

Tese de doutorado

**Pricila da Silva Cunha**

**Estudos moleculares de doenças  
genéticas humanas**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Janeiro de 2014

**Pricila da Silva Cunha**

# **Estudos moleculares de doenças genéticas humanas**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Molecular

**Orientador:**

**Dr. Sérgio Danilo Junho Pena**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Belo Horizonte –MG –Brasil

2014

*Aos meus queridos pais, José Afonso e Jovita,  
À minha irmã e amiga, Giselli,*

*Por serem minha fortaleza e meu porto seguro,*

**DEDICO**

*“Quero, terei. Se não aqui, noutra lugar que ainda não sei. Nada perdi; Tudo serei.” (Fernando Pessoa)*

*"Meu caminho é feito de uma alma com pés valentes,  
mesmo quando cansados arriscam mais um passo. É  
essa doce valentia que me trouxe até aqui..."*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me abençoado a cada dia durante o doutorado, ter me dado força, serenidade e equilíbrio para superar os momentos difíceis e por estar sempre caminhando ao meu lado.

À Nossa Senhora, minha Mãezinha, que segurou minha mão e me acolheu em seus braços durante todo esse tempo, me dando provas constantes de sua presença e proteção. Por ter sido a luz que iluminou a minha vida e que me fez acreditar que eu era capaz de chegar até aqui.

Ao Professor Doutor Sérgio Pena pela oportunidade única de fazer parte do seu grupo de pesquisa durante esse tempo, pelo privilégio de tê-lo tido como orientador. Sua inteligência, disciplina, paixão pela ciência, competência e brilhantismo acadêmico me ensinaram o que é ser um verdadeiro cientista! Gostaria de agradecer a paciência e a confiança no meu trabalho, por todos os ensinamentos e pela preocupação dedicada a cada um dos seus orientados. Muito obrigada!

Aos Professores Andréa Mara Macedo, Glória Regina Franco e Carlos Renato Machado pela convivência sempre muito agradável e por terem me recebido com muito carinho no LGB.

À Dra. Heloisa, por sua ajuda tão preciosa nos experimentos de qPCR, sua paciência, amizade e apoio em todos os momentos. Agradeço pelo carinho com que me recebeu no laboratório GENE, por ter sentado tantas vezes ao meu lado para me dar sugestões, conselhos, por me ajudar a resolver os problemas que apareciam, pelo exemplo profissional e por ter se tornado uma grande amiga! Obrigada, Helô!

Ao Martin e ao Higgor, pela parceria fabulosa no estudo das microdeleções cromossômicas. Aprendi muito com cada um de vocês e fiquei muito feliz com a amizade que construímos ao longo desse período!

À Dra. Melissa Machado Viana, pela colaboração no estudo das síndromes de microdeleção, sempre tão atenciosa e gentil. Mesmo à distância e sem conhecê-la pessoalmente tenho uma grande admiração por seu trabalho e sucesso profissional.

À Dra. Carla Sustek D'Angelo, Dra. Jill A. Rosenfeld, Dra. Lisa G. Shaffer, Dr. Luiz Armando De Marco, Dr. Márcio Bittar Nehemy e Dr. Marcos José Burle Aguiar pela colaboração e fornecimento das amostras de DNA genômico dos indivíduos participantes de ambos os estudos.

À Dra. Luciana Almeida, pela atenção e gentileza ao enviar as informações correspondentes aos indivíduos participantes do estudo da degeneração macular relacionada à idade.

Ao Professor Fabrício, pela disponibilização do aparelho *ABI 7900 HT Fast PCR Real Time System* para a realização dos experimentos de discriminação alélica referentes à primeira parte da tese.

Aos Professores (as) Doutores (as) componentes da banca por terem aceitado participar da minha defesa.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela oportunidade de realização de uma pós-graduação de excelente qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu pai José Afonso, exemplo de vida e caráter, que me acompanha dia após dia durante mais de dez anos desde que entrei na universidade. Agradeço por estar sempre ao meu lado, pelas orações, incentivo, amizade, companheirismo e amor. Obrigada por também acreditar no meu sonho, por lutar junto comigo e por me mostrar os verdadeiros valores da vida! Essa vitória é mais sua do que minha!

À minha mãe Jovita, por seu amor incondicional. Agradeço por ser minha melhor amiga, meu porto seguro, o colo para onde corro quando as dificuldades aparecem. Sua fé, sabedoria e coragem fazem de você a mulher que um dia eu quero ser. Não tenho palavras para agradecer a dádiva que é tê-la como mãe! Obrigada pelas orações, por estar sempre ao meu lado, por me fazer acreditar que eu sou capaz de vencer. Você é tudo para mim, a razão da minha vida, o bem mais precioso que Deus poderia me dar!

À minha irmã Giselli, por sua amizade, carinho e cumplicidade. Por demonstrar através do seu olhar o orgulho que sente da minha trajetória profissional, pelo apoio e pelos momentos de alegria que me proporciona quando eu vou para casa. Obrigada por fazer parte da minha vida!

À Natália, por sua atenção, dedicação, competência, amizade e ajuda indescritível na elaboração e organização da planilha contendo as informações dos custos relacionados ao diagnóstico por FISH. Sua paciência em responder todas as minhas dúvidas e todos os meus e-mails foi sem igual! Não tenho palavras para agradecer sua parceria!

À Dra. Raquel Roque, do Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da UFMG, por juntamente com a Natália, ter ajudado na elaboração da planilha contendo todos os reagentes e materiais de laboratório utilizados para o diagnóstico molecular por FISH. Agradeço sua atenção e boa vontade, pois sem vocês duas essa etapa não teria sido realizada. Muito obrigada!

Ao Dr. Leonardo Vasconcellos, coordenador de Ensino e Pesquisa da Unidade Funcional de Patologia e Medicina Laboratorial (UFPML) do Hospital das Clínicas da UFMG, por entender a importância do nosso projeto e ter dado autorização para que tivéssemos acesso aos custos de alguns produtos diretamente na seção de almoxarifado do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG. E também por autorizar a publicação desses dados na planilha de FISH apresentada na parte final da tese.

À Dani, pela amizade, pelos longos anos de convivência e pela ajuda preciosa na parte experimental e estatística. Pelo apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração e alegria.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Bioquímica (LGB), por terem tornado os dias no laboratório tão alegres e a jornada mais amena. Sentirei saudades de todos!

Aos amigos e colegas do laboratório GENE, em especial à Carol, Vivi, Lu, Renata, Beta, Vanessa, Adriana, Gabi, Cassi, Flaviana, Ana Paula, Márcia e Dra Tereza que se tornaram uma segunda família. Levarei vocês no meu coração!

À Neuzinha, pelo carinho, apoio e também por toda a ajuda e preocupação com os meus trabalhos.

À Andréia, minha professora de inglês e grande amiga, por seu carinho, seu ombro amigo, seus conselhos e ensinamentos. Agradeço por me ensinar a ter confiança em mim mesma, a acreditar no meu potencial e por me ensinar a gostar de inglês! Você se tornou uma amiga para toda vida! Obrigada, Déia!

À Polly, por todos os momentos alegres que passamos juntas, pelas conversas descontraídas, amizade verdadeira, carinho e cumplicidade. Agradeço por sempre me ouvir, apoiar e por torcer tanto por mim. Agradeço todo dia por ter te conhecido, amiga!

À Ferdi, por sua simplicidade, amizade e pela boa vontade com que sempre me ajudou. Aprendi muito com você!

À Maíra, pela co-orientação e ajuda nas discussões relativas ao meu projeto. Obrigada por suas sugestões!

À Lili, Anna Cláudia, Ceres, Vivi, Selminha e Mika, por serem amigas tão especiais, pelos momentos de alegria e pelos conselhos.

À Sílvia, pela amizade linda que construímos, por sempre se preocupar comigo. Agradeço por todas as vezes que me ouviu, me aconselhou, pelos momentos alegres que passamos juntas e por seu abraço acolhedor nos momentos mais difíceis.

À Daniela, Marilza e José Sandoval, pela atenção e gentileza que tiveram durante a realização dos experimentos no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular.



À Denise, Mari, Aretha, Maísa e Vinícius, pela amizade e momentos de descontração durante esse período.

A todos os pacientes que participaram de ambos os estudos, pela compreensão da importância dessa pesquisa científica, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Ao Sr. Sebastião Magalhães, taxista que devolveu o *notebook* e HD que eu havia esquecido em seu carro. Se não fosse por sua honestidade eu não estaria nesse momento concluindo um trabalho de quase quatro anos. Obrigada!

Ao Dr. Paulo Ferrara, um grande médico e cientista, que com seu conhecimento criou o anel de Ferrara, sem o qual eu teria perdido minha visão e não teria tido condições de me dedicar à pesquisa. Serei eternamente grata por ter me concedido pela segunda vez a alegria de enxergar!

À minha querida tia Maria, por ser uma segunda mãe. Agradeço por suas orações e por torcer sempre pelas minhas realizações profissionais.

Às minhas primas e amigas Kátia e Graziela, por me proporcionarem momentos inesquecíveis, de completa alegria quando estamos juntas. Agradeço por fazerem parte da minha vida, pela torcida para que tudo desse certo. Vocês são fundamentais para mim!

À vó Alice, *in memoriam*, pela proteção e incentivo.

À minha madrinha Ednéia e à tia Geralda, pelas orações, carinho, apoio e incentivo.

Aos familiares e amigos que tanto torceram e rezaram por mim.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

# Índice

I- Apresentação .....	i
II- Lista de abreviaturas e símbolos .....	ii
III- Lista de Figuras .....	vi
IV- Lista de Tabelas .....	viii
V- Resumo .....	xi
VI- Abstract .....	xii
1- Introdução Geral .....	1
1.1- Estudos moleculares de doenças genéticas humanas .....	2
2- Objetivos Gerais .....	6
3- Parte I .....	8
3.1- Introdução .....	9
3.1.1- Descrição clínica e epidemiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) .....	9
3.1.2- Fatores de risco ambientais e genéticos para a DMRI.....	10
3.1.3- Patogênese da DMRI e modelos animais .....	12
3.1.4- Estratégias de tratamento e administração clínica da DMRI.....	13
3.1.5- Farmacogenômica e DMRI.....	15
3.1.6- Justificativa para a realização de teste genético para a predição de risco da DMRI .....	16
3.2- Objetivos específicos .....	19
3.3- Material e Métodos .....	20
3.3.1- Indivíduos .....	20
3.3.2- Extração e quantificação de DNA .....	24
3.3.3- Seleção de SNPs .....	24
3.3.4- Genotipagem .....	26
3.3.4.1- Genotipagem usando sondas <i>TaqMan</i> ® .....	26

3.3.4.2- Genotipagem usando a metodologia de RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i> ) .....	26
3.3.5- Sequenciamento .....	27
3.3.5.1- Desenho de oligonucleotídeos iniciadores .....	28
3.3.5.2- Reação de amplificação e purificação dos produtos de PCR .....	30
3.3.5.3- Reação de sequenciamento e precipitação .....	31
3.3.4- Determinação da ancestralidade .....	31
3.3.5- Análises estatísticas .....	32
3.4- Resultados .....	35
3.5- Discussão .....	59
4- Parte II .....	68
4.1- Introdução .....	69
4.1.1- Anormalidades cromossômicas e síndromes de microdeleção/ microduplicação cromossômicas .....	69
4.1.2- Principais métodos para detectar anormalidades cromossômicas .....	71
4.1.3- Genética e saúde pública no Brasil .....	74
4.1.4- Síndrome velocardiofacial .....	78
4.1.5- Síndrome de Williams-Beuren .....	82
4.1.6- Monossomia 1p36.....	86
4.2- Objetivos específicos .....	90
4.3- Material e Métodos .....	91
4.3.1- Indivíduos e avaliação clínica .....	91
4.3.2- Extração e quantificação de DNA .....	92
4.3.3- Diagnóstico molecular .....	92
4.3.4- Declaração de ética .....	94
4.3.5- PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	95
4.3.5.1- Seleção e/ou desenho de oligonucleotídeos iniciadores.....	95
4.3.5.2- PCR para confirmação da especificidade dos iniciadores.....	99

4.3.5.3- Ensaio de qPCR .....	99
4.3.6- Análise dos dados de qPCR .....	101
4.3.6.1- Cálculo de $KC_t$ e $\Delta KC_t$ .....	101
4.3.6.2- Análises estatísticas .....	102
4.3.7- Cálculo do custo de um teste de triagem molecular por qPCR.....	102
4.4- Resultados .....	104
4.4.1- Resultados de qPCR para a síndrome velocardiocfacial .....	104
4.4.2- Resultados de qPCR para a síndrome de Williams-Beuren .....	119
4.4.3- Resultados de qPCR para a monossomia 1p36.....	130
4.4.4- Custo de um teste de triagem molecular por qPCR .....	141
4.5- Discussão .....	144
4.5.1- Síndrome velocardiocfacial .....	145
4.5.2- Síndrome de Williams-Beuren .....	149
4.5.3- Monossomia 1p36.....	152
4.5.4- Avaliação dos custos .....	155
5- Considerações Finais e Perspectivas .....	158
6- Referências Bibliográficas .....	161
7- Anexos .....	209
8- Apêndice.....	230

## **I- Apresentação**

A tese apresentada está organizada em duas partes independentes relacionadas aos temas trabalhados durante o período do doutorado. Cada parte apresenta Introdução, Objetivos Específicos, Metodologia, Resultados e Discussão. Os artigos produzidos durante esse período encontram-se no Apêndice.

Resumidamente, na Parte I realizamos análises de RFLP e ensaios de discriminação alélica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) usando sondas *TaqMan*® alelo-específicas, com o objetivo de identificar SNPs associados à degeneração macular relacionada à idade em Brasileiros, visando o prognóstico clínico dessa doença. Na Parte II, utilizamos a metodologia de qPCR com uso do reagente *SYBR*® *Green* para detectar microdeleções cromossômicas associadas a três síndromes genéticas: síndrome velocardiofacial, síndrome de Williams-Beuren e monossomia 1p36. O objetivo principal dessa segunda parte foi desenvolver um teste de triagem molecular que fosse economicamente viável para ser implementado no Sistema Único de Saúde (SUS) e, por extensão, nos serviços públicos de saúde de outros países em desenvolvimento, permitindo que toda população tenha acesso a testes genéticos de alta qualidade.

## II- Lista de abreviaturas e símbolos

aCGH: hibridização genômica comparativa em microarranjos (*Array-Comparative Genomic Hybridization*)

ADAMTS9: *ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9*

AF: angiografia com fluoresceína

AIV: angiografia com indocianina verde

AMD: *Age-Related Macular Degeneration*

APOE: *apolipoprotein E*

AREDS: Estudo de Doença do Olho Relacionada à Idade (*Age-Related Eye Disease Study*)

AREDS2: Estudo de Doença do Olho Relacionada à Idade 2 (*Age-Related Eye Disease Study 2*)

ARMS2: *age-related maculopathy susceptibility 2*

AUC: área sob a curva ROC (*Area Under the ROC Curve*)

BACs: cromossomos artificiais de bactérias (*Bacterial Artificial Chromosomes*)

ELN: *elastin*

B3GALTL: *beta 1,3-galactosyltransferase-like*

C2: componente 2 do complemento (*complement component 2*)

C3: componente 3 do complemento (*complement component 3*)

CARMS: *Clinical Age-Related Maculopathy Staging*

CFB: fator B do complemento (*complement factor B*)

CFH: fator H do complemento (*complement factor H*)

CFI: fator I do complemento (*complement factor I*)

COL8A1: *collagen, type VIII, alpha 1*

COMT: *catechol-O-methyltransferase*

CNVs: variantes de número de cópias (*Copy Number Variants*)

C<sub>t</sub>: *threshold cycle*

Curva ROC: *Receiver Operating Characteristic Curve*

D': coeficiente de desequilíbrio de ligação normalizado

dATP -2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato

dbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism Database*

DC-VC: doença comum-variante comum

DC-VR: doença comum-variante rara

dCTP- 2'-desoxicitosina 5'-trifosfato

DD: diâmetros de disco

*DDR1: discoidin domain receptor tyrosine kinase 1*

DGS: síndrome de DiGeorge

dGTP- 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

DHA: ácido docosahexaenóico

DI: deficiência intelectual

DMRI: degeneração macular relacionada à idade

dNTPs- desoxinucleotídeos

dTTP- 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato

EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

EPR: epitélio pigmentar da retina

EPA: ácido eicosapentaenóico

FDA: *Food and Drug Administration*

*FILIP1L: filamin A interacting protein 1-like*

FISH: hibridização fluorescente *in situ* (*Fluorescent In Situ Hybridization*)

GWAS: estudos de associação genômica ampla (*Genome-Wide Association Studies*)

*G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase*

HC/UFGM: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

*HERC2: HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2*

*HMBS: hydroxymethylbilane synthase*

*HTRA1: HtrA serine peptidase 1*

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

*IER3: immediate early response 3*

IMC: índice de massa corporal

KC<sub>t</sub>: C<sub>t</sub> normalizado do gene alvo

LCRs: repetições de baixo número de cópias (*Low Copy Repeats*)

LD: desequilíbrio de ligação (*Linkage Disequilibrium*)

*LIMK1: LIM domain kinase 1*

*LIPC: lipase, hepatic*

MAF: Frequência do Alelo Menor (*Minor Allele Frequency*)

MESA: Estudo Multi-Étnico de Aterosclerose (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*)

MLPA: amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*)

MNC: membrana neovascular coroidal

MQF-PCR: *Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR*

MT: mitocondrial

*MT-ND2: mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2*

NGS: sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*)

NTC: *No Template Control*

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OR: *Odds Ratio*

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PGH: Projeto Genoma Humano

*PI4KA: phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha*

*PRKCZ: protein kinase C, zeta*

*PRODH: proline dehydrogenase (oxidase) 1*

QI: quociente de inteligência

QMPSF: *Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments*

qPCR: PCR quantitativa em tempo real (*Real-Time quantitative PCR*)

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação

*RAD51B: RAD51 paralog B*

*RAI1: retinoic acid induced 1*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorfism*

rpm: rotações por minuto

SD: desvio padrão (*Standard Deviation*)



*SKI*: *v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog*

*SLC16A8*: *solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 8*

*SLC7A4*: *solute carrier family 7, member 4*

SMM: síndromes de microdeleção/microduplicação

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SUS: Sistema Único de Saúde

*SYN3*: *synapsin III*

*TBX1*: *T-box 1*

TCO: tomografia de coerência óptica

TDAH: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

*TGFBR1*: *transforming growth factor, beta receptor 1*

*TIMP3*: *TIMP metalloproteinase inhibitor 3*

T<sub>m</sub>: temperatura de *melting*

*TUPLE1*: *histone cell cycle regulator (HIRA)*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

USP: Universidade de São Paulo

VCFS: síndrome velocardiofacial

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

*VEGFA*: *vascular endothelial growth factor A*

*VPREB1*: *pre-B lymphocyte 1*

VSDs: variantes de sequência de DNA

WBS: síndrome de Williams-Beuren

WES: sequenciamento de todo exoma (*Whole-Exome Sequencing*)

WGS: sequenciamento de todo genoma (*Whole-Genome Sequencing*)

WHO: *World Health Organization*

α: nível de significância

ΔK<sub>C<sub>t</sub></sub>: alteração no número de cópias alélicas (*fold copy number change*)

22q11DS: síndrome de deleção 22q11

### III- Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Gráfico obtido a partir da genotipagem do SNP rs1061147 em 108 indivíduos utilizando sondas <i>TaqMan</i> ®.....	36
<b>Figura 2:</b> Cromatogramas obtidos a partir do sequenciamento de fragmentos de PCR contendo o SNP rs1061147 .....	37
<b>Figura 3:</b> Genotipagem do SNP rs28357980 utilizando a metodologia de RFLP .....	38
<b>Figura 4:</b> Cromatogramas obtidos a partir do sequenciamento de fragmentos de PCR contendo o SNP rs28357980 .....	39
<b>Figura 5:</b> Gráfico de comparação múltipla mostrando a proporção de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia no grupo com DMRI (caso) e no grupo sem DMRI (controle) .....	43
<b>Figura 6:</b> Gel de poliacrilamida (5%) corado com brometo de etídeo mostrando o tamanho dos <i>amplicons</i> produzidos a partir da amplificação por PCR com cada par de iniciadores usados no estudo da VCFS .....	105
<b>Figura 7:</b> Curva de dissociação dos marcadores <i>COMT</i> , <i>PI4KA</i> e <i>PRODH</i> com indicação do T <sub>m</sub> de cada <i>amplicon</i> .....	107
<b>Figura 8:</b> Curva de dissociação dos marcadores <i>SLC7A4</i> e <i>HMBS</i> (seq. 1) com indicação do T <sub>m</sub> de cada <i>amplicon</i> .....	108
<b>Figura 9:</b> Comparação das curvas ROC ( <i>Receiver Operating Characteristic curves</i> ) para os marcadores <i>COMT</i> , <i>PI4KA</i> , <i>PRODH</i> e <i>SLC7A4</i> analisados no estudo da VCFS .....	114
<b>Figura 10:</b> <i>Dot plot</i> para os marcadores analisados no estudo da VCFS: (a) <i>COMT</i> , (b) <i>PI4KA</i> , (c) <i>PRODH</i> e (d) <i>SLC7A4</i> .....	117
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática da região 22q11.2 e localização dos marcadores <i>COMT</i> , <i>PI4KA</i> , <i>PRODH</i> e <i>SLC7A4</i> .....	118
<b>Figura 12:</b> Gel de poliacrilamida (5%) corado com brometo de etídeo mostrando o tamanho dos <i>amplicons</i> produzidos a partir da amplificação por PCR com cada par de iniciadores usados no estudo da WBS .....	120
<b>Figura 13:</b> Curva de dissociação dos marcadores <i>ELN</i> , <i>LIMK1</i> e <i>HMBS</i> (seq. 2) com indicação do T <sub>m</sub> de cada <i>amplicon</i> .....	121

