman e Velocardiofacial. Isto, provavelmente, se deveu ao fenótipo daquelas síndromes serem mais familiares aos geneticistas e à maior prevalência das mesmas. O rendimento do método em relação a essas síndromes foi de 63,6% para a síndrome de Williams, 41,7% para Prader-Willi, 20% para Angelman e 12,9% para síndrome Velocardiofacial.

O menor rendimento do método na síndrome Velocardiofacial pode se dever ao menor conhecimento de seu fenótipo pelos geneticistas clínicos, pois, além de ser uma síndrome descrita mais recentemente (Shprintzen et al., 1978), o seu fenótipo é extremamente amplo sem qualquer característica patognomônica. Além disso, o serviço onde o trabalho foi realizado é um ambulatório geral e esta síndrome é mais facilmente encontrada em serviços de cardiologia (McDonald-McGinn et al., 2010)

Como o método detecta apenas as microdeleções, é possível que alguns casos de síndromes de Prader-Willi/Angelman não tenham sido diagnosticados, uma vez que as microdeleções são responsáveis por aproximadamente 75% dos casos em SPW e entre 65% e 75% em SA (Williams e Dagli, 2010; Cassidy e McCandless, 2010). Os demais casos são causados por outros mecanismos patogênicos, como dissomia uniparental, defeito no centro de *imprinting* e, no caso da SA, mutações no gene *UBE3A* (Williams e Dagli, 2010; Cassidy e

McCandless, 2010). Mesmo assim, os resultados obtidos no presente estudo foram satisfatórios e mostraram que o fenótipo nos pacientes estudados foi importante para o diagnóstico.

Para as demais 11 síndromes, 54 pacientes foram testados, no entanto, o número de pacientes estudados por síndrome foi pequeno bem como o número de pacientes diagnosticados. Isto foi influenciado pela baixa prevalência dessas doenças. Entre esses 54 pacientes, foram diagnosticados três pacientes: um com WAGR, um com velocardiofacial tipo2 e um com neurofibromatose. Assim, não foi possível avaliar a contribuição do fenótipo. No entanto, baseado nos resultados das síndromes mais frequentes, é provável que, estudado um número maior de pacientes, ele também se mostre útil.

Em um grande número de síndromes os fenótipos descritos são baseados em casos de países do hemisfério norte, especialmente caucasianos (Yau et al., 2004). Estes fenótipos podem ser modificados por fatores ambientais e étnicos. Assim, os fenótipos observados em populações distintas podem apresentar diferenças.

No Brasil, estudos populacionais que objetivem estabelecer a apresentação clínica mais comum de uma determinada doença são de fundamental importância, visto que a população brasileira é sabidamente ímpar: uma das populações mais heterogêneas do mundo, resultado de cinco séculos de cruzamentos interétnicos entre europeus, africanos e ameríndios (Parra et al., 2003), o que confere dismorfismos ligados à etnia brasileira que podem dificultar o reconhecimento de alterações dismórficas causadas por uma determinada síndrome.

A melhor definição dos fenótipos na população brasileira ajudará no desenvolvimento de *expertise* clínico, imprescindível para a abordagem proposta de implementação de testes genéticos no SUS: indicação clínica bem embasada associada a testes direcionados à hipótese diagnóstica. Ademais, o conhecimento de características clínicas de uma determinada população permite o desenvolvimento do manejo adequado das complicações mais prevalentes, principalmente antes do seu estabelecimento, o que é fundamental na prática da Genética Médica.

Não comparar um método de diagnóstico com alvo e outro método de varredura do genótipo fragiliza um pouco uma conclusão mais definitiva deste trabalho. Tendo em vista essa debilidade, o Serviço Especial de Genética do HC/UFMG iniciará, no segundo semestre de 2013/primeiro semestre de 2014, a utilização do aCGH para o diagnóstico de pacientes com dismorfismos múltiplos sem uma suspeita diagnóstica, quando poder-se-á fazer uma melhor avaliação crítica de ambos os métodos. No entanto, alguns desses métodos, como o

sequenciamento de genes, é também fenótipo-dependente, o que não ocorre com o aCGH. Dessa forma, o delineamento dos fenótipos nas diversas síndromes em nossa população é importante e certamente indispensável, mesmo para a utilização de métodos de varredura do genoma. Isto é verdadeiro, sobretudo, para as síndromes dismórficas e doenças determinadas por mutações em genes específicos e não por desbalanceamento genômico.