<b>Figura 14:</b> Comparação das curvas ROC ( <i>Receiver Operating Characteristic curves</i> ) para os marcadores <i>ELN</i> e <i>LIMK1</i> analisados no estudo da WBS .....	126
<b>Figura 15:</b> <i>Dot plot</i> para os marcadores analisados no estudo da WBS: (a) <i>ELN</i> e (b) <i>LIMK1</i> .....	128
<b>Figura 16:</b> Representação esquemática da região 7q11.23 e localização dos marcadores <i>ELN</i> e <i>LIMK1</i> .....	129
<b>Figura 17:</b> Gel de poliacrilamida (5%) corado com brometo de etídeo mostrando o tamanho dos <i>amplicons</i> produzidos a partir da amplificação por PCR com cada par de iniciadores usados no estudo da monossomia 1p36 .....	131
<b>Figura 18:</b> Curva de dissociação dos marcadores <i>PRKCZ</i> e <i>SKI</i> com indicação do $T_m$ de cada <i>amplicon</i> .....	132
<b>Figura 19:</b> Comparação das curvas ROC ( <i>Receiver Operating Characteristic curves</i> ) para os marcadores <i>PRKCZ</i> e <i>SKI</i> analisados no estudo da monossomia 1p36 .....	138
<b>Figura 20:</b> <i>Dot plot</i> para os marcadores analisados no estudo da monossomia 1p36: (a) <i>PRKCZ</i> e (b) <i>SKI</i> .....	139
<b>Figura 21:</b> Representação esquemática da região 1p36 mostrando a localização da sonda de MLPA e do par de iniciadores da qPCR para o gene <i>SKI</i> e o ponto de quebra da deleção no paciente 10 .....	142
<b>Figura 22:</b> Representação esquemática da região 1p36 e localização dos marcadores <i>PRKCZ</i> e <i>SKI</i> .....	143
<b>Figura A2:</b> Gráfico de comparação múltipla mostrando a proporção de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia em cada classe de cor de pele (Branco, Pardo e Preto) .....	211
<b>Figura A3:</b> Curva padrão para os marcadores <i>COMT</i> , <i>PI4KA</i> e <i>PRODH</i> .....	212
<b>Figura A4:</b> Curva padrão para os marcadores <i>SLC7A4</i> e <i>HMBS</i> (seq. 1) .....	213
<b>Figura A8:</b> Curva padrão para os marcadores <i>ELN</i> , <i>LIMK1</i> e <i>HMBS</i> (seq. 2) .....	217
<b>Figura A12:</b> Curva padrão para os marcadores <i>PRKCZ</i> e <i>SKI</i> .....	221

## IV- Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> O sistema CARMS ( <i>Clinical Age-Related Maculopathy Staging</i> ) .....	21
<b>Tabela 2:</b> Distribuição dos 192 indivíduos participantes de acordo com o grau de maculopatia definido pelo sistema CARMS .....	23
<b>Tabela 3:</b> Identificação do SNP, cromossomo, loco, posição cromossomal, alelos, localização éxon/íntron e MAF no dbSNP .....	25
<b>Tabela 4:</b> Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho esperado dos <i>amplicons</i> .....	29
<b>Tabela 5:</b> Dados correspondentes à ancestralidade, cor de pele, idade, IMC, sexo, <i>status</i> de hipercolesterolemia, hipertensão e tabagismo dos 192 indivíduos .....	41
<b>Tabela 6:</b> Características demográficas gerais da população em estudo e testes para inferência dos grupos Caso e Controle .....	42
<b>Tabela 7:</b> SNP, cromossomo, loco, MAF, Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Teste Exato de Fisher .....	46
<b>Tabela 8:</b> Análises de regressão numérica (regressão logística) com covariáveis para todos os SNPs, exceto rs1061147 e rs1329428 .....	48
<b>Tabela 9:</b> Análises de haplótipo para rs1061147 e rs1329428 (gene <i>CFH</i> ) .....	51
<b>Tabela 10:</b> Análises de regressão numérica (regressão logística) com covariáveis para os haplótipos formados pelos SNPs rs1061147 e rs1329428 .....	52
<b>Tabela 11:</b> <i>Odds Ratio</i> para todos os SNPs, exceto rs1061147 e rs1329428 .....	54
<b>Tabela 12:</b> <i>Odds Ratio</i> para os haplótipos formados pelos SNPs rs1061147 e rs1329428 .....	57
<b>Tabela 13:</b> Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos <i>amplicons</i> e localização genômica .....	97
<b>Tabela 14:</b> Concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador usado no estudo da VCFS determinada através do teste de concentração de <i>primers</i> .....	109
<b>Tabela 15:</b> <i>Slope</i> , eficiência de amplificação da qPCR e valores de $R^2$ para os genes alvo e de referência do estudo da VCFS .....	111

<b>Tabela 16:</b> Visão geral dos resultados de $\Delta KC_t$ para os marcadores <i>COMT</i> , <i>PI4KA</i> , <i>PRODH</i> e <i>SLC7A4</i> nos grupos VCFS_Controles Normais, VCFS_Grupo 1 e VCFS_Grupo 2 .....	112
<b>Tabela 17:</b> Concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador usado no estudo da WBS determinada através do teste de concentração de <i>primers</i> .....	122
<b>Tabela 18:</b> <i>Slope</i> , eficiência de amplificação da qPCR e valores de $R^2$ para os genes alvo e de referência do estudo da WBS .....	123
<b>Tabela 19:</b> Visão geral dos resultados de $\Delta KC_t$ para os marcadores <i>ELN</i> e <i>LIMK1</i> nos grupos WBS_Controles Normais, WBS_Grupo 1 e WBS_Grupo 2 .....	125
<b>Tabela 20:</b> Concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador usado no estudo da monossomia 1p36 determinada através do teste de concentração de <i>primers</i> .....	133
<b>Tabela 21:</b> <i>Slope</i> , eficiência de amplificação da qPCR e valores de $R^2$ para os genes alvo analisados no estudo da monossomia 1p36 .....	134
<b>Tabela 22:</b> Visão geral dos resultados de $\Delta KC_t$ para os marcadores <i>PRKCZ</i> e <i>SKI</i> nos grupos 1p36_Controles Normais e 1p36_Grupo 1 .....	136
<b>Tabela A1:</b> Resultados das análises estatísticas relacionando ancestralidade e cor de pele .....	210
<b>Tabela A5:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para os 50 controles normais da VCFS .....	214
<b>Tabela A6:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para VCFS_Grupo 1 .....	215
<b>Tabela A7:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para VCFS_Grupo 2 .....	216
<b>Tabela A9:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para os 50 controles normais da WBS .....	218
<b>Tabela A10:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para WBS_Grupo 1 .....	219
<b>Tabela A11:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para WBS_Grupo 2 .....	220
<b>Tabela A13:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para 50 controles normais da monossomia 1p36....	222
<b>Tabela A14:</b> Resultados de $\Delta KC_t$ para 1p36_Grupo 1 .....	223
<b>Tabela A15:</b> Dados para o cálculo dos custos com reagentes e materiais de laboratório utilizados na triagem molecular de um paciente por qPCR (dois genes alvo e um gene de referência) .....	224
<b>Tabela A16:</b> Dados para o cálculo dos custos relacionados à produção de soluções e padrões .....	226

**Tabela A17:** Dados para o cálculo dos custos com reagentes e materiais de laboratório utilizados na triagem molecular de um paciente por FISH (uma sonda alvo e uma sonda controle) .....228

## V- Resumo

O estudo molecular de doenças genéticas humanas tem um papel importante na detecção, prevenção, tratamento e/ou aconselhamento genético de doenças que são causadas por anormalidades cromossômicas e variantes de sequência de DNA. O crescimento exponencial das técnicas de genética molecular introduziram novas oportunidades terapêuticas e de diagnóstico à medicina do século 21. No presente trabalho, que é constituído por duas partes independentes, utilizamos a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) como principal metodologia para o estudo molecular de quatro doenças genéticas humanas. Na primeira parte, realizamos um estudo de associação caso-controle para identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao risco de degeneração macular relacionada à idade (DMRI) na população Brasileira. A metodologia *TaqMan*® foi utilizada para a genotipagem de oito SNPs localizados no genoma nuclear e a técnica de RFLP foi usada para genotipagem de um SNP localizado no genoma mitocondrial. Análises de regressão feitas com o *software Golden Helix* mostraram a associação significativa de quatro SNPs com a DMRI após a correção para as covariáveis: rs1061147, rs1329428, rs2230199 e rs3750847. Nossos resultados são concordantes com a afirmação de que polimorfismos nos locos *CFH*, *C3* e *ARMS2/LOC387715* são consistentemente associados à DMRI, até mesmo em uma população com extensa mistura genética, tal como a população Brasileira. Na segunda parte, realizamos ensaios de qPCR com o reagente *SYBR*® *Green* para a detecção de microdeleções associadas à síndrome velocardiofacial (VCFS), síndrome de Williams-Beuren (WBS) e monossomia 1p36. Analisamos indivíduos normais e pacientes que apresentavam características clínicas sugestivas das síndromes de microdeleção escolhidas. Análises da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*) feitas com o *software MedCalc* mostraram 100% de sensibilidade e 100% de especificidade para os marcadores analisados. A triagem molecular de um paciente utilizando três marcadores (dois genes alvo e um gene de referência) teria um custo de aproximadamente R\$ 39,11 considerando somente os reagentes envolvidos no processo, desde a etapa de extração de DNA até a qPCR. Nossos resultados mostram que a qPCR é uma técnica de triagem molecular rápida, sensível, específica e de baixo custo, sendo um método economicamente viável de ser implementado nos serviços públicos de saúde de países em desenvolvimento para a detecção de síndromes de microdeleção cromossômica.

## VI- Abstract

The molecular study of human genetic diseases has an important role in the detection, prevention, treatment and/or counseling genetic of diseases which are caused by chromosomal abnormalities and DNA sequence variants. The exponential increase of molecular genetic techniques has introduced new therapeutic and diagnostic opportunities to the medicine of the 21st century. In the present study, which consists of two independent parts, we used the technique of *Real-Time quantitative PCR* (qPCR) as primary methodology for the molecular study of four human genetic diseases. In the first part, we performed a case-control association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the risk of age-related macular degeneration (AMD) in Brazilian population. TaqMan® methodology was used to genotype eight SNPs located in the nuclear genome and RFLP technique was used to genotype one SNP located in the mitochondrial genome. Regression analyzes, which were performed with Golden Helix software, showed the significant association of four SNPs with AMD after adjusting to covariates: rs1061147, rs1329428, rs2230199 and rs3750847. Our results are consistent with the assertion that polymorphisms in *CFH*, *C3* and *ARMS2/LOC387715* loci are consistently associated with AMD, even in a population with extensive genetic admixture, such as Brazilian population. In the second part, we performed qPCR assays using SYBR® Green reagent for detection of microdeletions associated with velocardiofacial syndrome (VCFS), Williams-Beuren syndrome (WBS) and monosomy 1p36. We analyzed normal individuals and patients with clinical features suggestive of microdeletion syndromes which were chosen. ROC curve analyzes (Receiver Operating Characteristic curve), which were made using MedCalc software, showed 100% sensitivity and 100% specificity for the markers which were analyzed. The molecular screening of one patient using three markers (two target genes and one reference gene) would have a cost of approximately R\$ 39.11 considering only the reagents involved in the process, from DNA extraction to qPCR. Our results show that the qPCR is a fast, sensitive, specific and cost-effective molecular screening technique, being an economically viable method to be implemented in public health services of developing countries for detection of chromosomal microdeletion syndromes.



# **1- Introdução Geral**

## 1.1- Estudos moleculares de doenças genéticas humanas

O crescimento exponencial das técnicas de genética molecular e sua aplicação para elucidar a base molecular das doenças genéticas humanas introduziram novas oportunidades de tratamento e de diagnóstico à medicina do século 21. Essas metodologias estão aumentando o nosso entendimento da patogênese das doenças humanas, possibilitando uma melhor intervenção terapêutica e profilática.

As doenças genéticas humanas podem ser classificadas como monogênicas ou poligênicas (doenças complexas ou multifatoriais). Doenças monogênicas, também denominadas doenças mendelianas, são causadas por mutações ou alterações na sequência de DNA de um único gene. Elas constituem aproximadamente 7.000 doenças conhecidas ou suspeitas e podem ser classificadas como: autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X (Marian, 1995; Botstein e Risch, 2003). No entanto, a maioria das doenças genéticas humanas é poligênica, caracterizada por apresentar componentes genéticos e ambientais (Tsongalis e Coleman, 2006).

O foco dos estudos genéticos de doenças complexas reside principalmente na identificação de variantes de sequência de DNA (VSDs). A grande maioria das VSDs no genoma são polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*), e sugere-se que eles sejam responsáveis por muitas das diferenças fenotípicas observadas entre os indivíduos como, por exemplo, susceptibilidade à doença, resposta a terapias e características físicas, tais como a altura (Frazer et al., 2009). Além dos SNPs, variações estruturais também são comuns no genoma e incluem inversões, translocações, inserções, deleções e/ou duplicações. As VSDs influenciam a expressão gênica, estrutura e função das proteínas e, portanto, podem afetar várias redes de interação que, em conjunto, influenciam a susceptibilidade a uma doença complexa e representam o componente genético da etiologia da doença (Barabási et al., 2011; Romanoski et al., 2011).

O primeiro avanço fundamental no mapeamento genético de doenças humanas foi a identificação dos marcadores de DNA. Estes são segmentos de DNA genômico que mostram variabilidade entre os indivíduos e que são usados para mapear genes causadores de doenças. Eles são ferramentas importantes em análises de ligação, cujo objetivo é mapear o loco cromossomal de um gene responsável por uma doença através do uso de marcadores de DNA que têm locos conhecidos (Marian, 1995).

Estudos genéticos de doenças complexas podem também ser impulsionados por um conhecimento *a priori* do envolvimento potencial de um gene na patogênese do fenótipo, a qual é referida como abordagem do gene candidato (Marian e Belmont, 2011). No entanto, com o progresso gerado pelo Projeto Genoma Humano (PGH), os estudos de ligação e a abordagem do gene candidato estão sendo gradualmente substituídos por estudos de associação caso-controle, notavelmente estudos de associação genômica ampla (GWAS – *Genome-Wide Association Studies*). Essa mudança pode ser atribuída principalmente aos rápidos avanços nas tecnologias de genotipagem de SNPs, que permitem aos pesquisadores examinarem milhares de SNPs simultaneamente em um único microarranjo (Ragoussis, 2009).

Além disso, desde 2004, as tecnologias de microarranjo também impulsionaram consideravelmente a detecção de “variantes de número de cópias” (CNVs – *Copy Number Variants*) em diferentes populações (Korbel et al., 2007). Atualmente, a hibridização genômica comparativa em microarranjos (aCGH – *Array-Comparative Genomic Hybridization*) tornou-se a metodologia mais amplamente usada para o estudo e a identificação de anormalidades cromossômicas estruturais (Shaffer e Bejjani, 2009).

Estudos genéticos de doenças complexas são normalmente desenvolvidos considerando uma das seguintes hipóteses: doença comum-variante comum (DC-VC) ou doença comum-variante rara (DC-VR) (Pritchard, 2001; Bodmer e Bonilla, 2008; Schork et al., 2009; Cirulli e Goldstein, 2010). Variantes comuns são aquelas que têm MAF (*Minor Allele Frequency*) > 5% na população em geral, enquanto variantes de baixa frequência possuem MAF de 0,5-5%, e variantes raras têm MAF < 0,5% (Matullo et al., 2013). A hipótese DC-VC pressupõe que doenças complexas resultam de efeitos cumulativos de um grande número de variantes comuns, cada uma exercendo efeitos modestos. Ao contrário, a hipótese DC-VR postula que múltiplas variantes raras são as principais determinantes da herdabilidade das doenças complexas (Marian, 2012).

Os GWAS testam principalmente a hipótese DC-VC através da tipagem da população em estudo para *tag* SNPs que representam os haplótipos comuns. Mais de 1.200 GWAS foram concluídos com sucesso e milhares de locos para mais de 200 doenças complexas já foram identificados. De forma geral, a força dos GWAS está na elucidação de novos mecanismos envolvidos na patogênese das doenças complexas (Marian, 2012). Isto é exemplificado pela descoberta do gene do fator H do complemento (*CFH* – *complement factor H*) como um loco de susceptibilidade para a degeneração macular relacionada à idade (DMRI), o que resultou na associação do

processo inflamatório à patogênese da doença (Klein et al., 2005). No geral, as variantes no gene *CFH* aumentam o risco de DMRI por mais de 2 vezes e são responsáveis por aproximadamente metade do risco de DMRI nos irmãos de um indivíduo afetado (Klein et al., 2005; Maller et al., 2006; Manolio, 2010).

Os GWAS mudaram o campo da genética das doenças humanas, revelando a associação de milhares de SNPs comuns a diversos fenótipos complexos (Altshuler et al., 2008; Donnelly, 2008; Hindorff et al., 2009; Manolio e Collins, 2009). No entanto, dados que dão suporte ao papel de variantes raras em doenças complexas também foram relatados (Nejentsev et al., 2009; Bowes et al., 2010; Johansen et al., 2010). Isso sugere que a arquitetura genética das doenças complexas provavelmente incluía ambas as variantes, raras e comuns, e que o risco global resulte da soma de pequenos efeitos independentes dessas variantes (Naidoo et al., 2011; Matullo et al., 2013). Nesse sentido, fez-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de identificar variantes raras no genoma.

A partir de 2010, surgiram os *arrays* de genotipagem capazes de tipar 2,5 a 5,0 milhões de SNPs, com o objetivo de expandir a cobertura e incluir SNPs de menor frequência e até mesmo SNPs raros. No entanto, a promessa desses novos *arrays* de genotipagem está condicionada à adequação do poder estatístico dos estudos para identificar as associações de SNPs raros com doenças complexas. Isto sugere que amostras maiores serão necessárias em GWAS futuros (Newton-Cheh et al., 2009; Teslovich et al., 2010; Naidoo et al., 2011).

O desenvolvimento mais recente foi das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*). O NGS possibilita a identificação de várias VSDs em um genoma individual, desde variantes comuns até variantes raras (Marian, 2012). A facilidade para detecção de uma VSD depende, em parte, do contexto genômico em que essas variantes estão localizadas. Regiões repetitivas, variações estruturais, regiões satélites e CNVs ainda constituem o desafio principal para as tecnologias de sequenciamento. Podemos citar duas categorias principais de tecnologias de NGS: sequenciamento de todo exoma (WES – *Whole-Exome Sequencing*) e sequenciamento de todo genoma (WGS – *Whole-Genome Sequencing*) (Matullo et al., 2013). Os estudos envolvendo WGS identificaram centenas de milhares de novos SNPs que não tinham sido previamente catalogados no banco de dados do dbSNP (Naidoo et al., 2011).

Os prós e contras do uso do WGS e WES na prática médica e clínica devem ser levados em consideração: mesmo que a razão entre o preço e o conteúdo de informação tornem o WGS ou WES uma boa opção, os custos globais ainda são extremamente altos. Isso faz com que eles não possam ser facilmente disponibilizados como uma ferramenta de rotina pelos serviços médicos e instituições de saúde, principalmente nos países em desenvolvimento. Além disso, a grande quantidade de dados gerados por WGS ou WES não é facilmente interpretável no sentido clínico, dada as limitações atuais do conhecimento. Muito esforço deve ser dedicado ao desenvolvimento de novas ferramentas para o gerenciamento de dados e sua integração com bancos de dados clínicos (Matullo et al., 2013).

No contexto dos estudos moleculares de doenças genéticas humanas, a metodologia de PCR quantitativa em tempo real (qPCR – *Real-Time quantitative PCR*) também se destaca. Métodos de qPCR para a descoberta e genotipagem de SNPs, e também para a detecção precisa de CNVs, estão se tornando cada vez mais importantes em vários campos das ciências biológicas, incluindo a genética médica. Para o estudo de doenças genéticas humanas em centros de pesquisa de países em desenvolvimento, a qPCR surge como uma alternativa viável, por ser uma técnica sensível, específica e, principalmente, menos dispendiosa que as metodologias listadas acima, adequada à realidade de recursos limitados nesses países. Além disso, ela é considerada uma metodologia de fácil interpretação e simples de estabelecer em qualquer laboratório (Weksberg et al. 2005; Chen et al. 2006b; Gibson, 2006; Howald et al. 2006; Schubert e Laccone 2006; Hughes et al. 2007; Frigerio et al. 2011). Por tudo isso, a técnica de qPCR foi escolhida no presente trabalho como a metodologia principal para a realização de estudos moleculares de doenças genéticas humanas. Na primeira parte, utilizamos a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) como uma metodologia secundária. Diante do exposto colocam-se os objetivos do presente trabalho.

## **2- Objetivos Gerais**

- Identificar SNPs associados à degeneração macular relacionada à idade em Brasileiros, através de ensaios de discriminação alélica por qPCR com sondas *TaqMan*® alelo-específicas e análises de RFLP (Parte I);
- Utilizar a metodologia de qPCR como um teste de triagem molecular para a detecção de microdeleções cromossômicas associadas à síndrome velocardiofacial, síndrome de Williams-Beuren e monossomia 1p36 (Parte II).

## **3- Parte I**

**Identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em Brasileiros**



## 3.1- Introdução

### 3.1.1- Descrição clínica e epidemiologia da degeneração macular relacionada à idade (DMRI)

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI; OMIM #603075) é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta principalmente a região do centro da retina, denominada mácula, que é necessária para uma visão central definida (Swaroop et al., 2007; Swaroop et al., 2009; Chen et al., 2010a), e ocorre principalmente em pessoas acima de 50 anos (Chen et al., 2010b). Nos países desenvolvidos, a DMRI é a causa principal de perda irreversível da visão em idosos, afetando aproximadamente 10% da população acima de 65 anos e mais de 25% daqueles acima de 75 anos (Smith et al., 2001; Chen et al., 2010a). Nos Estados Unidos, a DMRI afeta aproximadamente 1,75 milhões de indivíduos e é esperado que esse número alcance 2,95 milhões no ano de 2020 (Friedman et al., 2004). Em termos mundiais estima-se que pelo menos 80 milhões de pessoas serão afetadas pela DMRI até o ano de 2020 (Clemons et al., 2005), sendo que atualmente ela é considerada a terceira causa mundial de cegueira (Katta et al., 2009; WHO, 2010). No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Oftalmologia, a DRMI já afeta cerca de 2,9 milhões de brasileiros acima de 65 anos de idade ([http://www.sboportal.org.br/site2/destaque/setembro\\_2010/destaque.asp](http://www.sboportal.org.br/site2/destaque/setembro_2010/destaque.asp)).

A apresentação clínica inicial da DMRI é o aparecimento de drusas, que são depósitos extracelulares de proteínas, lipídios, lipoproteínas e *debris* celulares que se acumulam entre o epitélio pigmentar da retina (EPR) e a membrana de Bruch ou dentro da membrana de Bruch (Hageman e Mullins, 1999; Chen et al., 2010b). Clinicamente, as drusas são classificadas quanto ao seu tamanho (pequenas, intermediárias ou grandes) e quanto à sua morfologia (moles ou duras). Drusas pequenas apresentam um diâmetro menor que 63  $\mu\text{M}$ , drusas intermediárias possuem de 63 a 124  $\mu\text{M}$  de diâmetro e drusas grandes são maiores que 125  $\mu\text{M}$ . Drusas duras, que são relativamente comuns em pacientes idosos com ou sem DMRI, aparecem como depósitos pontuais, amarelados e pequenos (menores que 63  $\mu\text{M}$  de diâmetro). A presença de drusas, especialmente drusas duras e em pequeno número, não é considerada um fator de risco particularmente importante para o desenvolvimento da DMRI. Ao contrário, drusas moles, que são caracterizadas por uma aparência mais “pálida” e difusa, com bordas irregulares ou

“borradas”, são indicativas de DMRI no estágio inicial (Ding et al., 2009). As drusas podem incluir componentes e reguladores da via do complemento (Hageman et al., 2001; Johnson et al., 2001) e a serina protease HTRA1 (Yang et al., 2006). Essa primeira fase da doença também é caracterizada pela hipopigmentação ou hiperpigmentação do EPR (Chen et al., 2010b). Com a progressão da doença as drusas crescem em tamanho e número. Nos estágios avançados, a DMRI pode ser classificada em duas categorias: atrofia geográfica (DMRI seca ou DMRI não-exudativa) ou neovascularização coroidal (DMRI úmida, DMRI exudativa ou DMRI neovascular).

A atrofia geográfica é caracterizada pela atrofia do EPR, levando à morte das células fotorreceptoras e perda progressiva da visão central (Ding et al., 2009; Chen et al., 2010a). A DMRI neovascular é caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos da coróide, seguido de hemorragia subretinal ou intraretinal (Lim et al., 2012), além de apresentar descolamento do EPR e formação de uma cicatriz fibrosa, denominada cicatriz disciforme (Chen et al., 2010b; Prasad et al., 2010). A DMRI no estágio avançado pode resultar em perda da acuidade visual central, ocasionando uma deficiência visual grave e permanente que pode levar à cegueira. Enquanto a atrofia geográfica representa 80-90% de todos os casos da doença na forma avançada, mais do que 90% dos pacientes com severa perda da visão central apresentam neovascularização coroidal (Bressler, 2002).

### **3.1.2- Fatores de risco ambientais e genéticos para a DMRI**

A etiologia da DMRI é complexa e multifatorial, e a susceptibilidade à doença é influenciada por fatores genéticos e ambientais (Seddon e Chen, 2004). Entre os fatores ambientais, a idade e o tabagismo estão entre os fatores de risco mais consistentes (Leveziel et al., 2011; Priya et al., 2012a). Estudos mostraram uma incidência superior de DMRI em mulheres comparada aos homens (Leibowitz et al., 1980; Klein et al., 2004), além de uma idade precoce de começo da doença em mulheres (Marshall, 1987). Fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão e hiperlipidemia, alto índice de massa corporal (IMC) e consumo de álcool também são citados na literatura, embora os resultados não sejam consistentes (Hirvelä et al., 1996; Klein et al., 2001; Chong et al., 2008; Lim et al., 2012; Ratnapriya e Chew, 2013).

Estudos baseados em população têm revelado diferenças significativas na incidência e predomínio de subtipos da DMRI entre diferentes grupos étnicos/raciais

nos Estados Unidos (Friedman et al., 2004; Klein et al., 2006), Europa (Klaver et al., 1998) e Austrália (Mitchell et al., 1995; VanNewkirk et al., 2000). Estudos mostram que indivíduos Brancos de ancestralidade Européia apresentam um risco superior de desenvolvimento da DMRI comparado aos indivíduos de ancestralidade Africana (Friedman et al., 2004). Sugere-se também um menor predomínio da DMRI em populações da China e Japão comparado aos indivíduos Brancos (Oshima et al., 2001; Li et al., 2006b). Entretanto, um estudo piloto demonstrou um predomínio similar da DMRI em populações da Índia e Europa (Gupta et al., 2007). Um grande estudo, denominado Estudo Multi-Étnico de Aterosclerose (MESA – *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*), examinou quatro grupos étnicos/raciais vivendo em seis comunidades nos Estados Unidos e relatou um predomínio menor de DMRI em indivíduos Pretos comparado aos indivíduos Brancos. Esse predomínio variou de 2,4% em indivíduos Pretos, 4,2% em Hispânicos, 4,6% em Chineses, comparado a 5,4% em indivíduos Brancos (Klein et al., 2006). Um predomínio maior de DMRI em indivíduos Brancos comparado aos indivíduos Pretos também foi relatado em outros dois estudos: O Exame de Olho de Baltimore (*The Baltimore Eye Survey*) (Friedman et al., 1999) e O Projeto de Avaliação do Olho de Salisbury [*The Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project*] (Bressler et al., 2008). Ainda não está claro se essas diferenças entre as populações são devido a fatores genéticos ou ambientais, ou ambos. Contudo, diferenças evidentes no predomínio da DMRI entre os grupos étnicos/raciais enfatizam a importância dos estudos genéticos (Pritchard e Rosenberg, 1999; Devlin e Roeder, 1999).

Estudos genéticos de ligação e, principalmente, estudos de associação genômica ampla (GWAS) têm fornecido fortes evidências da presença de várias regiões no genoma humano que abrigam locos de susceptibilidade para a DMRI (Seddon et al., 2003; Kenealy et al., 2004; Weeks et al., 2004; Fisher et al., 2005). O primeiro gene a ser associado à DMRI foi o *CFH*, localizado no cromossomo 1 (Edwards et al., 2005; Klein et al., 2005; Maller et al., 2006). A partir dessa descoberta, vários pesquisadores começaram a investigar a presença de polimorfismos em outros genes, incluindo os da via do complemento, que poderiam também estar associados à doença. Dessa forma, SNPs associados à DMRI foram identificados em genes como: *CFB/C2* (Gold et al., 2006; Maller et al., 2006; Spencer et al., 2007; McKay et al., 2009); *C3* (Maller et al., 2007; Yates et al., 2007); *CFI* (Fagerness et al., 2009); *ARMS2(LOC387715)/HTRA1* (DeWan et al., 2006; Maller et al., 2006; Schmidt et al., 2006; Yang et al., 2006); *SYN3*, próximo do gene *TIMP3* (Chen et al., 2010a); *APOE* (McKay et al., 2011); *VEGFA* (Yu

et al., 2011); *LIPC* (Neale et al., 2010); *CETP* (Chen et al., 2010a); entre outros. Na maioria das populações, os genes *CFH* e *ARMS2(LOC387715)/HTRA1* surgiram como os locos mais significativamente associados ao risco de DMRI, proteção ou ambos (Priya et al., 2012a). Além do genoma nuclear, pesquisas envolvendo o genoma mitocondrial também revelaram a presença de SNPs associados à DMRI (Canter et al., 2008). No início de 2010, dezoito grupos de pesquisa se uniram e formaram o *AMD Gene Consortium*, com o objetivo de identificar novos locos de susceptibilidade para a DMRI. Para isso, eles realizaram uma meta-análise de diversos GWAS, incluindo mais de 17.100 casos de DMRI no estágio avançado e mais de 60.000 controles de ancestralidade Européia e Asiática. A meta-análise identificou e validou 19 locos associados à DMRI, incluindo 7 novos locos próximos aos genes *COL8A1-FILIP1L*, *IER3-DDR1*, *SLC16A8*, *TGFBR1*, *RAD51B*, *ADAMTS9* e *B3GALTL* (Fritsche et al., 2013).

Avanços recentes nas tecnologias de NGS estão tornando possível a identificação de alelos raros associados à DMRI através de projetos de sequenciamento completo de genomas e exomas (Metzker, 2010; Priya et al., 2012b). O sequenciamento de uma região de 106,7 kb ao redor do gene *CFH* identificou uma variante rara, R1210C, em pacientes com DMRI (Raychaudhuri et al., 2011). Outro alelo funcional, G119R no gene *CFI*, também foi associado ao aumento de risco para a DMRI (van de Ven et al., 2013).

### **3.1.3- Patogênese da DMRI e modelos animais**

Com todo o avanço na descoberta de locos de susceptibilidade para a DMRI, diversas vias biológicas têm sido associadas à patogênese da doença: via do complemento, via de metabolismo de lipídios e colesterol, via da matriz do colágeno e matriz extracelular, via de *stress* oxidativo e via de sinalização da angiogênese (Swaroop et al., 2009; Gorin et al., 2012; Priya et al., 2012a). De forma geral, o modelo atual de patogênese da DMRI provavelmente envolve dano oxidativo progressivo na retina e EPR, resultando em mudanças estruturais e bioquímicas que promovem inflamação e angiogênese, particularmente em pacientes com predisposição genética (Prasad et al., 2010).

Modelos animais da DMRI, especialmente camundongos, estão sendo desenvolvidos para ajudar a entender melhor a patogênese da doença, assim como para

fornecer modelos pré-clínicos apropriados para intervenção farmacêutica. As principais desvantagens no uso de camundongos é que além de não terem mácula, existem divergências no sistema imune inato e adaptativo entre camundongos e humanos (Mestas e Hughes, 2004). Apesar disso, existem semelhanças em processos patológicos e fisiológicos básicos quando comparado aos humanos. Por exemplo, determinados genes que causam degeneração na retina em humanos têm seus “representantes” em camundongos. Um benefício adicional é a duração relativamente curta requerida para estudar a patofisiologia em camundongos, embora modelos animais “envelhecidos” devam ser usados para mimetizar a DMRI tanto quanto possível (Khandhalia et al., 2012). Modelos de camundongos incluem exposição constante à luz (para causar fototoxicidade, resultando em danos nas células fotorreceptoras e nas células do EPR) (Lai et al., 1978), aplicação de *laser* (para induzir neovascularização coroidal) (Tobe et al., 1998) e modelos *knock-out* principalmente de genes da via do complemento (Coffey et al., 2007). Como exemplo, em 2007, um estudo mostrou que camundongos *Cfh*<sup>-/-</sup> exibiram uma diminuição na acuidade visual e disfunção de células fotorreceptoras relacionada à idade, com evidência de depósito de proteínas C3 e mudanças estruturais na retina. Contudo, houve menor formação de materiais semelhantes às drusas no sub-EPR comparado aos controles do tipo selvagem (Coffey et al., 2007).

### **3.1.4- Estratégias de tratamento e administração clínica da DMRI**

Os principais tratamentos atualmente disponíveis para a DMRI neovascular são: terapia fotodinâmica e terapia anti-VEGF. A terapia fotodinâmica foi introduzida no final da década de 90 e, nos dias atuais, ela é raramente usada. Esse tratamento consiste na infusão intravenosa de verteporfina, uma sonda fotossensibilizante que se acumula preferencialmente nas membranas neovasculares, seguido por ativação dessa sonda com luz infravermelha. Esse processo gera radicais livres de oxigênio que danificam o endotélio, promovendo o fechamento dos vasos sanguíneos recém-formados (Lim et al., 2012). Entretanto, a eficácia desse tratamento é limitada (Chen et al., 2010b).

A terapia anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) consiste no uso de inibidores VEGF para o tratamento da DMRI neovascular, geralmente aplicados via uma injeção intravítrea. O VEGF é um regulador-chave da angiogênese e da permeabilidade vascular, e induz a neovascularização coroidal em animais. Em humanos, existem quatro isoformas de VEGF: VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 e

VEGF-206 (Lim et al., 2012). Dois inibidores são amplamente usados: ranibizumab (Lucentis®; Genentech, Inc, South San Francisco, CA) e bvacizumab (Avastin®; Genentech, Inc, South San Francisco, CA). Ambos diminuem a permeabilidade vascular anormal e o crescimento de novos vasos sanguíneos (Priya et al., 2012a). O ranibizumab é um fragmento de anticorpo monoclonal humanizado e tem como alvo todas as isoformas de VEGF. Triagens clínicas usando o ranibizumab mostram além de estabilização visual em mais de 90% dos pacientes, também uma significativa melhora visual em 25-33% dos pacientes ao longo de um período de dois anos (Brown et al., 2006; Rosenfeld et al., 2006). Seu uso no tratamento da DMRI neovascular foi aprovado pela FDA norte-americana (*US Food and Drug Administration*) em 2006. O bevacizumab é um anticorpo monoclonal humanizado completo, que também se liga a todas as isoformas de VEGF e possui uma eficácia equivalente à do ranibizumab. O bevacizumab foi aprovado pela FDA para o tratamento de carcinoma colorretal metastático e de outros tipos de câncer. Entretanto, seu uso no tratamento da DMRI neovascular é aprovado atualmente apenas pela *Medicare*, que é um programa nacional de seguro social administrado pelo Governo Federal dos Estados Unidos. Apesar disso, o bevacizumab é usado como uma terapia “*off-label*” para o tratamento da DMRI neovascular desde 2005 (Ip et al., 2008) pois, além de mostrar resultados semelhantes ao do ranibizumab, ele tem menor custo para o paciente (CATT Research Group, 2011).

Uma estratégia para a prevenção da DMRI neovascular é baseada na suplementação nutricional. Em 2001, o Estudo de Doença do Olho Relacionada à Idade (AREDS – *Age-Related Eye Disease Study*) estabeleceu que uma combinação de antioxidantes e minerais (formulação AREDS) consistindo de  $\beta$ -caroteno (15 mg), vitaminas C (500 mg) e E (400 IU), zinco (80 mg) e cobre (2 mg), reduz em 25% o desenvolvimento das formas avançadas da DMRI (ao longo de um período de cinco anos) e reduz em 19% a grave perda visual em indivíduos que foram determinados serem de alto risco para desenvolver as formas avançadas da doença. Análises recentes demonstram que os efeitos benéficos da formulação AREDS estão principalmente associados a uma diminuição no risco de desenvolvimento da forma neovascular da doença (Chew et al., 2013). Outro estudo, denominado Estudo de Doença do Olho Relacionada à Idade 2 (AREDS2 - *Age-Related Eye Disease Study 2*), que teve início em 2008, avaliou se a adição de luteína (10 mg)/zeaxantina (2 mg) e/ou ácidos graxos  $\omega$ -3 [ácido docosahexaenóico (DHA, 350 mg) e ácido eicosapentaenóico (EPA, 650 mg)] afetavam a progressão para a DMRI avançada (SanGiovanni et al., 2008). Os

resultados mostraram que a adição de ácidos graxos  $\omega$ -3 à formulação AREDS promoveu efeitos benéficos adicionais, com um aumento de aproximadamente 20% na redução do risco de progressão para a DMRI avançada. Além disso, verificou-se uma associação do  $\beta$ -caroteno com um aumento no risco de câncer de pulmão, principalmente em fumantes. As recomendações a partir dos resultados do AREDS2 incluem a eliminação do  $\beta$ -caroteno e sua substituição por luteína/zeaxantina na formulação AREDS. O uso desses suplementos orais, assim como modificações na dieta e estilo de vida, são medidas profiláticas contra a progressão para a forma neovascular da doença (Prasad et al., 2010). Atualmente, pesquisas relatam a influência do genótipo do paciente na resposta aos tratamentos para a DMRI (Clemons et al., 2005; Brantley et al., 2009).

### **3.1.5- Farmacogenômica e DMRI**

A farmacogenômica estuda como o perfil genético de um indivíduo afeta sua resposta a um determinado tratamento, tanto em termos de eficácia quanto de reações adversas. Embora a terapia anti-VEGF seja muito eficaz, variações individuais na resposta ao tratamento e reações adversas ocasionais constituem desafios terapêuticos. Essas diferenças inter-individuais na resposta ao tratamento são frequentemente atribuídas às variações genéticas, o que resultou no desenvolvimento de estudos farmacogenéticos com o objetivo de oferecer uma medicina personalizada aos pacientes com DMRI (Priya et al., 2012a; Ratnapriya e Chew, 2013). Em 2007, um grupo de pesquisadores estudou a associação entre a variante Y402H no gene *CFH* (rs1061170) e a resposta à terapia intravítrea com bevacizumab em 86 pacientes. Y402H foi a primeira variante genética que mostrou associação significativa com o risco de DMRI em GWAS (Haddad et al., 2006; Swaroop et al., 2009; Deangelis et al., 2011). Eles relataram que 53% dos pacientes com DMRI que tinham os genótipos TT ou TC melhoraram a acuidade visual após o tratamento com bevacizumab, enquanto somente 10% dos pacientes com o genótipo de risco CC mostraram acuidade visual melhor (Brantley et al., 2007). Uma relação farmacogenética entre esse mesmo SNP e resposta à terapia com ranibizumab também mostrou resultados semelhantes em um grupo de 156 pacientes com DMRI: indivíduos homocigotos para o alelo de risco (CC) necessitaram de um número maior de injeções com ranibizumab do que aqueles com os genótipos TT ou TC (Lee et al., 2009). Apesar de novos estudos, incluindo grupos maiores de

pacientes, serem necessários para dar maior suporte a essas associações farmacogenéticas (Priya et al., 2012a), esses resultados iniciais fortalecem o conceito de que, no futuro, a escolha da terapia usada no tratamento da DMRI será positivamente influenciada pela determinação do risco genético do paciente (medicina personalizada) (Gehrs et al., 2010).

### **3.1.6- Justificativa para a realização de teste genético para a predição de risco da DMRI**

A capacidade de examinar pacientes em um estágio pré-clínico para o risco de uma doença genética fornece uma oportunidade para impedir ou, pelo menos, atenuar a doença em uma fase posterior da vida (Gehrs et al., 2010). Atualmente, a DMRI representa um grande problema de saúde pública, com significativo impacto econômico e social em diversos países. Devido à perda progressiva da visão central, a DMRI pode ter um enorme impacto na capacidade dos pacientes de realizarem atividades do dia-a-dia, como andar, ler e dirigir. Além disso, a deficiência visual resultante da DMRI nos estágios avançados pode também levar à depressão, que é frequentemente subestimada. Dessa forma, a DMRI pode impactar a qualidade de vida e independência do paciente de forma devastadora (Stein et al., 2003; Leveziel et al., 2011). Ao contrário, a DMRI nos estágios iniciais tem um impacto menor, o que enfatiza a necessidade de estratégias de prevenção e de detecção precoce da doença. Portanto, a avaliação pré-sintomática do risco para a DMRI e o cuidado personalizado para prolongar o tempo de vida saudável do paciente estão se tornando prioridades globais (Leveziel et al., 2011).

A porcentagem de variabilidade no risco de DMRI devido às variantes genéticas foi estimada em 45-70% (Seddon et al., 2005; Seddon et al., 2009; Spencer et al., 2011). Portanto, exames genéticos capazes de identificar um indivíduo de alto risco, através da determinação de variantes genéticas que aumentam a susceptibilidade de desenvolvimento da doença, podem ser considerados uma ferramenta importante para um tratamento precoce. Uma vez que os sinais da DMRI não aparecem até a quinta ou sexta década de vida, a detecção precoce de um indivíduo com risco de desenvolvimento da DMRI levará a melhores estratégias de administração da doença (Priya et al., 2012a; Ratnapriya e Chew, 2013). O prognóstico da DMRI poderá permitir uma melhor preservação da visão do paciente através de uma vigilância médica



orientada e de intervenção terapêutica adequada. Indivíduos de alto risco poderiam também se beneficiar de uma reeducação para um estilo de vida mais saudável, já que fatores ambientais como o tabagismo podem aumentar a incidência e a progressão da doença, principalmente quando associados às variantes genéticas de alto risco. Dessa forma, modificações nutricionais e de comportamento poderiam retardar a idade de começo e reduzir a gravidade da doença (Chen et al., 2010b). Uma vez um indivíduo tenha desenvolvido a DMRI no estágio inicial, ainda existe uma forte justificativa para uma triagem genética: por exemplo, o número e a natureza dos alelos associados à DMRI podem influenciar significativamente a velocidade de progressão da doença (Gehrs et al., 2010).

Sendo uma doença relativamente bem caracterizada em termos clínicos e de influências genéticas e ambientais, a DMRI torna-se um excelente alvo para aplicação dos princípios da medicina personalizada (Chen et al., 2010b). Além disso, a personalização do tratamento baseada no genótipo de cada paciente permitirá aos médicos maximizarem o benefício do tratamento, minimizando as manifestações clínicas da doença e garantindo melhor qualidade de vida ao paciente. Com todas as descobertas e avanços genéticos que estão ocorrendo, brevemente poderá ser possível fornecer diagnósticos pré-sintomáticos com razoável precisão, levando a melhores estratégias de administração da DMRI em indivíduos de alto risco (Swaroop et al., 2007).