Na síndrome de Williams, a mais frequentemente suspeita entre as síndromes estudadas, os achados mais comuns foram lábios proeminentes, personalidade amigável, filtro longo clinodactilia de quintos dedos, fissuras palpebrais inclinadas para cima, hipersensibilidade a ruídos e padrão de íris estrelada, todos descritos na síndrome. Em relação às cardiopatias, 84% dos pacientes as apresentavam. Os achados preditivos de seu diagnóstico foram lábios proeminentes, personalidade amistosa e estenose da artéria pulmonar periférica, também descritos na síndrome. Tais achados mostram que não encontramos um fenótipo significativamente diferente daquele descrito na literatura e reforçam que a busca do fenótipo descrito na mesma é útil para o diagnóstico definitivo, embora ele seja muito variável de paciente para paciente, o que exige atenção do geneticista clínico ou pediatra. Durante a avaliação oftalmológica dos pacientes com síndrome de Williams, foi detectado um caso de ceratocone, o terceiro relatado na literatura mundial. Tal descoberta permitiu inferir sobre a relação entre *LIMK1*, um dos genes deletados na síndrome de Williams, e a patogênese do ceratocone.

Poder-se-ia também questionar o tamanho amostral, devido à raridade de tais doenças. Kruer e Steiner (2008) discutiram as dificuldades de aplicação da chamada “Medicina Baseada em Evidências” (MBE), quando se estuda doenças raras de origem genética. Os autores observaram que a MBE tem suas raízes na epidemiologia e é, por definição, composta por evidências que ganham força à medida que acumulam poder estatístico (Kruer e Steiner, 2008). No caso das doenças genéticas, existem, essencialmente, dois problemas que dificultam a aplicação da MBE: 1) a população de indivíduos com doenças genéticas raras é naturalmente pequena; e 2) quando é possível confeccionar um estudo com tamanho amostral adequado (por meio de estudos multicêntricos) a população estudada é normalmente heterogênea, o que também dificulta à aplicação da MBE (Evans e Khoury, 2007; Kruer e Steiner, 2008). Toriello e Goldenberg (2009) chegaram a afirmar que, no caso de doenças raras, um tamanho amostral grande o suficiente pode ser difícil, se não impossível, de ser obtido. Em nossa opinião, apesar de se tratar de uma amostra não probabilística, o número de pacientes estudados e diagnosticados não pode ser desprezado, pois se trata de uma amostra

de um dos principais ambulatórios de genética ligado ao SUS do país e abrangeu 3.239 pacientes ali atendidos no período de quase sete anos.

Trabalhos semelhantes a este, comparando os fenótipos identificados e os pacientes diagnosticados por diversos métodos, sejam alvo-específicos ou de varredura genômica, devem ser desenvolvidos para que possamos adquirir *expertise* na correlação fenótipo/genótipo e para utilizar racionalmente recursos diagnósticos.

Finalmente, o presente estudo permitiu que 37 famílias fossem definitivamente diagnosticadas, recebessem aconselhamento genético adequado e diminuíssem as sensações de incerteza e angústia que permeavam suas vidas há anos.

9 Conclusões

1. A avaliação fenotípica se mostrou útil para a utilização da MQF-PCR no diagnóstico de síndromes de microdeleções.
2. O rendimento líquido da associação fenótipo/genótipo foi de 24,7%, permitindo o manejo adequado dos pacientes e aconselhamento genético às famílias.
3. Dentre as síndromes testadas, as mais comumente encontradas foram: síndrome de Williams, síndromes de Prader-Willi/Angelman e síndrome Velocardiofacial.
4. A relação fenótipo/genótipo foi mais fidedigna nas síndromes de Williams e Prader-Willi.
5. Na síndrome de Williams, o fenótipo contribuiu para o acerto diagnóstico em 63,6% dos casos suspeitos e as principais características clínicas nos casos positivos foram lábios grossos (95,2%), personalidade amigável (90,5%), filtro nasolabial longo (61,9%), clinodactilia de 5º dedo em mãos (61,9%).
6. Na síndrome de Prader-Willi, o fenótipo conduziu ao diagnóstico em 41,7% dos casos suspeitos e, dentre os casos confirmados, todos apresentavam obesidade à época da avaliação clínica; hiperfagia, compulsão alimentar, hipogonadismo, fendas palpebrais inclinadas para cima e palato ogival estavam presentes em 80% dos casos; hipotonia no período neonatal, filtro nasolabial curto, pés planos e mãos pequenas estavam presentes em 60% dos pacientes.
7. O resultado observado na síndrome de Angelman foi satisfatório, havendo contribuição do fenótipo para o diagnóstico em 20% dos casos. As características clínicas mais comuns nos pacientes confirmados foram riso imotivado (100%), prognatismo e estereotipias (75%).