Por isso, consideramos de grande importância médica/social identificar polimorfismos genéticos associados à DMRI na população Brasileira, visto que são relatadas diferenças no predomínio da DMRI baseado na raça/etnicidade (Pritchard e Rosenberg, 1999; Devlin e Roeder, 1999). Dois trabalhos desenvolvidos recentemente demonstraram a associação significativa de três SNPs com a DMRI em Brasileiros: rs1413711 (*VEGF*), em um grupo caso-controle de 300 indivíduos (160 casos e 140 controles) (Almeida et al., 2012); rs10490924 (*ARMS2/LOC387715*) e rs1061170 (*CFH*) em um grupo caso-controle de 317 indivíduos (163 casos e 154 controles) (Almeida et al., 2013). Três anos antes do trabalho publicado por Almeida et al. (2013), Teixeira et al. (2010) já haviam demonstrado a associação significativa de rs1061170 com a DMRI em um grupo caso-controle de 271 Brasileiros (119 casos e 152 controles). Com o objetivo de expandir esses estudos iniciais, nós decidimos ampliar o número de marcadores analisados na população Brasileira. Para isso, escolhemos SNPs localizados nos dois principais locos de susceptibilidade para a DMRI (*CFH*: rs1061147

e rs1329428; *ARMS2/LOC387715*: rs3750847); três SNPs localizados em outros genes da via do complemento (*C3*: rs2230199; *C2*: rs547154 e rs9332739); um SNP localizado no gene *SYN3*, próximo de *TIMP3* (rs9621532); e um SNP mitocondrial (*MT-ND2*: rs28357980). Todos esses polimorfismos já foram descritos na literatura em estudos envolvendo outras populações mundiais (Hageman et al., 2005; Klein et al., 2005; Maller et al., 2006; Francis et al., 2007; Kanda et al., 2007; Canter et al., 2008; Jakobsdottir et al., 2008; Scholl et al., 2009; Chen et al., 2010a; Kopplin et al., 2010; Arakawa et al., 2011; Dong et al., 2011; Sivakumaran et al., 2011; Fritsche et al., 2013). Embora esses alelos polimórficos tenham sido associados à DMRI em pacientes de diferentes origens étnicas, estudos de replicação independentes são necessários para avaliar com precisão a contribuição étnico-específica desses alelos para esta doença complexa. A população Brasileira é composta principalmente por uma mistura de três raízes ancestrais (Africana, Ameríndia e Européia) e, por isso, representa um *pool* genético interessante para comparar o efeito de alelos de risco/protetores que foram previamente caracterizados em outras populações mundiais. Investigamos também uma possível associação do SNP rs12913832, localizado no gene *HERC2* e que determina a cor de olho azul-marrom em humanos (Sturm et al., 2008), com a DMRI. Uma vez que indivíduos Brancos de ancestralidade Européia apresentam um risco superior de desenvolvimento da DMRI (Friedman et al., 2004) e a cor de olho azul é limitada principalmente às pessoas de origem Européia (Sturm et al., 2008), consideramos interessante verificar se esse SNP apresentava alguma associação com a DMRI.

### 3.2- Objetivos específicos

- Genotipar um SNP mitocondrial por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) e oito SNPs nucleares por ensaios *TaqMan*® (Applied Biosystems, Foster City, CA), em um grupo caso-controle de 192 indivíduos Brasileiros (122 casos e 70 controles);
- Sequenciar três indivíduos com alelos/genótipos diferentes para cada SNP;
- Determinar os valores de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia de cada indivíduo utilizando um painel de 40 marcadores indels bialélicos (Bastos-Rodrigues et al., 2006; Pena et al., 2009);
- Identificar os SNPs que apresentam associação significativa com a DMRI em Brasileiros através de análises estatísticas utilizando os programas *Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA), *PLINK*, versão 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) e *MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

### **3.3- Material e Métodos**

#### **3.3.1- Indivíduos**

O presente estudo contou com a participação de 122 indivíduos portadores de DMRI e 70 indivíduos controles que foram examinados no período entre 2007 e 2009. As etapas de exame clínico e extração de DNA dos participantes foram realizadas no Instituto de Visão e no Departamento de Oftalmologia da UFMG, localizados na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, sob a supervisão dos professores Márcio Bittar Nehemy (Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina da UFMG) e Luiz Armando De Marco (Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG), que gentilmente nos forneceram as amostras de DNA genômico que foram utilizadas nesse trabalho.

Todos os participantes foram informados verbalmente e por escrito sobre a natureza e a finalidade do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Cada paciente foi submetido a um exame clínico oftalmológico completo. Angiografia com fluoresceína (AF) e tomografia de coerência óptica (TCO) foram realizadas em todos os pacientes com DMRI. Angiografia com indocianina verde (AIV) também foi realizada quando indicada.

Os critérios clínicos e graus usados para definir a DMRI foram baseados no sistema CARMS (*Clinical Age-Related Maculopathy Staging*), descrito e validado por Seddon et al. (2006) (Tabela 1).

**Tabela 1. O sistema CARMS (*Clinical Age-Related Maculopathy Staging*)**

<b>Grau de maculopatia</b>	<b>Características clínicas</b>
1	Nenhuma drusa ou < 10 drusas pequenas sem anormalidades pigmentares
2	Aproximadamente $\geq 10$ drusas pequenas ou < 15 drusas intermediárias, ou anormalidades pigmentares associadas à maculopatia relacionada à idade  a. Drusas  b. Alterações no EPR (hiperpigmentação ou hipopigmentação)  c. Ambos, drusas e alterações no EPR
3	Aproximadamente $\geq 15$ drusas intermediárias ou qualquer drusa grande  a. Ausência de descolamento drusenóide do EPR  b. Presença de descolamento drusenóide do EPR
4	Atrofia geográfica com envolvimento do centro macular, ou atrofia geográfica não central com pelo menos $\geq 350 \mu\text{m}$ em tamanho
5	DMRI exudativa, incluindo descolamento não-drusenóide do EPR, descolamento seroso ou hemorrágico da retina, membrana neovascular coroidal (MNC) com hemorragias ou fibroses sub-retiniana ou sub-EPR, ou cicatrizes compatíveis com o tratamento da DMRI  a. Descolamento seroso do EPR, sem MNC  b. MNC ou cicatriz disciforme

DMRI: degeneração macular relacionada à idade.

EPR: epitélio pigmentar da retina.

Drusas pequenas: < 63  $\mu\text{m}$  de diâmetro, localizadas dentro de dois diâmetros de disco (DD) do centro da mácula; drusas intermediárias:  $\geq 63 \mu\text{m}$  e < 125  $\mu\text{m}$ , localizadas dentro de 2 DDs do centro da mácula; drusas grandes:  $\geq 125 \mu\text{m}$  de diâmetro, localizadas dentro de 2 DDs do centro da mácula; descolamento drusenóide do EPR: drusas moles confluentes  $\geq 500 \mu\text{m}$  de tamanho.

[Traduzido a partir de Seddon et al. (2006)]

Os pacientes foram diagnosticados da seguinte forma: ausência de DMRI: grau 1; DMRI precoce: graus 2 e 3; DMRI avançada: graus 4 (atrofia geográfica) e 5 (neovascularização coroidal). Pacientes com mais de 10 drusas pequenas ou menos que 15 drusas intermediárias, sem alterações no EPR ou outra doença retiniana (miopia elevada ou distrofias retinianas), não foram incluídos. Pacientes com uma história positiva para a doença de Alzheimer, artrite reumatóide, câncer ou lúpus foram excluídos. A distribuição dos 192 indivíduos participantes de acordo com o grau de maculopatia definido pelo sistema CARMS é apresentada na Tabela 2.

Todos os participantes foram submetidos a um questionário criterioso que incluiu informações sobre: sexo, idade, história de tabagismo, hipertensão e/ou hipercolesterolemia. A classificação dos indivíduos em Branco, Pardo ou Preto foi feita por auto-definição. Todos foram submetidos à mensuração da altura e do peso para cálculo do índice de massa corporal (IMC). O cálculo do IMC é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros ( $\text{kg/m}^2$ ) ([http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), de acordo com o Parecer nº ETIC 395/07, de 20 de setembro de 2010. Os métodos usados nesse estudo estão de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki.

**Tabela 2. Distribuição dos 192 indivíduos participantes de acordo com o grau de maculopatia definido pelo sistema CARMS**

<b>Fenótipo</b>	<b>Grau de maculopatia (CARMS)</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>Total</b>
Controle	1	70	70
Caso (DMRI)	2 e 3	20	122
	4	12	
	5	90	

DMRI: degeneração macular relacionada à idade.

CARMS: *Clinical Age-Related Maculopathy Staging*.

### 3.3.2- Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de sangue total usando o método de *salting-out* (Lahiri e Nurnberger Junior, 1991). As amostras de DNA foram quantificadas através de experimentos de eletroforese em gel de agarose. Uma alíquota de 1 µL de cada amostra de DNA foi misturada a 5 µL de tampão de corrida 2X (0,25% de xilenocianol, 0,25% de azul de bromofenol e 30% de glicerol). O volume final foi aplicado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, junto com diferentes padrões de concentração (variando de 1 a 100 ng/µL). A corrida eletroforética foi realizada a 80 volts em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mM, pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) e o resultado visualizado sob luz ultravioleta. Após a quantificação, o DNA foi diluído em água *nuclease-free* para uma concentração final de 2,5 ng/µL.

### 3.3.3- Seleção de SNPs

Oito SNPs, descritos na literatura em estudos de associação com a DMRI envolvendo outras populações mundiais, foram selecionados para genotipagem nos indivíduos Brasileiros participantes desse estudo. Sete SNPs estão localizados no genoma nuclear: rs1061147 e rs1329428 no gene *CFH* (Hageman et al., 2005; Chen et al., 2006; Francis et al., 2007; Dong et al., 2011; Sivakumaran et al., 2011); rs2230199 no gene *C3* (Scholl et al., 2009; Kopplin et al., 2010; Fritsche et al., 2013); rs3750847 no gene *ARMS2/LOC387715* (Kanda et al., 2007; Arakawa et al., 2011); rs547154 e rs9332739 no gene *C2* (Maller et al., 2006; Jakobsdottir et al., 2008); e rs9621532 no gene *SYN3*, próximo de *TIMP3* (Chen et al., 2010a). Um SNP está localizado no genoma mitocondrial: rs28357980 no gene *MT-ND2* (Canter et al., 2008). Foi também escolhido o SNP rs12913832 (gene *HERC2*) que determina a cor de olho azul-marrom em humanos (Sturm et al., 2008). Uma vez que indivíduos Brancos de ancestralidade Européia apresentam um risco superior de desenvolvimento da DMRI (Friedman et al., 2004) e a cor de olho azul é limitada principalmente às pessoas de origem Européia (Sturm et al., 2008), consideramos interessante verificar se esse SNP apresenta alguma associação com a DMRI. Na Tabela 3 encontram-se algumas informações relativas aos SNPs selecionados nesse estudo.



**Tabela 3. Identificação do SNP, cromossomo, loco, posição cromossomal, alelos, localização éxon/intron e MAF no dbSNP**

SNP (dbSNP)	Cromossomo	Loco	Posição Cromossomal	Alelos	Éxon/Íntron <sup>a</sup>	MAF no dbSNP <sup>b</sup>
rs1061147	1	<i>CFH</i>	196654324	A/C	Éxon (Ala307Ala)	A = 0,295
rs1329428	1	<i>CFH</i>	196702810	T/C	Íntron	T = 0,441
rs547154	6	<i>C2</i>	31910938	T/G	Íntron	T = 0,100
rs9332739	6	<i>C2</i>	31903804	G/C	Éxon (Glu318Asp)	C = 0,030
rs3750847	10	<i>ARMS2</i>	124215421	T/C	Íntron	T = 0,274
rs12913832	15	<i>HERC2</i>	28365618	G/A	Íntron	G = 0,291
rs2230199	19	<i>C3</i>	6718387	C/G	Éxon (Arg102Gly)	C = 0,098
rs9621532	22	<i>SYN3</i>	33084511	C/A	Íntron	NA
rs28357980	MT	<i>MT-ND2</i>	4917	A/G	Éxon (Asn150Asp)	G = 0,035

MAF = Frequência do Alelo Menor (*Minor Allele Frequency*).

dbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

MT: mitocondrial; NA: 'not available' (dado não disponível).

<sup>a</sup>Para os SNPs localizados dentro de regiões exônicas, é mostrado entre parênteses a correspondente mudança aminoacídica.

<sup>b</sup>O dbSNP relata a frequência do alelo menor para cada "rs" incluído em uma população mundial padrão. A atual população mundial padrão corresponde aos dados genotípicos de 1.092 indivíduos de todo o mundo analisados na fase 1 do Projeto 1000 Genomas (*1,000 Genomes Project*), liberado em maio de 2011.

Por exemplo, para o SNP rs1061147, o alelo menor é "A" e ele tem uma frequência de 29,5% na população da fase 1 do Projeto 1000 Genomas.

### 3.3.4- Genotipagem

#### 3.3.4.1- Genotipagem usando sondas *TaqMan*®

Os SNPs rs1061147, rs1329428, rs2230199, rs3750847, rs547154, rs9332739, rs9621532 e rs12913832 foram genotipados usando *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acordo com instruções do fabricante. Todos os polimorfismos foram genotipados usando ensaios pré-desenhados pela empresa Applied Biosystems, com exceção de rs9621532 cujo ensaio foi customizado exclusivamente para esse estudo. As reações de amplificação foram feitas em placas de 384 *wells* e cada reação continha 2,25 µL de DNA genômico (concentração de 2,5 ng/µL); 0,25 µL do ensaio *TaqMan*® correspondente (diluição de 20X); e 2,5 µL de *TaqMan*® *Genotyping Master Mix*, totalizando 5 µL de reação final. As condições de amplificação foram: uma etapa de 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos constituídos por uma etapa de desnaturação a 95°C por 15 segundos e uma etapa associada de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Em todas as placas de reações foi feito um controle branco de amplificação (NTC – *No Template Control*) para cada ensaio *TaqMan*®, onde água estéril foi acrescentada no lugar de DNA. O DNA de um indivíduo controle, cujo genótipo para cada loco era previamente conhecido, foi utilizado em todas as placas de reações com o objetivo de garantir precisão nos resultados das genotipagens. As reações de amplificação e a determinação dos genótipos foram feitas usando o aparelho *ABI 7900 HT Fast PCR Real Time System* e o *TaqMan*® *Genotyper Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA), respectivamente.

#### 3.3.4.2- Genotipagem usando a metodologia de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

O SNP mitocondrial rs28357980 foi genotipado usando a metodologia de RFLP. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores *forward* (N-mt4917-F) e *reverse* (N-mt4917-R) são, respectivamente: 5'-GCAAGCAACCGCATCC-3' e 5'-GGGTCGTGGTGCTGGA-3'. Cada reação de amplificação continha 10 ng de DNA molde; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão *PCR buffer* 1X (Invitrogen™); 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,25 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 unidade de *Platinum*® *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), totalizando

um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação), 59°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 20 segundos (extensão). Uma última etapa de extensão foi realizada a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações de PCR foi feito um controle branco de amplificação (NTC), onde água estéril foi acrescentada no lugar de DNA.

As reações de digestão enzimática foram feitas utilizando a endonuclease de restrição FspBI (BfaI) seguindo as instruções do fabricante (Fermentas International Inc.). As digestões foram efetuadas em volume final de 31  $\mu\text{L}$ , contendo 10  $\mu\text{L}$  do produto de PCR, 2  $\mu\text{L}$  do tampão de digestão *Buffer Tango*<sup>TM</sup> 10X (Fermentas International Inc.), 1  $\mu\text{L}$  da enzima de restrição FspBI (Fermentas International Inc.) e 18  $\mu\text{L}$  de água *nuclease-free*. As misturas de reação foram incubadas por aproximadamente 16 horas (*overnight*) a 37°C (temperatura ótima de digestão da enzima utilizada). Os produtos de digestão foram submetidos à corrida eletroforética em géis de poliacrilamida e corados com brometo de etídeo para análise dos resultados. Nessa etapa, 5  $\mu\text{L}$  do produto de PCR resultante da digestão enzimática foram previamente preparados com 5  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida 2X (0,25% de xilenocianol, 0,25% de azul de bromofenol e 30% de glicerol) e aplicados em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante. Dois marcadores de peso molecular [*1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>) e marcador de 25 pb] também foram aplicados em todos os géis para confirmar o tamanho dos fragmentos produzidos após a reação de digestão. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts por aproximadamente 90 minutos em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mM, pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM). Em seguida, os géis foram incubados em tampão TBE 1X contendo brometo de etídeo na concentração final de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta.

### **3.3.5- Sequenciamento**

O sequenciamento dos produtos de PCR contendo os polimorfismos em estudo foi feito com o objetivo de validar as metodologias *TaqMan*<sup>®</sup> e RFLP usadas na etapa de genotipagem.

### 3.3.5.1- Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para as reações de sequenciamento foi feito utilizando o programa *Primer3*, versão 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), a partir das sequências gênicas correspondentes depositadas no dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Os oligonucleotídeos foram desenhados de tal forma que cada *amplicon* continha um polimorfismo em estudo. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 4.

**Tabela 4. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho esperado dos *amplicons***

SNP (dbSNP)	Cromossomo	Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
rs1061147	1	rs1061-F	CAGAACTGGAGATGAAATCACG	266
		rs1061-R	TTTCGGCAACTTCGAAAAC	
rs1329428	1	N-rs1329-F	TAATGAACTTGCATCAGGCACT	346
		N-rs1329-R	CACTTGATGGATGACACAAACC	
rs547154	6	rs5471-F	TGGTGTCTGTGAGCTTGGAG	267
		rs5471-R	AAGCTGGATGTGGACTGGAG	
rs9332739	6	rs9332-F	CTCCAGGGCCCTTTGTTT	287
		rs9332-R	GTTTGCAGGCCCTGAGAG	
rs3750847	10	rs3750-F	GCGAACCCTTCCCCTAAA	271
		rs3750-R	TGCCTAAATGGCAGCATGT	
rs12913832	15	rs1291-F	TCTTAATTCAAATGCCCCAAGTA	369
		rs1291-R	ACCACTGGTAGTTTTCTTTGCCAAT	
rs2230199	19	N-rs2230-F	AGCTCTCTCCTCCTTGTGAGC	491
		N-rs2230-R	TTGACGGTGAAGATCCGATAG	
rs9621532	22	N-rs9621-F	CCCGAGGTGGGAATGTTAC	224
		N-rs9621-R	GACGTGGAATGAAGCATGG	
rs28357980	MT	N-mt4917-F	GCAAGCAACCGCATCC	497
		N-mt4917-R	GGGTCGTGGTGCTGGA	

dbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

pb: pares de bases; MT: mitocondrial.

### 3.3.5.2- Reação de amplificação e purificação dos produtos de PCR

Foram selecionados para o sequenciamento três indivíduos com alelos/genótipos diferentes para cada SNP. Para obtenção dos fragmentos de DNA, que foram utilizados como moldes nas reações de sequenciamento, procedeu-se à seguinte reação de amplificação por PCR: 10 ng de DNA; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão *PCR buffer* 1X (Invitrogen™); 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,25 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 unidade de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), totalizando um volume final de 20 μL. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação), 56°C ou 59°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 20 segundos (extensão). Uma última etapa de extensão foi realizada a 72°C por 5 minutos. Para os pares de oligonucleotídeos que amplificavam a região contendo os polimorfismos rs9621532 e rs28357980 a temperatura de anelamento foi de 59°C e para os demais foi igual a 56°C. Em todas as reações de PCR foi feito um controle branco de amplificação (NTC), onde água estéril foi acrescentada no lugar de DNA. Os produtos de PCR, junto com o marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen™), foram aplicados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo para confirmar o tamanho dos fragmentos amplificados.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando PEG 8000 (polietilenoglicol). No protocolo, 15 μL de solução de PEG 20% foram adicionados a um microtubo contendo 15 μL de produto de PCR. Após rápida agitação em vórtex, o microtubo foi incubado a 37°C por 15 minutos (banho-maria) e, em seguida, centrifugado a 4°C por 17 minutos a 11.000 rpm. O sobrenadante foi então retirado e o *pellet* lavado com 125 μL de etanol 70% e centrifugado por mais 17 minutos (11.000 rpm, a 4°C). Uma nova lavagem foi realizada com 125 μL de etanol 70% e centrifugação a 4°C por 17 minutos a 11.000 rpm. Após esta etapa, o microtubo foi mantido à temperatura ambiente por, no mínimo, 30 minutos para completa evaporação do álcool. Finalmente, o *pellet* foi ressuscitado em 15 μL de água Mili-Q estéril e autoclavada e foi colocado em banho-maria (37°C) por 15 minutos. Ao final dessa etapa, as amostras foram quantificadas usando ND-1000 (NanoDrop).

Para preparação da solução de PEG 20%, 5 g de PEG 8000 e 3,65 g de NaCl foram dissolvidos (banho-maria) em 25 mL de água Mili-Q estéril e autoclavada. Alíquotas de 400 μL foram estocadas a 4°C.

### 3.3.5.3- Reação de sequenciamento e precipitação

Para a realização da reação de sequenciamento, aproximadamente 40-50 ng dos produtos de PCR foram misturados com 10  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador e 4  $\mu$ L de reagente ETKIT (*DYEnamic™ ET dye terminator Kit*, Amersham Pharmacia Biotech), totalizando um volume final de 10  $\mu$ L. As condições de reação foram: 30 ciclos de 95°C por 20 segundos (desnaturação), 56°C ou 59°C por 15 segundos (anelamento) e 60°C por 1 minuto e 20 segundos (extensão).

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados com 1  $\mu$ L de acetato de amônio (7,5 M) e 30  $\mu$ L de etanol absoluto. Após incubação a 4°C por 20 minutos, o material foi centrifugado por 45 minutos a 4.000 rpm (4°C). O sobrenadante foi descartado (invertendo-se a placa) e o produto lavado com 100  $\mu$ L de etanol 70% (gelado), seguido de centrifugação a 4°C por 10 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o produto mantido por 15 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz para a total evaporação do álcool. O *pellet* de DNA foi ressuscitado (vórtex) em 10  $\mu$ L de *loading solution* por 2 minutos e a placa armazenada em *freezer* a -20°C. O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare). As análises das sequências obtidas foram feitas através do *software Sequencher®*, versão 4.1.4 (Genes Code Corporation). Cada amostra teve sua sequência *forward* e *reverse* analisadas separadamente. As sequências de DNA obtidas foram comparadas com as sequências correspondentes depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

### 3.3.4- Determinação da ancestralidade

A ancestralidade de cada indivíduo, em relação às suas raízes Africana, Ameríndia e Européia, foi determinada através de reações *multiplex* utilizando 40 marcadores indels (polimorfismos de inserção-deleção) bialélicos informativos de ancestralidade, de acordo com a metodologia descrita por Bastos-Rodrigues et al. (2006) e Pena et al. (2009).

A partir de um grupo de 2000 marcadores caracterizados por Weber et al. (2002), Bastos-Rodrigues et al. (2006) selecionaram 40 polimorfismos de inserção-deleção bialélicos e demonstraram que eles foram suficientes para a caracterização da estrutura da população humana em nível mundial. Pena et al. (2009)

mostraram que esse mesmo grupo de marcadores apresenta alta sensibilidade na discriminação entre Africanos, Ameríndios e Europeus, as três raízes ancestrais brasileira.

As análises dos tamanhos dos alelos foram feitas usando *GeneMapper*® *Software*, versão 4.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). O *software Structure*, versão 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para inferir os valores das ancestralidades de cada indivíduo.

### **3.3.5- Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas usando os programas: *PLINK*, versão 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>), *Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA) e *MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Inicialmente, os grupos caso e controle foram comparados através de análises feitas com o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Nessa etapa, os dados correspondentes à ancestralidade, cor de pele, idade, IMC, hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e sexo foram comparados entre os dois grupos. Nas análises do tipo qualitativa x quantitativa foi feito primeiramente o teste de D'Agostinho-Pearson para verificar se os dados apresentavam distribuição normal. Esse teste foi realizado com os dados originais e com os dados após transformação logarítmica. Quando os dados apresentaram distribuição normal, foi feito o teste t para amostras independentes. Quando a normalidade foi rejeitada, foi feito o teste de Mann-Whitney. Nas análises do tipo qualitativa x qualitativa foi feito o teste  $\chi^2$ .

Análises também foram feitas considerando somente os dados de ancestralidade (Africana, Ameríndia e Européia) e de cor de pele (Branco, Pardo e Preto). Nesse caso, as três classes de cor de pele foram comparadas entre si considerando cada ancestralidade separadamente. Primeiro, foi realizado o teste de D'Agostinho-Pearson para distribuição normal. Como os dados não apresentaram distribuição normal foi feito o teste de Kruskal-Wallis para verificar se existia ou não diferença significativa entre as classes de cor de pele considerando cada uma das ancestralidades.

Gráficos de comparação múltipla foram produzidos usando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).



Posteriormente, foram realizadas análises considerando os dados resultantes das genotipagens. Testes para verificar a existência de desequilíbrio de ligação (LD – *Linkage Disequilibrium*) entre os SNPs foram feitos utilizando o programa *PLINK*, versão 1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). Para isso foram calculados os valores de  $D'$  (coeficiente de desequilíbrio de ligação normalizado) e  $R^2$  (coeficiente de determinação). Testes para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizados para cada SNP, considerando casos e controles separadamente. O teste exato para avaliar a aderência ao EHW foi descrito e implementado por Wigginton et al. (2005). Para os SNPs em desequilíbrio de ligação foi feito o cálculo das frequências haplotípicas (algoritmo EM) e a determinação dos alelos em fase (*PLINK*, versão 1.07). O Teste  $\chi^2$  foi feito para avaliar a associação fenótipo-haplótipo utilizando o *software Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA). Para os demais SNPs foram calculadas as frequências alélicas (Frequência do Alelo Menor – MAF – *Minor Allele Frequency*) e foi feito o teste exato de Fisher para verificar a associação fenótipo-alelo (*PLINK*, versão 1.07).

Finalmente, análises de regressão numérica (regressão logística) com covariáveis foram realizadas para estudar a associação de cada polimorfismo com a DMRI, utilizando o *software Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA). O fenótipo (caso/controle) foi fixado como variável dependente e os dados de genótipo/alelo/haplótipo foram fixados como variáveis independentes. Da mesma forma, os dados correspondentes à ancestralidade, cor de pele, idade, IMC, hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e sexo, que são considerados fatores de risco para a DMRI, também foram incluídos como variáveis independentes nas análises de regressão. Essas análises consistiram na execução de dois modelos de regressão: o modelo completo e o modelo completo x reduzido. O modelo completo permite avaliar individualmente a relação entre a variável dependente e cada variável independente. Os fatores de risco que mostraram associação significativa com o fenótipo no modelo completo foram considerados como covariáveis no modelo completo x reduzido. O resultado do modelo completo x reduzido permite avaliar individualmente cada SNP após a correção para as covariáveis. Dessa forma, os resultados obtidos com esse modelo indicam quais locos permanecem associados ao fenótipo mesmo após a correção para os fatores de risco que mostraram associação significativa com a DMRI. Para todos os SNPs em equilíbrio de ligação, as análises de regressão foram feitas considerando os três modelos genéticos: aditivo, dominante e recessivo. Nesse caso, os

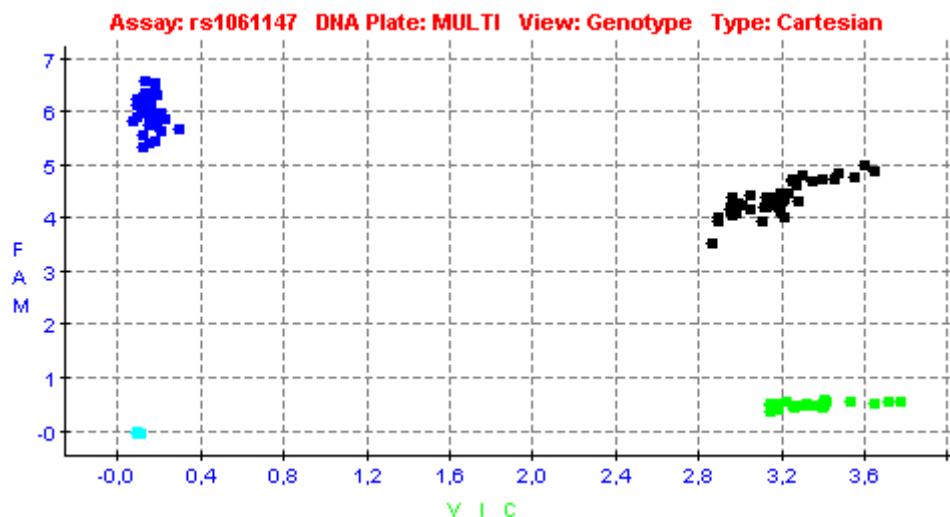
genótipos foram codificados numericamente de forma automática pelo *software Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA).

Em todas as análises, o nível de significância foi definido como 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ). Nos testes de comparação múltipla foram considerados os valores de  $\alpha$  e de *p-value* após a correção de Bonferroni.

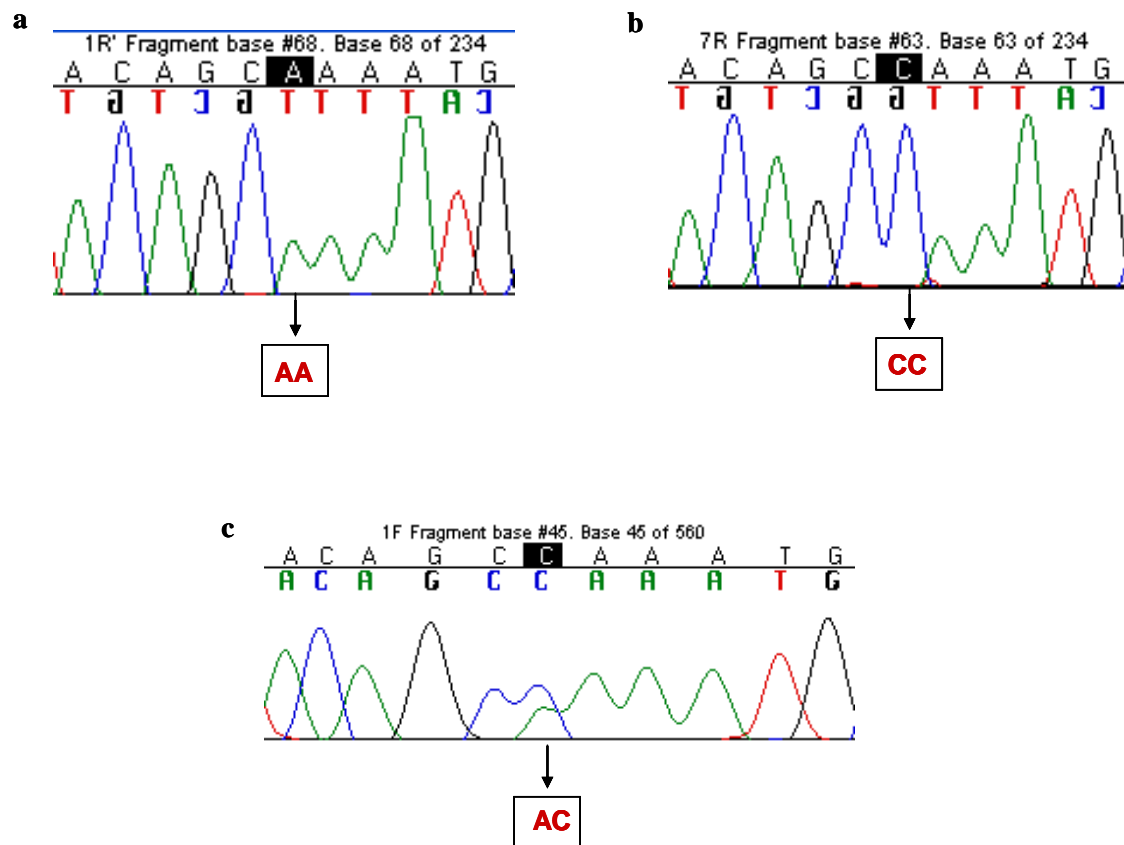
### 3.4- Resultados

Todos os SNPs foram genotipados usando a metodologia *TaqMan*<sup>®</sup>, exceto o SNP mitocondrial (rs28357980) que foi genotipado usando a metodologia de RFLP. A Figura 1 mostra um gráfico representativo dos resultados obtidos através do *TaqMan*<sup>®</sup> *Genotyper Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA) correspondente à genotipagem de alguns indivíduos para o SNP rs1061147 usando sondas *TaqMan*<sup>®</sup>. Resultados semelhantes foram obtidos para os demais marcadores. A eficiência da metodologia *TaqMan*<sup>®</sup> foi confirmada por sequenciamento de fragmentos de PCR contendo os polimorfismos em estudo. A Figura 2 mostra o cromatograma de três indivíduos analisados para o SNP rs1061147 (genótipos AA, AC e CC). O sequenciamento também corroborou os resultados de genotipagem produzidos com a metodologia *TaqMan*<sup>®</sup> para os demais SNPs (dados não mostrados). A metodologia de RFLP para genotipagem do SNP rs28357980 mostrou-se muito eficiente, permitindo a discriminação entre indivíduos portadores do alelo A e indivíduos portadores do alelo G (Figura 3). Resultados obtidos por sequenciamento também validaram o uso da técnica de RFLP na genotipagem do SNP mitocondrial (Figura 4).

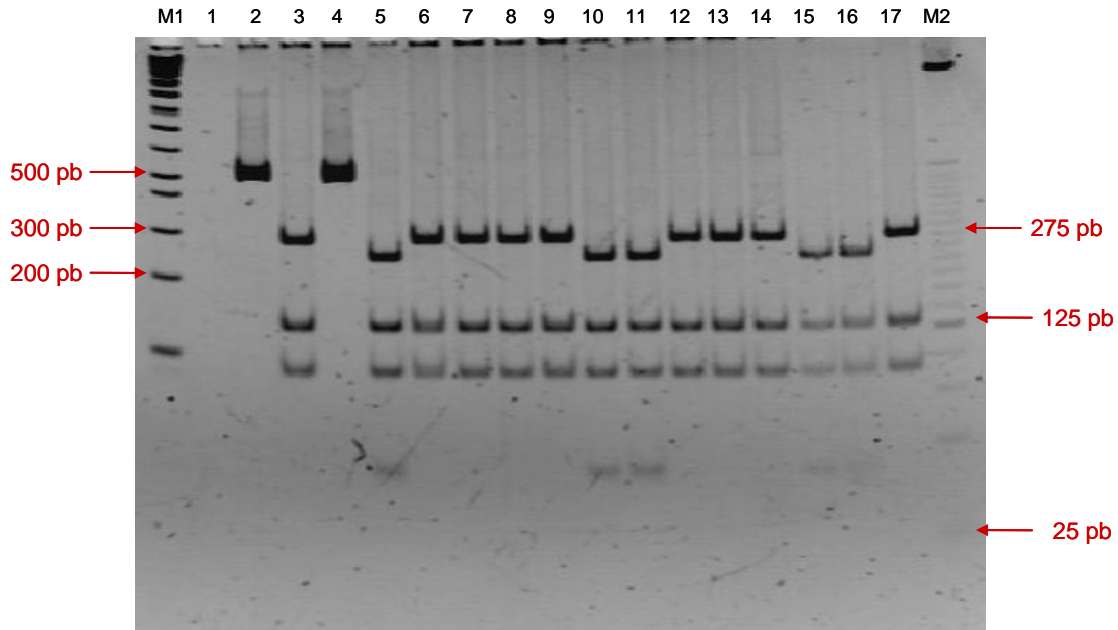
Estudos mundiais relativos à DMRI classificam os indivíduos participantes de acordo com sua cor de pele (Branco e Pretos) e fazem uso dessa informação, e não de dados genômicos de ancestralidade, nas análises de associação com a doença. Eles utilizam a cor de pele para denotar a raça/etnicidade dos indivíduos, como sendo um *proxy* fenotípico para a ancestralidade geográfica. No Brasil, a correlação entre cor de pele e ancestralidade a nível individual é tênue, de tal forma que não é possível prever com segurança a cor de pele de uma pessoa a partir do seu nível de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia, nem o oposto (Pena et al., 2009; Pena et al., 2011). Por isso decidimos determinar a ancestralidade de cada indivíduo nesse estudo e usar esses dados nas análises estatísticas. Mas, ao mesmo tempo, para que os nossos resultados pudessem ser diretamente comparados àqueles da literatura, decidimos manter a cor de pele nas análises como foi feito nos estudos anteriores. É importante ressaltar que, em um trabalho publicado recentemente, Almeida et al. (2013) analisaram a associação de dois SNPs com a DMRI em um grupo caso-controle Brasileiro e determinaram a ancestralidade de cada indivíduo utilizando o painel de 40 marcadores indels bialélicos descritos por Bastos-Rodrigues et al. (2006) e Pena et al. (2009).



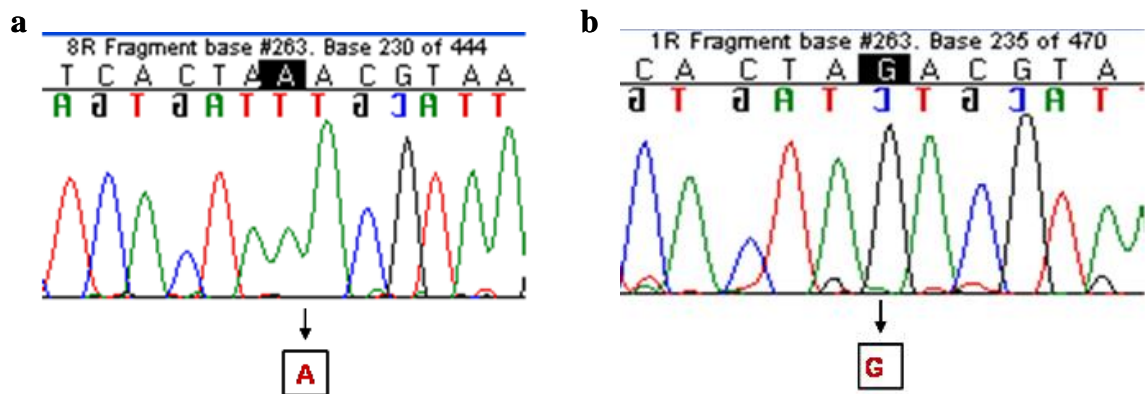
**Figura 1.** Gráfico obtido a partir da genotipagem do SNP rs1061147 em 108 indivíduos utilizando sondas *TaqMan*®. Em verde estão agrupados os indivíduos homocigotos para o alelo A (VIC/VIC), em preto os heterocigotos AC (VIC/FAM) e em azul estão os homocigotos para o alelo C (FAM/FAM). Esse gráfico foi obtido utilizando o *TaqMan*® Genotyper Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).



**Figura 2. Cromatogramas obtidos a partir do sequenciamento de fragmentos de PCR contendo o SNP rs1061147.** (a) Cromatograma do indivíduo A1.9, homocigoto para o alelo A; (b) Cromatograma do indivíduo A1.19, homocigoto para o alelo C; (c) Cromatograma do indivíduo A1.11, heterocigoto (AC). Esses cromatogramas foram obtidos utilizando o *software* *Sequencher*®, versão 4.1.4 (Genes Code Corporation).



**Figura 3. Genotipagem do SNP rs28357980 utilizando a metodologia de RFLP.** Gel de poliacrilamida (5%) corado com brometo de etídeo mostrando o resultado da digestão dos fragmentos de PCR obtidos a partir da amplificação com os iniciadores N-mt4917-F e N-mt4917-R. A endonuclease de restrição utilizada foi FspBI (BfaI). A ordem da numeração é: (M1) Marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>); (1) Controle branco de amplificação; (2) DNA do indivíduo A1.1 amplificado com os iniciadores N-mt4917-F e N-mt4917-R; (3) DNA do indivíduo A1.1 amplificado e digerido com a enzima FspBI, usado como controle positivo para presença do alelo A; (4) DNA do indivíduo A1.5 amplificado com os iniciadores N-mt4917-F e N-mt4917-R; (5) DNA do indivíduo A1.5 amplificado e digerido com a enzima FspBI, usado como controle positivo para presença do alelo G; (6 a 17) DNA de doze indivíduos amplificado e digerido com a enzima FspBI; (M2) Marcador de 25 pb. Indivíduos que possuem o alelo G apresentam o seguinte padrão de fragmentação: 237, 131, 90 e 39 pb (ex: indivíduos 10, 11, 15 e 16 no gel acima). Para os indivíduos com o alelo A o padrão de fragmentação é: 276, 131 e 90 pb (ex: indivíduos 6 a 9, 12 a 14 e 17 no gel acima).



**Figura 4. Cromatogramas obtidos a partir do sequenciamento de fragmentos de PCR contendo o SNP rs28357980.** (a) Cromatograma do indivíduo A1.1 e (b) cromatograma do indivíduo A1.5, ambos da Figura 3, confirmando a presença dos alelos A e G, respectivamente. Esses cromatogramas foram obtidos utilizando o *software Sequencher*®, versão 4.1.4 (Genes Code Corporation).

Informações detalhadas dos dados correspondentes à ancestralidade, cor de pele, idade, IMC, sexo, *status* de hipercolesterolemia, hipertensão e tabagismo dos 192 indivíduos participantes do estudo são mostradas na Tabela 5.

Análises estatísticas iniciais, comparando os grupos caso e controle, foram realizadas utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Os resultados mostraram que dentre os fatores de risco para a DMRI considerados nesse estudo, somente ancestralidade, cor de pele e idade foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos (Tabela 6). Considerando a variável ancestralidade, o teste de Mann-Whitney provou que as três ancestralidades (Africana, Ameríndia e Européia) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre casos e controles (Tabela 6). Análises estatísticas mais detalhadas como, por exemplo, para cada classe de cor de pele, foram feitas utilizando o modelo completo de regressão do *software Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA). Esses resultados serão apresentados mais adiante. A Figura 5 mostra a proporção de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia em cada grupo estudado.

Resultados do teste de Kruskal-Wallis mostraram que existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as classes de cor de pele considerando cada uma das ancestralidades (Tabela A1 em anexo). Indivíduos auto-declarados Brancos diferiram de Pardos e Pretos em relação às três raízes ancestrais. Pardos diferiram de Brancos e Pretos em relação à ancestralidade Africana; contudo, essa diferença só foi significativa para as ancestralidades Ameríndia e Européia quando comparada aos Brancos. Indivíduos Pretos diferiram de Brancos e Pardos em relação à ancestralidade Africana; no entanto, essa diferença só foi significativa nas análises das outras duas ancestralidades quando comparada aos Brancos (Tabela A1 em anexo). A Figura A2 em anexo mostra a proporção de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia em cada classe de cor de pele.



**Tabela 5. Dados correspondentes à ancestralidade, cor de pele, idade, IMC, sexo, status de hipercolesterolemia, hipertensão e tabagismo dos 192 indivíduos**

<b>Variável</b>	<b>Casos (n = 122)</b>	<b>Controles (n = 70)</b>
<b>Ancestralidade, média ± SD</b>		
Africana	0,0511 ± 0,0678	0,1688 ± 0,2114
Ameríndia	0,0579 ± 0,0988	0,1540 ± 0,2000
Européia	0,8908 ± 0,1331	0,6773 ± 0,2864
<b>Cor de pele, número (%)</b>		
Número de indivíduos	95	69
Branco	80 (84,21)	35 (50,72)
Pardo	15 (15,79)	27 (39,13)
Preto	0 (0,00)	7 (10,14)
<b>Idade (anos), número (%)</b>		
Número de indivíduos	122	69
49 - 58	6 (4,92)	8 (11,59)
59 - 68	17 (13,93)	19 (27,54)
69 - 78	39 (31,97)	29 (42,03)
79 - 88	51 (41,80)	11 (15,94)
89 - 98	9 (7,38)	2 (2,90)
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>), número (%)</b>		
Número de indivíduos	86	69
Abaixo do peso (< 18,50)	2 (2,33)	2 (2,90)
Normal (18,50 - 24,99)	37 (43,02)	24 (34,78)
Sobrepeso (25,00 - 29,99)	28 (32,56)	29 (42,03)
Obeso (≥ 30,00)	19 (22,09)	14 (20,29)
<b>Sexo, número (%)</b>		
Número de indivíduos	122	69
Masculino	60 (49,18)	24 (34,78)
Feminino	62 (50,82)	45 (65,22)
<b>Status de Hipercolesterolemia, número (%)</b>		
Número de indivíduos	84	68
Hipercolesterolêmico	2 (2,31)	1 (1,47)
Não hipercolesterolêmico	82 (97,62)	67 (98,53)
<b>Status de Hipertensão, número (%)</b>		
Número de indivíduos	84	69
Hipertenso	37 (44,05)	39 (56,52)
Não hipertenso	47 (55,95)	30 (43,48)
<b>Status de Tabagismo, número (%)</b>		
Número de indivíduos	84	69
Fumante	36 (42,86)	39 (56,52)
Não fumante	48 (57,14)	30 (43,48)

IMC: índice de massa corporal; SD: desvio padrão; n: tamanho da amostra.