8. O resultado obtido com a síndrome Velocardiofacial foi também satisfatório, com uma contribuição do fenótipo para o diagnóstico em 12,9% dos casos. Dentre os pacientes com resultados positivos, 75% apresentavam malformações cardíacas e 50% apresentavam anormalidades velofaríngeas e laríngeas. Os dismorfismos mais frequentemente encontrados nos casos positivos foram dismorfismos de orelhas, hipoplasia malar e dedos das mãos longos (50%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Baraitser M, Winter RM. Color atlas of congenital malformation syndromes. London: Mosby-Wolfe; 1996. 233p.

Baty BJ, Blackburn BL, Carey JC. Natural history of trisomy 18 and trisomy 13: I. Growth, physical assessment, medical histories, survival and recurrence risk. *Am J Med Genet.* 1994; 49(2):175-88.

Bataglia A, Bianchini E, Carey JC. Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet.* 1999; 82:60-6.

Bejjani BA, Shaffer LG. Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Ann Rev Genomics Hum Genet.* 2008; 9:71-86.

Bell JT, Spector TD. A twin approach to unraveling epigenetics. *Trends Genet.* 2011; 27(3): 116-25.

Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma.* 1970; 30:215-27.

Cassidy SB, Morris, CA. Behavioral phenotypes in genetic syndromes: genetic clues to human behavior. *Adv Pediatr.* 2002; 49: 59-86.

Cassidy SB, McCandless SE. Prader-Willi syndrome. In: Cassidy SB, Allanson JE, editors. *Management of Genetic Syndromes.* 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010, p. 625-50.

Castilla EE, Luquetti DV. Brazil: Public Health Genomics. *Public Health Genomics* 2009; 12(1):53-8.

Clayes I, Holvoet M, Eyskens B, Adriaensens P, Gewillig M, Fryns JP et al. A recognisable behavioural phenotype associated with terminal deletions of the short arm of chromosome 8. *Am J Med Genet.* 1997; 74: 515-20.

¹ De acordo com Estilo Vancouver

Davenport ML. Turner syndrome. In: Cassidy SB, Allanson JE, editors. *Management of Genetic Syndromes*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010, p. 847-69.

Deak KL, Horn SR, Rehder CW. The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: variable expressivity and genomic complexity. *Clin Lab Med*. 2011; 31: 543-64.

Descheemaeker MJ, Swillen A, Plissart L, Borghgraef M, Rasenberg S, Curfs LM et al. The PraderWilli syndrome: A self-supporting program for children, youngsters and adults. *Genet Couns*. 1994; 5: 199–205.

Devriendt K, Vermeesch JR. Chromosomal phenotypes and submicroscopic abnormalities. *Human Genomics*. 2004; 1(2): 126-33.

Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH. A new trisomic syndrome. *Lancet*. 1960; 1:787-90.

Ehrlich HA, Gelfand DH, Saiki RK. Specific DNA amplification. *Nature*. 1988; 331:461-72.

Epstein CJ. Genetic counseling: statement of the American Society of Human Genetics ad hoc Committee on Genetic Counseling. *Am J Hum Genet*. 1975; 27(2): 241-42.

Evans J, Khoury MJ. Evidence based medicine meets genomic medicine. *Genet Med*. 2007; 9(12): 799-800.

Flore AL, Milunsky JM. Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability. *Semin Pediatr Neurol*. 2012; 19:173-180.

Fosberg LA, Absher D, Dumanski JP. Non-heritable genetics of human disease: spotlight on post-zygotic genetic variation acquired during lifetime. *J Med Genet*. 2013; 50:1–10.

Gazave E, Darré F, Morcillo-Suarez C, Petit-Marty N, Carreño A, Marigorta UM et al. Copy number variation analysis in the great apes reveals species-specific patterns of structural variation. *Genome Res*. 2011;21:1626-39.

Gilliam TC, Bucan M, MacDonald ME, Zimmer M, Haines JL, Cheng SV et al. A DNA segment encoding two genes very tightly linked to Huntington's disease. *Science*. 1987; 238: 950-52.

Holliday R. Epigenetics: an overview. *Dev Genet.* 1994; 15: 453-7.

Hook EB. Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstet Gynecol.* 1981; 58(3):282-5.