**Tabela 6. Características demográficas gerais da população em estudo e testes para inferência dos grupos Caso e Controle**

Variável	Casos (n = 122)	Controles (n = 70)	<i>p-value</i>
Ancestralidade, média ± SD			
Africana	0,0511 ± 0,0678	0,1688 ± 0,2114	< 0,0001 *
Ameríndia	0,0579 ± 0,0988	0,1540 ± 0,2000	0,0001 *
Européia	0,8908 ± 0,1331	0,6773 ± 0,2864	< 0,0001 *
Cor de pele (Branco, Pardo e Preto), número (%)	95 (77,87)	69 (98,57)	< 0,0001 *
Idade (anos), média ± SD	77,17 ± 9,07	71,13 ± 8,97	< 0,0001 *
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), média ± SD	26,61 ± 4,70	26,41 ± 4,85	0,7691
Hipercolesterolemia (sim e não), número (%)	84 (68,85)	68 (97,14)	0,8531
Hipertensão (sim e não), número (%)	84 (68,85)	69 (98,57)	0,1697
Sexo (masculino e feminino), número (%)	122 (100,00)	69 (98,57)	0,0761
Tabagismo (sim e não), número (%)	84 (68,85)	69 (98,57)	0,1285

IMC: índice de massa corporal; SD: desvio padrão; n: tamanho da amostra.

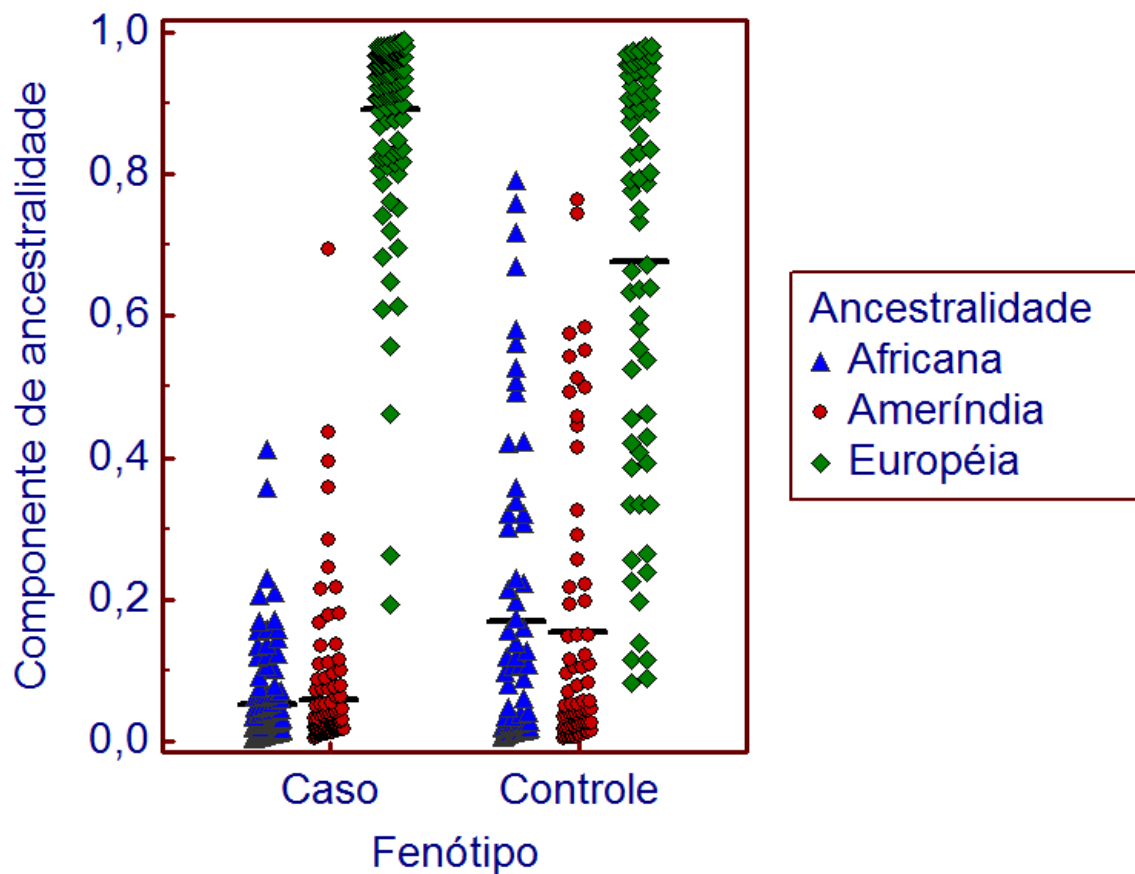
\**P-value* estatisticamente significativo ( $\alpha = 0,05$ ).

Para a ancestralidade (Africana, Ameríndia e Européia) foi feito o teste de Mann-Whitney, pois os dados não apresentaram distribuição normal.

Para as variáveis cor de pele, hipercolesterolemia, hipertensão, sexo e tabagismo foi feito o teste  $\chi^2$ .

Para a variável idade foi feito o teste de Mann-Whitney, pois os dados não apresentaram distribuição normal.

Para a variável IMC foi feito o teste t para amostras independentes (usando os valores após ser realizada uma transformação logarítmica na base 10). No teste t assumiram-se variâncias iguais porque o teste F apresentou *p-value* = 0,809.



**Figura 5.** Gráfico de comparação múltipla mostrando a proporção de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia no grupo com DMRI (caso) e no grupo sem DMRI (controle). A barra preta horizontal representa a média. Esse gráfico foi obtido utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Posteriormente, foram realizadas análises estatísticas considerando os dados obtidos a partir da genotipagem dos nove SNPs nos 192 indivíduos participantes do estudo. O cálculo das frequências alélicas (MAF) e testes para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizados para cada SNP, considerando casos e controles separadamente (*PLINK*, versão 1.07). O SNP mitocondrial (rs28357980) foi excluído do teste de EHW por apresentar natureza haplóide (Tabela 7). Somente rs12913832 apresentou desvios a partir do EHW considerando o grupo de indivíduos com DMRI (casos). Entretanto, por estar em EHW no grupo dos controles, ele foi mantido nas análises posteriores (Tabela 7).

Testes para verificar a ocorrência de desequilíbrio de ligação (LD) foram feitos para os pares de SNPs: rs1061147 e rs1329428 (gene *CFH*, cromossomo 1); rs547154 e rs9332739 (gene *C2*, cromossomo 6). Entre as medidas que foram propostas para análise de dados de haplótipo envolvendo dois locos (Devlin e Risch, 1995) as duas mais importantes são  $D'$  e  $R^2$ .  $D'$  assume valores entre 0 (nenhum LD) e 1 (completo LD).  $D'$  é igual a 1 na ausência de recombinação obrigatória, somente diminuindo devido à recombinação ou mutação recorrente (Daly et al., 2001). Entretanto,  $D'$  apresenta algumas desvantagens. Primeiro, ele pode assumir um alto valor (indicando alto LD) até mesmo quando um alelo é raro, o que é geralmente de pouco interesse prático (Balding, 2006). Segundo, seu resultado é fortemente afetado por amostras de tamanho pequeno, resultando em um comportamento errático quando se comparam locos com baixas frequências alélicas. Isto ocorre devido à diminuição na probabilidade de se encontrarem todas as quatro combinações alélicas de polimorfismos de baixa frequência, mesmo que os locos não sejam ligados. De acordo com Flint-Garcia et al. (2003), a estatística  $R^2$  é a mais utilizada nos estudos de associação. O valor de  $R^2$  encontra-se entre 0 e 1 e seu máximo valor possível depende das MAFs dos dois SNPs. Na estatística  $R^2$ , somente se encontra um valor igual a 1, ou seja, desequilíbrio de ligação completo, quando os dois locos em questão apresentam frequências alélicas idênticas (Flint-Garcia et al., 2003). Um valor de  $R^2$  igual a zero indica que os dois alelos estão em perfeito equilíbrio de ligação. Dessa forma,  $R^2$  será igual a 1 quando os dois SNPs surgirem no mesmo “ramo genealógico” e permanecerem não interrompidos por recombinação; mas  $R^2$  terá um valor menor que 1 quando os SNPs surgirem em diferentes “ramos”, ou se uma correlação inicialmente forte for interrompida por *crossing-over*. A medida  $R^2$  tem sido usada com mais frequência porque suas propriedades teóricas estão sendo mais estudadas e, principalmente, porque ela mede

quão bem um SNP pode atuar como um substituto (*proxy*) para o outro (The International HapMap Consortium, 2005).

No nosso estudo, os SNPs rs1061147 e rs1329428 foram considerados estarem em moderado LD ( $D' = 1,000$  e  $R^2 = 0,436$ ) e, dessa forma, foram tratados como haplótipo nas análises posteriores. Os alelos em fase foram AC/CT (*PLINK*, versão 1.07). Para o par de SNPs rs547154 e rs9332739 foi considerado somente o valor de  $R^2$  como medida final para determinar a ocorrência ou não de LD. Isso porque o SNP rs9332739 apresentou alelos de baixa frequência, com MAF igual a 0,0171 (casos) e 0,0429 (controles) (Tabela 7). Nesse caso, rs547154 e rs9332739 foram considerados não estarem em LD ( $D' = 0,768$  e  $R^2 = 0,001$ ), sendo estudados separadamente nas análises seguintes.

Para os sete SNPs que estão em equilíbrio de ligação (rs2230199, rs3750847, rs547154, rs9332739, rs9621532, rs28357980 e rs12913832) foi feito o Teste Exato de Fisher como teste de associação alélica (*PLINK*, versão 1.07). Somente rs3750847 mostrou associação significativa com a DMRI (Tabela 7).

**Tabela 7. SNP, cromossomo, loco, MAF, Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Teste Exato de Fisher**

SNP (dbSNP)	Cromossomo	Loco	A1	A2	MAF		EHW ( <i>p-value</i> )		Associação Alélica
					Casos	Controles	Casos	Controles	Teste Exato de Fisher ( <i>p-value</i> )
rs1061147	1	<i>CFH</i>	A	C	0,5975	0,2786	0,0122	1,0000	— <sup>a</sup>
rs1329428	1	<i>CFH</i>	T	C	0,2098	0,5000	0,0873	0,0906	— <sup>a</sup>
rs547154	6	<i>C2</i>	T	G	0,0609	0,1014	0,3433	1,0000	1,0000
rs9332739	6	<i>C2</i>	C	G	0,0171	0,0429	1,0000	1,0000	1,0000
rs3750847	10	<i>ARMS2</i>	T	C	0,4783	0,2357	0,2646	0,1826	2,3205 x 10 <sup>-5*</sup>
rs12913832	15	<i>HERC2</i>	G	A	0,3165	0,2206	0,0020	0,4943	0,3677
rs2230199	19	<i>C3</i>	C	G	0,2101	0,0870	0,5916	0,4069	0,0157
rs9621532	22	<i>SYN3</i>	C	A	0,0299	0,0652	1,0000	1,0000	0,8253
rs28357980	MT	<i>MT-ND2</i>	G	A	0,0451	0,0154	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	1,0000

A1 = Alelo de menor frequência; A2 = Alelo de maior frequência (considerando os grupos caso e controle juntos).

MAF = Frequência do Alelo Menor (*Minor Allele Frequency*); MT: mitocondrial.

\**P-value* estatisticamente significativo após a correção de Bonferroni.

EHW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\alpha$  para o Teste do EHW após a correção de Bonferroni =  $0,05/8 = 6,25 \times 10^{-3}$ ).

*P-values* para o Teste Exato de Fisher foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $0,05/7 = 7,14 \times 10^{-3}$ ).

—<sup>a</sup> significa ‘retirado da análise’.

O SNP mitocondrial (rs28357980) foi excluído do Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg devido a sua natureza haplóide. Para o par de SNPs rs1061147 e rs1329428 foi feito o teste de associação haplotípica (Teste  $\chi^2$ ).

Como foi dito anteriormente, características como ancestralidade, cor de pele, idade, IMC, hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e sexo foram consideradas como fatores de risco nesse estudo. Para que seja possível identificar os SNPs associados à DMRI, é fundamental também determinar quais desses fatores de risco apresentam associação significativa com o fenótipo e corrigir para os “efeitos de confusão” que eles possam trazer para as análises, “mascarando” as reais associações dos SNPs com a doença. Por isso, análises de regressão numérica (regressão logística) com covariáveis foram feitas utilizando o *software Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA). Essas análises consistiram na execução de dois modelos de regressão (modelo completo e modelo completo x reduzido), que foram previamente explicados no item 3.3.5 (Análises estatísticas) do tópico 3.3 (Material e Métodos).

Inicialmente, foram feitas análises de regressão com covariáveis para os sete SNPs em equilíbrio de ligação, considerando os três modelos genéticos (aditivo, dominante e recessivo).

Entre os fatores de risco, somente ancestralidade (Africana, Ameríndia e Européia), cor de pele (Branco) e idade mostraram associação significativa com a DMRI (ver modelo completo na Tabela 8). Esses resultados corroboraram os resultados obtidos anteriormente com o Teste de Mann-Whitney para idade e ancestralidade, e com o Teste  $\chi^2$  para cor de pele (Tabela 6). Dessa forma, nas análises do modelo completo x reduzido, foram considerados como covariáveis: Africana, Ameríndia, Européia (ancestralidade); Branco (cor de pele) e idade. Os fatores de risco que não apresentaram associação significativa com o fenótipo no modelo completo foram retirados das análises no modelo completo x reduzido.

**Tabela 8. Análises de regressão numérica (regressão logística) com covariáveis para todos os SNPs, exceto rs1061147 e rs1329428**

<b>Preditor</b>	<i>p-value</i> (Modelo Aditivo)		<i>p-value</i> (Modelo Dominante)		<i>p-value</i> (Modelo Recessivo)	
	<b>Modelo completo</b>	<b>Modelo completo x reduzido</b>	<b>Modelo completo</b>	<b>Modelo completo x reduzido</b>	<b>Modelo completo</b>	<b>Modelo completo x reduzido</b>
rs547154	1,0000	0,1893	1,0000	0,1030	1,0000	1,0000
rs9332739	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	NA	NA
rs3750847	$4,0984 \times 10^{-5}$ *	$4,5633 \times 10^{-5}$ *	$8,5445 \times 10^{-6}$ *	$3,6971 \times 10^{-5}$ *	0,5028	0,0991
rs12913832	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0401	0,0375
rs2230199	0,0204	$4,2473 \times 10^{-3}$ *	0,0135	$1,7291 \times 10^{-3}$ *	1,0000	1,0000
rs9621532	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	NA	NA
rs28357980	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Africana	$1,6757 \times 10^{-6}$ *	CV	$1,6757 \times 10^{-6}$ *	CV	$1,4895 \times 10^{-6}$ *	CV
Ameríndia	$5,5307 \times 10^{-4}$ *	CV	$5,5307 \times 10^{-4}$ *	CV	$4,9162 \times 10^{-4}$ *	CV
Européia	$6,4230 \times 10^{-9}$ *	CV	$6,4230 \times 10^{-9}$ *	CV	$5,7093 \times 10^{-9}$ *	CV
Branco	$6,3267 \times 10^{-5}$ *	CV	$6,3267 \times 10^{-5}$ *	CV	$5,6237 \times 10^{-5}$ *	CV
Pardo	0,0134	— <sup>a</sup>	0,0134	— <sup>a</sup>	0,0119	— <sup>a</sup>
Preto	NA	— <sup>a</sup>	NA	— <sup>a</sup>	NA	— <sup>a</sup>
Idade	$7,6593 \times 10^{-4}$ *	CV	$7,6593 \times 10^{-4}$ *	CV	$6,8083 \times 10^{-4}$ *	CV
IMC	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>
Hipercolesterolemia	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>
Hipertensão	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>
Sexo	0,9504	— <sup>a</sup>	0,9504	— <sup>a</sup>	0,8448	— <sup>a</sup>
Tabagismo	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>	1,0000	— <sup>a</sup>

(continuação na próxima página)



\**P-value* estatisticamente significativo após a correção de Bonferroni.

Modelos Aditivo e Dominante: *p-values* para o modelo completo foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $0,05/18 = 2,78 \times 10^{-3}$ ). *P-values* para o modelo completo x reduzido foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $0,05/7 = 7,14 \times 10^{-3}$ ).

Modelo Recessivo: *p-values* para o modelo completo foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $0,05/16 = 3,12 \times 10^{-3}$ ). *P-values* para o modelo completo x reduzido foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $0,05/5 = 0,01$ ).

—<sup>a</sup> significa ‘retirado da análise’.

CV: covariável.

NA: ‘not available’ (dado não disponível). Isso ocorre quando o algoritmo da regressão logística tenta acomodar valores independentes para os quais a variável dependente é exclusivamente 0 (controle) ou 1 (caso). Nessa situação, o algoritmo se torna instável e a regressão falha [informação enviada por e-mail pelo suporte técnico e de bioinformática do *software Golden Helix* (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA)].

Resultados do modelo completo x reduzido mostraram que dois SNPs foram significativamente associados à DMRI após a correção para as covariáveis, considerando os modelos aditivo e dominante: rs2230199 e rs3750847 (Tabela 8). Ao contrário do que foi observado para o SNP rs3750847, que mostrou associação significativa com o fenótipo antes (modelo completo) e após a correção para as covariáveis (modelo completo x reduzido), o SNP rs2230199 só apresentou associação significativa com a DMRI após a correção para as covariáveis (modelo completo x reduzido) (Tabela 8). Isso prova o quão importante é a inclusão de fatores de risco nas análises de regressão em estudos de associação de polimorfismos genéticos com a DMRI. Esses resultados corroboraram os resultados obtidos com o Teste Exato de Fisher, que mostrou associação significativa apenas para o marcador rs3750847 (Tabela 7).

Para o par de SNPs em desequilíbrio de ligação (rs1061147 e rs1329428) foram calculadas as frequências haplotípicas, utilizando o algoritmo EM, e também foi feito o Teste  $\chi^2$  como teste de associação haplotípica (*PLINK*, versão 1.07). Os haplótipos AC e CT mostraram associação significativa com o fenótipo (Tabela 9).

Como era esperado, no modelo completo das análises de regressão, a ancestralidade (Africana, Ameríndia e Européia), cor de pele (Branco) e idade mostraram-se significativamente associadas à DMRI (Tabela 10). Os haplótipos AC e CT mostraram associação significativa com o fenótipo antes (modelo completo) e após a correção para as covariáveis (modelo completo x reduzido), corroborando os resultados obtidos com o Teste  $\chi^2$  (Tabela 9).

**Tabela 9. Análises de haplótipo para rs1061147 e rs1329428 (gene *CFH*)**

<b>Haplótipo</b>	<b>Frequência Haplótipica</b>		<b>Associação Haplótipica</b>
	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>Teste <math>\chi^2</math> (<i>p</i>-value)</b>
AC	0,6027	0,2826	$9,6680 \times 10^{-9}$ *
AT	0,0000	0,0000	NA
CC	0,1875	0,2174	1,0000
CT	0,2098	0,5000	$2,7368 \times 10^{-8}$ *

\**P*-value estatisticamente significativo após a correção de Bonferroni.

*P*-values para o Teste  $\chi^2$  foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $0,05/3 = 1,67 \times 10^{-2}$ ).

NA: 'not available' (dato não disponível). Para explicação ver rodapé da Tabela 8.

O algoritmo EM foi usado para estimar as frequências haplotípicas.

**Tabela 10. Análises de regressão numérica (regressão logística) com covariáveis para os haplótipos formados pelos SNPs rs1061147 e rs1329428**

Preditor	<i>p-value</i>	
	Modelo completo	Modelo completo x reduzido
AC	7,0920 x 10 <sup>-7</sup> *	2,6278 x 10 <sup>-4</sup> *
AT	NA	NA
CC	1,0000	1,0000
CT	3,7825 x 10 <sup>-6</sup> *	1,5271 x 10 <sup>-3</sup> *
Africana	1,7693 x 10 <sup>-6</sup> *	CV
Ameríndia	3,8885 x 10 <sup>-4</sup> *	CV
Européia	5,4578 x 10 <sup>-9</sup> *	CV
Branco	5,1468 x 10 <sup>-5</sup> *	CV
Pardo	0,0110	— <sup>a</sup>
Preto	NA	— <sup>a</sup>
Idade	3,7436 x 10 <sup>-4</sup> *	CV
IMC	1,0000	— <sup>a</sup>
Hipercolesterolemia	1,0000	— <sup>a</sup>
Hipertensão	1,0000	— <sup>a</sup>
Sexo	0,7422	— <sup>a</sup>
Tabagismo	1,0000	— <sup>a</sup>

\**P-value* estatisticamente significativo após a correção de Bonferroni.

*P-values* para o modelo completo foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $0,05/14 = 3,57 \times 10^{-3}$ ).

*P-values* para o modelo completo x reduzido foram obtidos após a correção de Bonferroni ( $\alpha$  após a correção de Bonferroni =  $\alpha = 0,05/3 = 1,67 \times 10^{-2}$ ).

—<sup>a</sup> significa 'retirado da análise'.

CV: covariável.

NA: 'not available' (dado não disponível). Para explicação ver rodapé da Tabela 8.

O algoritmo EM foi usado para estimar as frequências haplotípicas.

Para todos os SNPs foram estimadas as *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95% (Tabelas 11 e 12). Para os marcadores que mostraram associação significativa com a DMRI após a correção para as covariáveis (rs1061147, rs1329428, rs2230199 e rs3750847) a estimativa da OR permite avaliar o efeito de cada alelo e haplótipo no risco da DMRI.

Para o marcador rs2230199, a presença do alelo de risco C foi associada a  $> 4,6$  (modelo aditivo; OR = 4,6883; IC 95%; 1,7904-12,2767) e  $> 6,1$  (modelo dominante; OR = 6,1144; IC 95%; 2,1219-17,6194) vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI após a correção para as covariáveis (Tabela 11). Resultados semelhantes foram obtidos para o marcador rs3750847: a presença do alelo de risco T foi associada a  $> 4,1$  (modelo aditivo; OR = 4,1092; IC 95%; 2,0961-8,0558) e  $> 6,4$  (modelo dominante; OR = 6,4562; IC 95%; 2,7669-15,0643) vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI após a correção para as covariáveis (Tabela 11). Para cada SNP, o alelo de risco é definido como o alelo que aparece em maior frequência nos indivíduos afetados (casos) quando comparado aos indivíduos não afetados (controles). Para determinar quais dos dois modelos (aditivo ou dominante) que melhor se ajusta aos nossos dados, ou seja, que melhor explica a associação dos marcadores rs2230199 e rs3750847 com a DMRI, foram feitos os cálculos das OR para os genótipos.

**Tabela 11. Odds Ratio para todos os SNPs, exceto rs1061147 e rs1329428**

Preditor	Odds Ratio (Modelo Aditivo)		Odds Ratio (Modelo Dominante)		Odds Ratio (Modelo Recessivo)	
	Modelo completo	Modelo completo x reduzido	Modelo completo	Modelo completo x reduzido	Modelo completo	Modelo completo x reduzido
rs547154	0,5707	0,3414	0,5007	0,2782	9,7601 x 10 <sup>15</sup>	1,9852 x 10 <sup>15</sup>
rs9332739	0,3776	0,4652	0,3776	0,4652	NA	NA
rs3750847	3,0674 *	4,1092 *	4,9484 *	6,4562 *	2,6667	4,4036
rs12913832	1,5289	1,5650	1,2562	1,1264	6,5275	8,9587
rs2230199	2,8661	4,6883 *	3,3225	6,1144 *	2,3652	1,4610
rs9621532	0,4242	0,4408	0,4242	0,4408	NA	NA
rs28357980	1,7375	0,9146	3,0189	0,8364	3,0189	0,8364
Africana	0,0011 *	CV	0,0011 *	CV	0,0011 *	CV
Ameríndia	0,0102 *	CV	0,0102 *	CV	0,0102 *	CV
Européia	133,3940 *	CV	133,3940 *	CV	133,3940 *	CV
Branco	5,1810 *	CV	5,1810 *	CV	5,1810 *	CV
Pardo	0,2917	— <sup>a</sup>	0,2917	— <sup>a</sup>	0,2917	— <sup>a</sup>
Preto	NA	— <sup>a</sup>	NA	— <sup>a</sup>	NA	— <sup>a</sup>
Idade	1,8866 *	CV	1,8866 *	CV	1,8866 *	CV
IMC	0,9225	— <sup>a</sup>	0,9225	— <sup>a</sup>	0,9225	— <sup>a</sup>
Hipercolesterolemia	1,6341	— <sup>a</sup>	1,6341	— <sup>a</sup>	1,6341	— <sup>a</sup>
Hipertensão	0,6056	— <sup>a</sup>	0,6056	— <sup>a</sup>	0,6056	— <sup>a</sup>
Sexo	0,5511	— <sup>a</sup>	0,5511	— <sup>a</sup>	0,5511	— <sup>a</sup>
Tabagismo	0,5769	— <sup>a</sup>	0,5769	— <sup>a</sup>	0,5769	— <sup>a</sup>

\* OR (intervalo de confiança de 95%) para os preditores que mostraram associação significativa com o fenótipo nas análises de regressão (Tabela 8).

—<sup>a</sup> significa ‘retirado da análise’; CV: covariável.

NA: ‘not available’ (dado não disponível). Para explicação ver rodapé da Tabela 8.

Primeiro, serão descritos os resultados para o SNP rs2230199. No modelo aditivo foram calculadas duas OR e a comparação entre elas é que permite determinar qual o melhor modelo para os nossos dados. A primeira OR foi calculada para CG/GG e a segunda OR foi calculada para CC/CG. O heterozigoto (CG) foi associado a > 3,3 vezes de aumento no risco da DMRI (OR = 3,3370; IC 95%; 1,5435-7,2145) comparado aos homozigotos que não carregam o alelo de risco (GG). Indivíduos homozigotos para o alelo de risco (CC) apresentaram aproximadamente a mesma chance de desenvolvimento da DMRI (OR = 0,9524; IC 95%; 0,0957-9,4737) comparado aos heterozigotos (CG). Em relação ao modelo aditivo, as duas OR podem ser consideradas como uma checagem da validade do próprio modelo em descrever os dados, bem como indicadores da intensidade da associação. Se as duas OR são aproximadamente iguais o modelo aditivo pode ser considerado válido. Se as duas OR são muito diferentes, então pode haver algum outro modelo que descreva melhor os dados. Por exemplo, uma OR alta e significativa para CG/GG e uma OR baixa e não-significativa para CC/CG pode indicar que o modelo dominante descreve os dados com maior precisão. Uma OR é considerada significativa se os limites de confiança de 95% superior e inferior forem maiores do que 1,0 para uma OR superior a 1,0 (ou ambos menores do que 1,0 para uma OR inferior a 1,0) (Golden Helix Inc., Bozeman, MT, USA). Como pode ser visto, além de as duas OR serem muito diferentes, a OR para CG/GG (OR = 3,3370; IC 95%; 1,5435-7,2145) foi alta e significativa, enquanto a OR para CC/CG (OR = 0,9524; IC 95%; 0,0957-9,4737) foi relativamente baixa e não-significativa, pois a OR foi menor do que 1,0 e o limite de confiança superior foi maior do que 1,0. Dessa forma, sugerimos que o modelo dominante é o que melhor se ajusta aos nossos dados, ou seja, que melhor explica a associação do marcador rs2230199 com a DMRI. Então, considerando o modelo dominante e o cálculo da OR após as análises de regressão com covariáveis (Tabela 11), podemos dizer que indivíduos com uma ou duas cópias do alelo de risco C (CG ou CC) apresentam > 6,1 vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI (OR = 6,1144; IC 95%; 2,1219-17,6194) comparado aos indivíduos com nenhuma cópia do alelo de risco (GG).

O mesmo raciocínio é válido para o marcador rs3750847. No modelo aditivo, foram calculadas OR para CT/CC e TT/CT. O heterozigoto (CT) foi associado a > 4,6 vezes de aumento no risco da DMRI (OR = 4,6803; IC 95%; 2,3588-9,2864) comparado aos homozigotos que não carregam o alelo de risco (CC). Indivíduos homozigotos para o alelo de risco (TT) apresentaram > 1,2 vezes de aumento na chance de

desenvolvimento da DMRI (OR = 1,2578; IC 95%; 0,4514-3,5050) comparado aos heterozigotos (CT). Comparando as duas OR verificamos que, além de serem muito diferentes, a OR para CT/CC (OR = 4,6803; IC 95%; 2,3588-9,2864) foi alta e significativa, enquanto a OR para TT/CT (OR = 1,2578; IC 95%; 0,4514-3,5050) foi relativamente baixa e não-significativa, pois a OR foi maior do que 1,0 e o limite de confiança inferior foi menor do que 1,0. Dessa forma, também sugerimos que o modelo dominante é o que melhor explica a associação do marcador rs3750847 com a DMRI. Então, considerando o modelo dominante e o cálculo da OR após as análises de regressão com covariáveis (Tabela 11), podemos dizer que indivíduos com uma ou duas cópias do alelo de risco T (CT ou TT) apresentam > 6,4 vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI (OR = 6,4562; IC 95%; 2,7669-15,0643) comparado aos indivíduos com nenhuma cópia do alelo de risco (CC).

Considerando os marcadores rs1061147 e rs1329428, a presença do haplótipo AC conferiu um aumento de > 8,7 vezes (OR = 8,7430; IC 95%; 2,7467-27,8298) na chance de desenvolvimento da DMRI após a correção para as covariáveis. Por outro lado, o haplótipo CT mostrou-se significativamente associado à proteção contra a DMRI, diminuindo em > 7 vezes o risco de desenvolvimento da doença (OR = 0,1366; IC 95%; 0,0427-0,4374) (Tabela 12).



**Tabela 12. Odds Ratio para os haplótipos formados pelos SNPs rs1061147 e rs1329428**

Preditor	Odds Ratio	
	Modelo completo	Modelo completo x reduzido
AC	9,9743 *	8,7430 *
AT	NA	NA
CC	0,7347	0,5766
CT	0,1095 *	0,1366 *
Africana	0,0012 *	CV
Ameríndia	0,0098 *	CV
Européia	132,9896 *	CV
Branco	5,2000 *	CV
Pardo	0,2920	— <sup>a</sup>
Preto	NA	— <sup>a</sup>
Idade	1,9596 *	CV
IMC	0,9195	— <sup>a</sup>
Hipercolesterolemia	1,6296	— <sup>a</sup>
Hipertensão	0,6047	— <sup>a</sup>
Sexo	0,5455	— <sup>a</sup>
Tabagismo	0,5696	— <sup>a</sup>

\* OR (intervalo de confiança de 95%) para os preditores que mostraram associação significativa com o fenótipo nas análises de regressão (Tabela 10)

—<sup>a</sup> significa 'retirado da análise'

CV: covariável

NA: 'not available' (dado não disponível). Para explicação ver rodapé da Tabela 8.

É interessante ressaltar as OR associadas aos fatores de risco que mostraram associação significativa com o fenótipo e, por isso, foram considerados como covariáveis nas análises de regressão do modelo completo x reduzido. Observando as OR do modelo completo na Tabela 11, vemos que a ancestralidade Européia apresentou uma OR > 133,3 (OR = 133,3940; IC 95%; 20,4080-871,9094). Isso significa que, no presente estudo, a chance “teórica” relativa estimada de desenvolver DMRI aumenta 133,3 vezes a cada aumento de uma unidade no valor da ancestralidade Européia. Em termos práticos isso não seria possível porque a soma final dos valores das três ancestralidades é sempre igual a 1. No entanto, o valor de OR > 1,0 indica que, na prática, indivíduos de ancestralidade Européia apresentam um aumento na chance de desenvolvimento da doença. Por outro lado, ao analisarmos a ancestralidade Africana e Ameríndia notamos uma OR próxima de zero para ambas (Africana: OR = 0,0011; IC 95%; 0,00004-0,0276 / Ameríndia: OR = 0,0102; IC 95%; 0,0008-0,1228). Esse resultado indica que a chance “teórica” relativa estimada de desenvolver DMRI diminui > 900 e > 98 vezes a cada aumento de uma unidade no valor da ancestralidade Africana e Ameríndia, respectivamente. Da mesma forma que para a ancestralidade Européia, na prática isso não seria possível para as ancestralidades Africana e Ameríndia. No entanto, o valor de OR < 1,0 indica que, na prática, indivíduos de ancestralidade Africana e Ameríndia apresentam uma redução na chance de desenvolvimento da DMRI. Considerando a cor de pele (Branco), podemos dizer que indivíduos Brasileiros auto-declarados Brancos apresentam > 5,1 vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI (OR = 5,1810; IC 95%; 2,5071-10,7065) quando comparado aos Brasileiros não-Brancos (Pardos e Pretos). E, finalmente, a idade também mostrou-se significativamente associada com um aumento na chance de desenvolvimento da DMRI. Nas análises de regressão, a idade foi considerada como variável categórica e foi subdividida em 5 níveis: 49-58, 59-68, 69-78, 79-88 e 89-98 anos (Tabela 5). Dessa forma, podemos dizer que a chance relativa estimada de desenvolver DMRI aumenta quase 2 vezes a cada aumento de 1 nível da variável idade (OR = 1,8866; IC 95%; 1,3708-2,5965). Por exemplo, indivíduos do nível 1 (59-68 anos) apresentam quase 2 vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI quando comparado aos indivíduos do nível 0 (49-58 anos). Resultados semelhantes foram obtidos se consideramos as OR da Tabela 12.

Em todas as análises realizadas, o SNP rs12913832 não apresentou associação significativa com o fenótipo (Tabelas 7 e 8).

### 3.5- Discussão

A degeneração macular relacionada à idade é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta principalmente pessoas acima de 50 anos (Swaroop et al., 2007; Swaroop et al., 2009; Chen et al., 2010a; Chen et al., 2010b), sendo que atualmente ela é considerada a terceira causa mundial de cegueira (Katta et al., 2009; WHO, 2010). Sua etiologia é complexa e multifatorial, e a susceptibilidade à doença é influenciada por fatores genéticos e ambientais (Seddon e Chen, 2004). Atualmente, a DMRI representa um grande problema de saúde pública, com significativo impacto econômico e social em diversos países. A porcentagem de variabilidade no risco de DMRI devido às variantes genéticas foi estimada em 45-70% (Seddon et al., 2005; Seddon et al., 2009; Spencer et al., 2011). Portanto, exames genéticos capazes de identificar um indivíduo de alto risco, através da determinação de variantes genéticas que aumentam a susceptibilidade de desenvolvimento da doença, podem ser considerados uma ferramenta importante para um tratamento precoce.

Por isso, consideramos de grande importância médica/social identificar polimorfismos genéticos associados à DMRI na população Brasileira, visto que são relatadas diferenças no predomínio da DMRI baseado na raça/etnicidade (Pritchard e Rosenberg, 1999; Devlin e Roeder, 1999). Dois trabalhos desenvolvidos recentemente demonstraram a associação significativa de três SNPs com a DMRI em Brasileiros: rs1413711 no gene *VEGF* (OR = 3,6 para TT) (Almeida et al., 2012); rs10490924 no gene *ARMS2/LOC387715* (OR = 5,5 para TT) e rs1061170 no gene *CFH* (OR = 7,2 para CC) (Almeida et al., 2013). Três anos antes do trabalho publicado por Almeida et al. (2013), Teixeira et al. (2010) já haviam demonstrado a associação significativa de rs1061170 com a DMRI em Brasileiros (OR = 4,63 para CC). Com o objetivo de expandir esses estudos iniciais, nós decidimos ampliar o número de marcadores analisados na população Brasileira. Para isso escolhemos oito SNPs descritos na literatura em estudos de associação com a DMRI envolvendo outras populações mundiais (rs1061147, rs1329428, rs2230199, rs3750847, rs547154, rs9332739, rs9621532 e rs28357980) (Hageman et al., 2005; Klein et al., 2005; Maller et al., 2006; Francis et al., 2007; Kanda et al., 2007; Canter et al., 2008; Jakobsdottir et al., 2008; Scholl et al., 2009; Chen et al., 2010a; Kopplin et al., 2010; Arakawa et al., 2011; Dong et al., 2011; Sivakumaran et al., 2011; Fritsche et al., 2013). Investigamos também uma

possível associação do SNP rs12913832, localizado no gene *HERC2* e que determina a cor de olho azul-marrom em humanos (Sturm et al., 2008), com a DMRI.

No presente trabalho, nós confirmamos a associação significativa dos SNPs rs1061147 (gene *CFH*), rs1329428 (gene *CFH*), rs2230199 (gene *C3*) e rs3750847 (gene *ARMS2/LOC387715*) com a DMRI em um grupo caso-controle de 192 indivíduos Brasileiros (122 casos e 70 controles), da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Também mostramos que, no grupo estudado, idade, cor de pele (Branco) e ancestralidade (Africana, Ameríndia e Européia) apresentaram associação significativa com a DMRI e foram consideradas como covariáveis nas análises de regressão do modelo completo x reduzido (Tabelas 8 e 10).

Dois polimorfismos que mostraram associação significativa com a DMRI estão localizados no gene *CFH*. O SNP rs1061147 é um polimorfismo sinônimo (A307A) localizado no éxon 7, e rs1329428 (IVS15) está localizado na região não codificadora do gene *CFH* (íntron 15). O SNP rs1329428 está localizado em um domínio funcional do gene *CFH* (Dong et al., 2011), que mostrou ser uma região de ligação à proteínas reguladoras da transcrição (Sivakumaran et al., 2011). Portanto, esse SNP poderia afetar os níveis de expressão do gene *CFH* e a eficiência de ligação a seus ligantes (Dong et al., 2011). De forma geral, Li et al. (2006a) lançaram a hipótese de que polimorfismos (ou haplótipos) no loco *CFH* modulam o risco de DMRI não porque eles interrompem a função da proteína, mas porque eles são importantes para a regulação da expressão do gene *CFH*, ou de outros genes do complemento próximos à ele, ou ambos.

O gene *CFH* está localizado no cromossomo 1q32, dentro de um *cluster* de genes codificadores de proteínas que regulam a ativação de C3 na via do complemento (Kokotas et al., 2011). Ele é amplamente aceito como um importante gene de susceptibilidade para a DMRI, abrigando variantes e haplótipos associados ao aumento e à redução no risco da doença em vários grupos étnicos (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005; Zarepari et al., 2005). Os SNPs associados à DMRI, entretanto, dependem do estudo e da população estudada. Muitas pesquisas demonstraram que a proteína CFH é produzida localmente no olho e parece ter uma importante função na manutenção da homeostase local. Estudos *in vitro* mostram que a proteína CFH é produzida pelas células do EPR, em níveis próximos daqueles do fígado (Hageman et al., 2005). Ela se acumula nas drusas, células do EPR, espaço sub-EPR, na matriz entre as células fotorreceptoras e na coróide (Hageman et al., 2005; Chen et al., 2007). Os níveis também são altos em outras partes do olho,

incluindo as lentes, nervo óptico, esclera e corpo ciliar. Além disso, a expressão de *CFH* parece ter início na embriogênese e aumenta com a idade (Mandal e Ayyagari, 2006). O *CFH* é um regulador negativo do sistema do complemento. O complexo C3bBb (C3 convertase) é um componente-chave da via alternativa, e o *CFH* inibe a via alternativa por agir como um cofator para a inativação de C3b mediada pelo Fator I, ou por promover o deslocamento do Fator Bb a partir do complexo C3bBb (Alsenz et al., 1985). Pesquisadores do Estudo do Olho de Rotterdam (*Rotterdam Eye Study*) demonstraram que o *CFH* está associado a todas as fases da DMRI, desde os primeiros sinais da DMRI com o aparecimento de drusas até lesões das fases avançadas da doença que causam perda visual significativa (Despriet et al., 2006). O risco aumenta em cada fase sucessiva da DMRI (Cruz-González et al., 2013). A disfunção do *CFH* pode levar à ativação descontrolada do complemento, causando inflamação excessiva e dano tecidual envolvido na patogênese da doença (Johnson et al., 2006; Hageman et al., 2005).

No presente estudo, os polimorfismos rs1061147 e rs1329428 foram analisados na forma de haplótipo por estarem em moderado LD ( $D' = 1,000$  e  $R^2 = 0,436$ ). Os valores de *Odds Ratio*, após a correção para as covariáveis, do haplótipo de risco AC (OR = 8,7430; IC 95%; 2,7467-27,8298) e do haplótipo protetor CT (OR = 0,1366; IC 95%; 0,0427-0,4374) (Tabela 12), que mostraram associação significativa com a DMRI, sugerem que eles sejam excelentes marcadores genéticos para a DMRI em Brasileiros. Entretanto, estudos envolvendo um grupo amostral maior serão necessários para corroborar nossos resultados.

Estudos mostram que alguns polimorfismos no gene *CFH*, incluindo rs1061147 e rs1329428, são os principais fatores genéticos para o desenvolvimento da DMRI em Caucasianos (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005). Na população Chinesa, o SNP rs1329428 foi associado ao risco de DMRI exudativa (Chen et al., 2006).

Alguns estudos validaram a associação do SNP rs1061147 com a susceptibilidade para DMRI. Hageman et al. (2005) encontraram uma associação significativa de rs1061147 com a DMRI em um grupo caso-controle de indivíduos de descendência Européia-Americana (grupo de Iowa, OR = 2,82 / grupo de Columbia, OR = 2,34). Francis et al. (2007), em um estudo envolvendo famílias com DMRI, casos esporádicos de DMRI avançada (atrofia geográfica e neovascularização coroidal) e casos provenientes do AREDS, demonstraram que o alelo de risco A da variante

rs1061147, combinado com alelos de risco de mais dois SNPs (rs1061170: C e rs2274700: C), formavam um haplótipo fortemente associado à DMRI ( $p\text{-value} < 10^{-9}$ ).