Hsu, TC. Mammalian chromosomes in vitro: 1. The karyotype of man. *J Hered.* 1952. 43: 167-72.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409(6822):860-92.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004; 431(7011):931-45.

Jehee FS, Takamori, JT, Medeiros PFV, Pordeus ACB, Latini FRM, Bertola DR et al. 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: e425-32.

Jones KL. *Smith's Recognizable patterns of human malformation.* 6th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. 954p.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992; 258:818-21.

Kriek M, White SJ, Bouma MC, Dauwense HG, Hansson KB, Nijhuis JV et al. Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet.* 2004; 41(4):249-55.

Kruer KC, Steiner RD. The role of evidence-based medicine and clinical trials in rare genetic disorders. *Clin Genet.* 2008; 74:197-207.

Laitinen J, Samarut J, Holtta E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques.* 1994; 17:316-22.

Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Acad Sci.* 1959; 248: 1721-2.

Lenhard W, Breitenbach E, Ebert H, Schindelbauer-Deutscher HJ, Henn W. Psychological benefit of diagnostic certainty for mothers of children with disabilities: Lessons from Down syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2005; 133A: 170-5.

Liehr T, Ewers E, Hamid AB, Kosyakova N, Voigt M, Weise A et al. Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J Histochem Cytochem*. 2011; 59:842–8.

Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR et al. Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS ONE*. 2007; (3):e327.

Malich S, Largo RH, Schinzel A, Molinari L, Eiholzer U. Phenotypic heterogeneity of growth and psychometric intelligence in Prader-Willi syndrome: Variable expression of a contiguous gene syndrome or parentchild resemblance?. *Am J Med Genet*. 2000; 91: 298–304.

Marques-Bonet T, Eichler EE. The evolution of human segmental duplications and the core duplicon hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2009;74:355-62.

McDonald-McGinn DM, Catania C, Saitta S, Kaplan P, Coppinger JJ, SHaffer L et al. Atypical 22q11.2 deletions. *Proc Greenwood Genet Cent*. 2008; 27: 106-7.

McDonald-McGinn DM, Kohut T, Zackai EH. Deletion 22q11.2 (Velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge Syndrome). In: Cassidy SB, Allanson JE editors. *Management of Genetic Syndromes*. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010, p. 263-284.

Merla G, Brunetti-Pierre N, Micale L, Fusco C. Copy number variants in Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet*. 2010; 128:3-26.

Michaelovsky E, Frisch A, Carmel M, Patya M, Zarchi O, Green T et al. Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome. *BMC Medical Genetics*. 2012; 13:122-33.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987; 155:335-50.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editors. *Thompson e Thompson Genetics in Medicine*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2007. 585 p.

On-line Mendelian Inheritance in Man (OMIM™) [Internet]. Baltimore: Johns Hopkins University. Accessed 2013 May 1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

Organização Mundial de Saúde (OMS). World Health Organization, Human Genetics Programme. Primary health care approaches for prevention and control of congenital disorders and disability. Geneva: World Health Organization; 2000. 88p.

Patau K, Smith DW, Therman E, Inborn SL, Wagner HP. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet*. 1960; 1:790-3.

Patil SJ, Madhusudhan BG, Shah S, Suresh PV. Facile phenotype at different ages and cardiovascular malformations in children with Williams-Beuren syndrome: a study from India. *Am J Med Genet Part A*. 2012; 158A (7): 1729-34.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes, CM, Pena, SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS*. 2003; 100(1): 177-82.

Pena SDJ. Aconselhamento genético da criança com deficiência mental. Em: APAE. Deficiência Mental: Abordagem Multidisciplinar. São Paulo: APAE; 2005: p 1-19.

Pena SDJ. Diagnóstico diferencial da criança com deficiência mental. Em: LMS Freire, editor. Diagnóstico Diferencial em Pediatria. Rio de Janeiro; Guanabara-Koogan; 2008: p. 782-8.

Pena SDJ. Tupi or not tupi, that is the question. *Ciência Hoje On-line*. 2009 [citado 10 abr. 2009]. Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/colunas/deriva-genetica/tupi-or-not-tupi-that-is-the-question/>.

Petean EBL, de Pina Neto JM. Investigações em aconselhamento genético: impacto da primeira notícia – a reação dos pais à deficiência. *Medicina*. 1998; 31: 288-95.

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998; 20: 207–11.

Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet Part A*. 2006; 140A:2063-74.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350-4.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239:487-91.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc natn Acad Sci USA*. 1977; 74, 5463-7.

Schochetman G, Ou CY, Jones WK. Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*. 1988; 158:1154-7.

Shaffer LG. American college of medical genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genet Med*. 2005; 7 (9): 650-4.

Shaffer LG, Bejjani BA. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics *Cytogenet Genome Res*. 2006; 115(3-4):303-9.

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):335-45.

Shalock RL, Borthwick-Duffy SA, Bradley VJ, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM et al. *Intellectual Disability: Definition, Classification, and Systems of Supports*. 11th ed. Washington: American Association of Intellectual and Developmental Disabilities; 2010. 259p.

Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D et al. Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2003; 60, 367-80.

Shevell M. Global Developmental Delay and Mental Retardation or Intellectual Disability: conceptualization, Evaluation and Etiology. *Pediatr Clin N Am*. 2008; 55: 1071-84.

Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, Sidoti EJ, Berkman MD, Argamaso RV et al. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J*. 1978; 15(1):56-62.

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

Smith AC, Dykens E, Greenberg F. Behavioral phenotype of Smith-Magenis syndrome (del17p11.2). *Am J Med Genet*. 1998; 81: 179-85.

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975; 98(3):503-17.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*. 1996; 12: 368-75.

Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*. 2005; 6 (10): 782-92.

Spence JE, Buffone GJ, Rosenbloom CL, Fernbach SD, Curry MR, Carpenter RJ et al. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis using linked DNA markers and microvillar intestinal enzyme analysis. *Hum Genet*. 1987; 76(1):5-10.

Stankiewicz P, Beaudet AL Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17(3):182-92.

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

Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha PC, Pena HB, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ. Simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for detection of microdeletion and microduplication syndromes. *PLoS ONE*. 2013; 8 (4): e61328.

Syvänem AC, Bergström M, Tenhunem J, Söderlund H. Quantification of Polymerase Chain Reaction products by affinity-based hybrid collection. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16 (23): 11327-38.

Swillen A, Devriendt K, Legius E, Eyskens B, Dumoulin M, Gewillig M et al. Intelligence and psychosocial adjustment in velocardiofacial syndrome: a study of 37 children and adolescents with VCFS. *J Med Genet*. 1997; 34: 453–8.

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

Toriello HV, Goldenberg P. Evidence-based medicine and practice guidelines: Application to genetics. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2009; 151C:235-40.

Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: application in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet*. 1991; 7:149-54.

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15(11):1105-14.

Yau EKC, Lo, IFM, Lam STS. Williams-Beuren syndrome in the Hong Kong Chinese population: retrospective study. *Hong Kong Med J*. 2004; 10:22-7.

Young IA. *Medical Genetics*. New York: Oxford University Press; 2005. 304p.

Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science*. 1976; 191: 268-70.

Yunis JJ. Mid-prophase human chromosomes. The attainment of 2000 bands. *Hum Genet* 1981; 56: 293-8.

Weise A, Mrasek K, Klein E, Multainho M, Llerena Jr JC, Hardekopf D et al. Microdeletion and Microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem*. 2012; 60(5): 346-58.

Williams CA, Dagli AI. Angelman syndrome. In: Cassidy SB, Allanson JE, editors. *Management of Genetic Syndromes*. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010, p. 69-80.

ANEXO A – Protocolo para coleta de dados

Dados da história	
1.	História familiar de síndromes genéticas diagnosticadas
2.	História familiar de déficit cognitivo
3.	História familiar de cardiopatia congênita
4.	História familiar de alterações velofaríngeas ou laríngeas
5.	Dados da gestação
6.	Dados do nascimento
7.	Dados do período neonatal
Crescimento e Desenvolvimento	
8.	Atraso nos marcos do desenvolvimento neuropsicomotor
9.	Ganho pômdero-estatural
Comportamento	
10.	Comportamento amigável
11.	Riso imotivado
12.	Ataques de raiva
13.	Ataques de birra
14.	Hiperatividade
15.	Agressividade com outros
16.	Auto-agressão
17.	Interação social prejudicada
18.	Estereotípias
19.	Manter a mão na boca
20.	Fala perserverativa
21.	Déficit de atenção
22.	Déficit de concentração
23.	Distúrbios de sono
24.	Hiperfagia
25.	Poliembolocoilamania
Doenças	
26.	Déficit cognitivo
27.	Ataxia/ Marcha com base alargada
28.	Hipotonia muscular
29.	Espasticidade de membros inferiores
30.	Distrofia muscular
31.	Hipotonia neonatal ou no 1º ano de vida
32.	Dificuldades alimentares no período neonatal ou no 1º ano de vida
33.	Dificuldades respiratórias no período neonatal
34.	Otites recorrentes
35.	Infecções respiratórias recorrentes
36.	Craniossinostose
37.	Erros de refração
38.	Estrabismo
39.	Aniridia

40. Ceratocone
41. Glaucoma
42. Perda auditiva
43. Convulsões
44. Obesidade
45. Diabetes mellitus
46. Hipogonadismo
47. Tetralogia de Fallot
48. Coarctação de aorta
49. Cardiopatia complexa
50. Defeito de septo atrial
51. Defeito de septo ventricular
52. Anomalias de valva mitral
53. Anomalias de valva tricúspide
54. Anomalias de valva aórtica
55. Arco aórtico à direita
56. Arteria subclávia esquerda aberrante
57. Estenose pulmonar
58. Estenose supra-aórtica
59. Persistência do canal arterial
60. Úvula bifida
61. Fenda palatina/fenda submucosa
62. Incompetência velofaríngea
63. Membranas laríngeas
64. Hipocalcemia
65. Hipoparatiroidismo
66. Pseudo-hipoparatiroidismo
67. Hipotireoidismo
68. Malformações cerebrais
69. Hipertensão arterial
70. Acidente Vascular Cerebral
71. Malformações em coluna
72. Malformações renais
73. Tumor de Wilms
74. Imunodeficiência
75. Hiperglicerolemia
76. Colestase

Exme Físico**Medidas**

77. Peso
78. Estatura/comprimento
79. Perímetro cefálico
80. Perímetro torácico
81. Distância intermamilar
82. Distâncias intercantais interna e externa
83. Comprimentos das mãos e das palmas
84. Comprimentos das orelhas
85. Volume testicular
86. Comprimento peniano

Sinais clínicos

87. Pele frouxa
88. Manchas café-com-leite
89. Sardas axilares
90. Neurofibromas
91. Neurofibromas plexiformes
92. Hipernasalidade
93. Sensibilidade aumentada a ruídos
94. Voz rouca
95. Baixa estatura
96. Obesidade
97. Macrocrania
98. Microcrania
99. Braquicefalia
100. Palgiocefalia
101. Trigonocefalia
102. Cabelos esparsos
103. Cabelos claros
104. Pele clara
105. Bossa frontal
106. Fronte ampla
107. Fronte curta
108. Diâmetro bitemporal diminuído
109. Face assimétrica
110. Olhos amendoados
111. Olhos com implantação profunda
112. Embriotoxon posterior
113. Nódulos de Lisch
114. Fendas palpebrais inclinadas
115. Fendas palpebrais curtas
116. Ptose palpebral
117. Excesso de pele em região palpebral
118. Pregas epicantais
119. Cílios longos
120. Sinófris
121. Hipertelorismo
122. Hipotelorismo
123. Telecanto
124. Íris estrelada
125. Orelhas malposicionadas
126. Malformações do pavilhão auricular
127. Orelhas em abano/ em forma de xícara
128. Orelhas grandes
129. Orelhas pequenas
130. Base nasal quadrada
131. Ponte nasal alta
132. Nariz bulboso
133. Narinas antevertidas
134. Ponta do nariz voltada para baixo
135. Hipoplasia de aletas nasais
136. Filtro nasolabial longo

137. Filtro nasolabial curto
138. Lábios grossos
139. Lábio superior em “arco de cupido”
140. Palato ogival
141. Hipoplasia malar
142. Micrognatia
143. Retrognatia
144. Prognatia
145. Orelhas malposicionadas
146. Malformações de orelhas
147. Mesomelia
148. Mãos pequenas
149. Deformidade de Madelung
150. Pés pequenos
151. Pés planos
152. Dedos finos (pés e mãos)
153. Dedos longos (pés e mãos)
154. Polegares e hálucos alargados
155. Sindactilia
156. Polidactilia pré e/ou pós-axial
157. Braquidactilia
158. Clinodactilia de 5º dedo em mãos
159. Padrão anômalo de pregas palmares
160. Hiperextensibilidade articular
161. Genum varum
162. Genum valgo
163. Escoliose
164. Malformações genitais
165. Pênis com comprimento diminuído
166. Hipoplasia de pequenos lábios
167. Hipospádia
168. Criptorquidia
169. Bolsa escrotal hipoplásica
170. Ictiose
171. Exostoses múltiplas