Vários trabalhos relatam a associação do alelo de risco C do SNP rs1329428 com a DMRI. Estudos mostraram que Caucasianos (Klein et al., 2005) e Chineses (Chen et al., 2006) homocigotos para o alelo C têm um risco superior de desenvolvimento da DMRI. Klein et al. (2005), em um estudo caso-controle com um sub-grupo de indivíduos que participaram do AREDS (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2011) e se auto-declararam “Branco não-Hispânico”, mostraram que indivíduos com genótipo CC apresentavam 6,2 vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI comparado aos indivíduos com genótipo CT. O risco conferido por esse genótipo explicou aproximadamente 61% do risco total da população. Esse foi o primeiro estudo publicado de GWAS e que revelou a associação do loco *CFH* com a susceptibilidade para a DMRI. Kim et al. (2008) também relataram uma associação significativa do alelo de risco C de rs1329428 com a DMRI exudativa (OR = 1,997) em Coreanos. Chen et al. (2006a), Ng et al. (2008) e Dong et al. (2011), em estudos caso-controle na população Chinesa, demonstraram que a frequência do alelo de risco C foi superior em pacientes com DMRI exudativa quando comparado aos controles, com valores de OR iguais à 1,83, 1,87 e 1,79, respectivamente. Sivakumaran et al. (2011), em um estudo envolvendo 34 famílias com DMRI e amostras caso-controle (Branco, Indiano e Malaio), mostraram que uma região de 32 kb no gene *CFH* é crítica para o desenvolvimento da DMRI. Eles identificaram rs1329428 e rs203687 como sendo os marcadores que mostram melhor evidência de associação com a DMRI, com rs1329428 apresentando um  $p\text{-value}$  de  $2,6 \times 10^{-105}$ . Brión et al. (2011), ao analisarem um grupo caso-controle de indivíduos Caucasianos e de descendência Espanhola demonstraram que, dos sete SNPs no gene *CFH* associados à DMRI avançada (atrofia geográfica e neovascularização coroidal), o SNP rs1329428 (alelo de risco C: OR = 2,49) junto com rs1329421 foram os que mostraram as mais fortes associações. Esses autores também relataram a presença de haplótipos de risco e protetores no loco *CFH* formados por esses sete SNPs, sendo que o alelo T de rs1329428 foi exclusivamente encontrado nos haplótipos protetores. Esse estudo dá suporte aos nossos resultados, em que o alelo T de rs1329428 também foi encontrado formando o haplótipo protetor (CT).

Li et al. (2006a), ao analisarem 84 polimorfismos dentro e ao redor do gene *CFH* em um grupo caso-controle de indivíduos Branco e de ancestralidade Européia

Ocidental, verificaram que 20 desses polimorfismos mostraram associação mais forte com o risco de DMRI do que a variante Y402H (rs1061170), a qual é amplamente estudada em pesquisas relacionadas à DMRI. Dentre esses 20 SNPs estavam rs1061147 e rs1329428, com os alelos de risco A e C apresentando *p-values* extremamente baixos:  $< 10^{-25}$  e  $< 10^{-28}$ , respectivamente.

Os nossos resultados são concordantes àqueles publicados, confirmando a importância do loco *CFH* na susceptibilidade para DMRI também na população Brasileira. Além disso, como pode ser observado pelos nossos resultados, a presença simultânea dos alelos de risco A (rs1061147) e C (rs1329428) no haplótipo AC aumenta substancialmente o risco de desenvolvimento da DMRI (OR = 8,7430), comparado à ocorrência individual de cada um deles como relatado na literatura.

Associação significativa também foi encontrada para o polimorfismo rs2230199 (R102G), localizado no gene do componente 3 do complemento (*C3 – complement component 3*), no cromossomo 19p13.3. A proteína C3 é um componente-chave do complemento e sua clivagem em C3a e C3b é o passo central na ativação de todas as três vias do complemento (alternativa, clássica e da lectina). A proteína C3 e seu produto de ativação C3a foram encontrados nas drusas, assim como na neuroretina, membrana de Bruch e estroma coroidal (Mullins et al., 2001; Nozaki et al., 2006; Gold et al., 2006). O gene *C3* é expresso em células do EPR, neuroretina e tecido coroidal, sugerindo síntese local (Mullins et al., 2001). A associação do polimorfismo rs2230199 no loco *C3* com a susceptibilidade para DMRI foi demonstrada em vários estudos (Spencer et al., 2008; Despriet et al., 2009; Scholl et al., 2009; Chen et al., 2010a; Yu et al., 2011; Sobrin et al., 2012; Fritsche et al., 2013). O risco atribuído à população estimado para essa variante é de 22% (Yates et al., 2007). Uma meta-análise de 17 estudos confirmou a associação de variantes genéticas no gene *C3* com a DMRI (Thakkinstian et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que, para o SNP rs2230199, o modelo dominante foi o que melhor explicou sua associação com a DMRI. As análises de regressão do modelo completo x reduzido mostraram que indivíduos com uma ou duas cópias do alelo de risco C (CG ou CC) apresentam  $> 6,1$  vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI (OR = 6,1144; IC 95%; 2,1219-17,6194) comparado aos indivíduos com nenhuma cópia do alelo de risco (GG) (Tabela 11).

Vários estudos relataram a associação do polimorfismo rs2230199 com a DMRI, corroborando os nossos resultados. Spencer et al. (2008) relataram a associação do SNP

rs2230199 com a DMRI em indivíduos Caucasianos “não-Hispânicos”, mostrando uma OR igual a 1,55. Despriet et al. (2009) analisaram 6418 participantes do Estudo de Rotterdam (*The Rotterdam Study*) e um grupo caso-controle formado por indivíduos Caucasianos da Holanda e relataram a associação do SNP rs2230199 com a DMRI nos estágios iniciais (OR = 1,27) e no estágio avançado (OR = 1,93). Em um estudo caso-controle com indivíduos Brancos da Alemanha, Scholl et al. (2009) mostraram que indivíduos homocigotos para o alelo C têm 4,17 vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI seca (atrofia geográfica) quando comparado aos indivíduos com genótipo GG. Entretanto, eles não encontraram associação desse polimorfismo com a progressão para a forma exudativa da doença. Chen et al. (2010a) realizaram um GWAS com amostras caso-controle de ancestralidade Européia e confirmaram a associação do alelo de risco C de rs2230199 com a DMRI no grupo estudado (OR = 1,74;  $p\text{-value} = 1,0 \times 10^{-10}$ ). Kopplin et al. (2010) realizaram uma meta-análise de GWAS e relataram a associação significativa do alelo C com a susceptibilidade para DMRI, apresentando uma OR igual a 1,44 ( $p\text{-value} = 1,6 \times 10^{-7}$ ). Yu et al. (2011), através de meta-análise de GWAS e replicação em um grupo caso-controle, analisaram mais de 8.200 casos e 56.300 controles e mostraram que indivíduos carregando o alelo C apresentavam 1,53 vezes de aumento no risco de DMRI ( $p\text{-value} = 4,6 \times 10^{-29}$ ). Sobrin et al. (2012) realizaram uma meta-análise de GWAS com indivíduos de ancestralidade Européia e, quando compararam indivíduos com neovascularização coroidal ou atrofia geográfica em relação ao grupo controle, encontraram, respectivamente, OR iguais a 1,61 ( $p\text{-value} = 1,0 \times 10^{-12}$ ) e 1,83 ( $p\text{-value} = 4,9 \times 10^{-13}$ ) associadas à presença do alelo C. E recentemente, resultados de um grande estudo realizado em colaboração por dezoito grupos de pesquisa internacionais (Fritsche et al., 2013) confirmaram a importância da inclusão do SNP rs2230199 nos estudos de associação da DMRI. Eles realizaram uma meta-análise de diversos GWAS, incluindo mais de 17.100 casos de DMRI e mais de 60.000 controles de ancestralidade Européia e Asiática, e avaliaram possíveis associações de 2.442.884 SNPs com a doença. Além de identificarem sete novos locos associados à DMRI, eles confirmaram a associação significativa do alelo de risco C da variante rs2230199 com a doença ( $p\text{-value} = 1,0 \times 10^{-41}$ ; OR = 1,42).

O quarto e último polimorfismo que mostrou associação significativa com a DMRI foi rs3750847, localizado no íntron 1 do gene *ARMS2* (*age-related maculopathy susceptibility 2*, também conhecido como *LOC387715*), com o modelo dominante sendo



o que melhor se ajustou aos nossos dados. O gene *ARMS2* está localizado no cromossomo 10q26, sendo considerado o segundo principal loco de susceptibilidade para a DMRI, contribuindo para o risco da doença independentemente do gene *CFH*. A associação do loco *ARMS2* com a DMRI, especialmente com a susceptibilidade para a forma avançada da doença, já foi replicada em vários estudos independentes (Conley et al., 2006; Ross et al., 2007; Schmidt et al., 2006; Seddon et al., 2007; Kanda et al., 2007). Kanda et al. (2007) demonstraram que o gene *ARMS2* é expresso na retina humana e em uma variedade de outros tecidos e linhagens celulares, além de codificar uma proteína de 12 kDa localizada na membrana externa da mitocôndria quando expresso em células de mamíferos. Posteriormente, esse mesmo grupo relatou que a proteína *ARMS2* está localizada na região elipsóide das células fotorreceptoras da retina, onde a maioria das mitocôndrias está localizada. Entretanto, resultados diferentes foram obtidos por Wang et al. (2009). Eles encontraram que a proteína *ARMS2* está distribuída no citosol, e não na membrana externa da mitocôndria. Mais recentemente, Kortvely et al. (2010) demonstraram que *ARMS2* é um constituinte da matriz extracelular e pode interagir com a proteína fibulina-6. Novos estudos são necessários para confirmar ou refutar esses resultados.

Nosso estudo mostrou, através das análises de regressão do modelo completo x reduzido, que indivíduos com uma ou duas cópias do alelo de risco T (CT ou TT) apresentam > 6,4 vezes de aumento na chance de desenvolvimento da DMRI (OR = 6,4562; IC 95%; 2,7669-15,0643) comparado aos indivíduos com nenhuma cópia do alelo de risco (CC) (Tabela 11). Comparado aos três polimorfismos acima, poucos estudos foram publicados relacionando o SNP rs3750847 com a DMRI.

Em um estudo com indivíduos que se auto-declararam “Branco não-Hispânicos”, Kanda et al. (2007) encontraram uma forte associação significativa do polimorfismo rs3750847 com o risco de DMRI ( $p\text{-value} = 9,4 \times 10^{-21}$ ). Arakawa et al. (2011) realizaram um GWAS e identificaram o SNP rs3750847 ( $p\text{-value} = 8,67 \times 10^{-29}$ ) como uma das variantes de susceptibilidade para a DMRI exudativa em um grupo caso-controle de indivíduos Japoneses. O  $p\text{-value}$  que obtivemos no nosso estudo, considerando o modelo dominante, foi relativamente menor quando comparado aos valores encontrados por Kanda et al. (2007) e Arakawa et al. (2011); contudo, o SNP rs3750847 manteve uma associação fortemente significativa com a DMRI mesmo após a correção para as covariáveis ( $p\text{-value} = 3,6971 \times 10^{-5}$ ) (Tabela 8). Esses trabalhos corroboram nossas descobertas.

Em resumo, nossos resultados mostraram a associação significativa de quatro SNPs com a susceptibilidade para DMRI em Brasileiros, após a correção para os fatores de risco que foram significativamente associados à doença. Dois SNPs estão localizados no gene *CFH* (rs1061147 e rs1329428), um SNP está no gene *C3* (rs2230199) e outro no gene *ARMS2/LOC387715* (rs3750847). As variantes rs1061147 e rs1329428 estão em desequilíbrio de ligação e, portanto, foram analisadas na forma de haplótipo. Associação fortemente significativa com a DMRI foi encontrada para os haplótipos AC (haplótipo de risco) e CT (haplótipo protetor). Para os polimorfismos rs2230199 e rs3750847, indivíduos com pelo menos uma cópia dos alelos de risco C e T, respectivamente, apresentaram um risco consideravelmente superior de desenvolvimento da doença quando comparado aos indivíduos com nenhuma cópia dos alelos de risco. Além disso, Brasileiros auto-declarados Brancos e de ancestralidade Européia mostraram aumento na chance de desenvolvimento da DMRI. A idade avançada também foi um fator ambiental significativamente associado ao risco de DMRI na população estudada. A replicação de estudos de associação em diversos grupos étnicos ao redor do mundo, especialmente naqueles com uma mistura complexa de populações ancestrais, tal como a população Brasileira, é muito importante para delimitar a base molecular da DMRI e para a identificação de diferenças étnico-específicas na magnitude com que determinadas variantes genéticas modificam o risco da doença.

Para os demais SNPs (rs547154, rs9332739, rs9621532 e rs28357980) que, apesar de mostrarem associação significativa com a DMRI em outras populações mundiais, não o foram no nosso grupo caso-controle, alguns fatores poderiam explicar essa divergência: 1) a população estudada (a população Brasileira é miscigenada, formada por uma extensa mistura genética, diferente da maioria das outras populações mundiais), 2) o tamanho da amostra (talvez fosse necessário um número maior de casos e controles para que outras associações fossem detectadas), 3) fatores demográficos (por exemplo, os estudos podem divergir quanto às idades dos grupos caso e controle, se foram incluídos ou excluídos indivíduos fumantes, etc.), 4) critério de inclusão (autores divergem nos critérios usados para inclusão dos pacientes nos grupos caso e controle. Por exemplo, existem diferentes sistemas de classificação, como CARMS, AREDS, *Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System*, dentre outros. Além disso, enquanto alguns estudos separam os pacientes de acordo com o grau de maculopatia e avaliam, por exemplo, somente pacientes com DMRI seca, úmida ou ambos, nós não

fizemos essa distinção e agrupamos todos os pacientes, desde o estágio precoce até o estágio avançado, em um único grupo) e/ou 5) diferentes estratégias de genotipagem [em muitos estudos utilizam-se microarranjos de DNA para genotipagem dos SNPs (GWAS), enquanto outros utilizam sondas *TaqMan*<sup>®</sup> ou sequenciamento, com cada metodologia apresentando limitações próprias].

A ausência de associação do SNP rs12913832 com a DMRI no presente estudo pode ser explicada pelos mesmos fatores listados acima ou simplesmente porque esse polimorfismo não apresenta associação com a doença, visto que na literatura ele é descrito unicamente como determinante da cor de olho azul-marrom em humanos (Sturm et al., 2008). Estudos adicionais, incluindo diversas populações mundiais, seriam necessários para demonstrar se esse SNP apresenta ou não associação com a DMRI.

Embora estudos adicionais, envolvendo um grupo amostral maior, sejam necessários para corroborar nossos resultados, nosso estudo é concordante com a afirmação de que polimorfismos nos locos *CFH*, *ARMS2/LOC387715* e *C3* são consistentemente associados à DMRI, até mesmo em uma população com extensa mistura genética, tal como a população Brasileira. A identificação de fatores de risco genéticos e ambientais associados à DMRI é o primeiro passo para a detecção precoce, prevenção, e no futuro, melhores tratamentos.

## **4- Parte II**

**Teste de triagem molecular rápido,  
preciso e de baixo custo para detecção de  
síndromes de microdeleção  
cromossômica usando PCR quantitativa  
em tempo real (qPCR)**

## **4.1- Introdução**

### **4.1.1- Anormalidades cromossômicas e síndromes de microdeleção/microduplicação cromossômicas**

Muitas doenças genéticas humanas são causadas por anormalidades cromossômicas, caracterizadas por perda ou ganho de material genético. Anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais ocorrem em aproximadamente 0,6% dos nascimentos (Shaffer e Lupski, 2000) e, frequentemente, resultam em dismorfismo, malformações e/ou problemas no desenvolvimento.

Anormalidades numéricas, também denominadas aneuploidias, são o resultado do ganho ou da perda de um cromossomo inteiro e constituem as anormalidades citogenéticas mais comuns. A maioria das aneuploidias tem origem a partir da separação incorreta dos pares de cromossomos durante a meiose (Theisen e Shaffer, 2010).

Anormalidades cromossômicas estruturais envolvem a quebra e posterior união dos braços dos cromossomos, resultando em rearranjos genômicos tais como inversões, translocações, inserções, deleções e/ou duplicações.

As inversões são rearranjos que envolvem duas quebras em um mesmo cromossomo com reincorporação do segmento interveniente de forma invertida. As translocações correspondem à troca de segmentos entre dois ou mais cromossomos, e as inserções ocorrem quando um segmento é translocado e inserido em uma nova região cromossomal (Theisen e Shaffer, 2010). Se um efeito de posição for exercido em genes vizinhos ao rearranjo, se um ou mais genes forem interrompidos pelo ponto de quebra cromossomal, ou se um novo produto gênico for formado, esses rearranjos podem ser considerados patogênicos.

Diferente das três classes de rearranjos citadas acima, as deleções e duplicações envolvem, respectivamente, a perda e ganho de material genético. As deleções podem ser terminais ou intersticiais. A deleção terminal resulta de uma quebra no cromossomo acompanhada da perda do segmento distal à quebra; a deleção intersticial, por sua vez, se origina a partir de duas quebras seguido da perda do segmento interveniente e união dos segmentos restantes. As duplicações caracterizam-se pelo ganho de um segmento

cromossomal na posição original do cromossomo, podendo estar em uma orientação invertida ou na orientação original (direta).

Deleções e duplicações, que são coletivamente chamadas de “variantes de número de cópias” (CNVs), são os tipos mais comuns de variações estruturais no genoma humano (Sebat et al., 2004). Análises genômicas revelaram que existem, pelo menos, 12.000 CNVs, representando aproximadamente 13% do genoma humano (Conrad et al., 2010; Mills et al., 2011; Grayton et al., 2012). As CNVs resultam em alteração de um número variável de genes, causando mudanças no que denominamos “dosagem de genes” (*gene dosage*), que se refere ao número de cópias de um gene presente na célula de um organismo. Além disso, a interrupção de regiões regulatórias dentro das CNVs pode também resultar em dosagem e função alteradas de genes fora dos intervalos deletados ou duplicados (Henrichsen et al., 2009).

As CNVs contribuem de forma significativa para os mecanismos genéticos que são a base de várias doenças humanas e proporcionam um maior conhecimento sobre a etiologia de fenótipos que se originam de doenças do neurodesenvolvimento, autismo, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), desordens bipolares, esquizofrenia e epilepsia (Beckmann et al., 2007; Sebat et al., 2007; Walsh et al., 2008; Mefford et al., 2008; Helbig et al., 2009). Em outras palavras, as CNVs podem levar ao desenvolvimento de diversas síndromes de microdeleção/microduplicação (SMM) cromossômicas.

As SMM são causadas por variações submicroscópicas no número de cópias de determinada região do genoma e são uma causa comum de anomalias congênitas, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, déficit cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos (Deak et al., 2011). Para a maioria das síndromes de microdeleção cromossômica, a deleção causa a haploinsuficiência de um ou mais genes, sendo que a cópia intacta remanescente do gene não é suficiente para manter a função gênica normal. São exemplos de síndromes de microdeleção: síndrome de deleção 22q11, síndrome de Williams-Beuren, monossomia 1p36, entre outras. As SMM são recorrentes na população devido às características inerentes à estrutura do genoma humano (Deak et al., 2011).

Inúmeros elementos repetitivos presentes no genoma humano atuam como substratos para recombinações dentro e entre cromossomos/cromátides durante a meiose e a mitose. Essa instabilidade do genoma humano não causa somente doenças, como as SMM, mas tem um grande impacto na evolução e flexibilidade do genoma em termos

de ganho de novas funções gênicas ou efeitos diretos na dosagem de genes (Marques-Bonet e Eichler, 2009; Gazave et al., 2011). A maioria dos rearranjos genômicos recorrentes são mediados por sequências tais como duplicações segmentais (Bailey e Eichler, 2006) e repetições de baixo número de cópias (LCRs – *Low Copy Repeats*) flanqueando uma determinada região, o que permite a ocorrência de recombinação homóloga não alélica levando a um número elevado de rearranjos de novo (Stankiewicz e Lupski, 2002) ou SINEs/LINEs/LTRs (Korbel et al., 2007; Kidd et al., 2008).

Teoricamente, para cada síndrome de microdeleção deveria haver uma síndrome de microduplicação recíproca. No entanto, existem atualmente 211 síndromes de microdeleção contra apenas 79 síndromes de microduplicação relatadas (Weise et al., 2012). Isso ocorre por várias razões: por exemplo, erros na meiose que levam à duplicação e deleção devem ocorrer em frequências iguais, mas estudos recentes indicam que a seleção precoce durante a gametogênese favorece ou um ou outro (Turner et al., 2008). Na verdade, as microduplicações parecem resultar em um fenótipo clínico mais brando ou, até mesmo, ausência de fenótipo clínico quando comparadas às microdeleções recíprocas (Weise et al., 2012).

#### **4.1.2- Principais métodos para detectar anormalidades cromossômicas**

Na rotina dos laboratórios de genética médica, a detecção de anormalidades cromossômicas, principalmente aquelas associadas a diversas SMM, é feita através de análises de cariótipo, análises de microarranjos, métodos de citogenética molecular e/ou técnicas de biologia molecular.

Análises de cariótipo podem identificar deleções e rearranjos que envolvem segmentos cromossômicos maiores do que 5 a 10 Mb de DNA, que normalmente resultam em uma mudança óbvia no padrão de bandas (Shaffer e Bejjani, 2009). Contudo, não são capazes de detectar microdeleções (Vieira et al., 2013). Além disso, as análises de cariótipo apresentam deficiências inerentes ao método, tais como: baixa resolução, consumo excessivo de tempo com cultura de células e análise microscópica, além de necessitar de um citogeneticista experiente (Bejjani e Shaffer, 2008). Análises de cariótipo permitem detectar anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais em apenas 3-4% dos casos de deficiência intelectual (DI) e autismo (Bejjani e Shaffer, 2008). As demais técnicas são capazes de detectar CNVs menores que 5 Mb.

Nas análises utilizando a técnica de aCGH, o DNA de um paciente é diretamente comparado ao DNA de um controle conhecido através do uso de sondas de DNA fluorescentes diferencialmente marcadas. Os microarranjos podem ser construídos de duas formas: com o uso de cromossomos artificiais de bactérias (BACs – *Bacterial Artificial Chromosomes*) ou com oligonucleotídeos. Cada BAC ou oligonucleotídeo tem uma posição conhecida dentro do genoma humano (Shaffer e Bejjani, 2009). A técnica de aCGH é usada como um método de triagem de todo o genoma, importante para a detecção de pequenas alterações cromossômicas. De fato, o estudo de pacientes com deficiência intelectual ou autismo, com ou sem malformações, usando esse método, mostra microdeleções em 10-15% dos casos, incluindo 5% de deleções especificamente em regiões subteloméricas (Kriek et al., 2004; Lu et al., 2007; Slavotinek, 2008; Stankiewicz e Beaudet, 2007). No entanto, ele apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, trata-se de uma técnica de alto custo, pois depende da comparação com um genoma de referência em cada análise realizada (Grayton et al., 2012). Além disso, a interpretação dos dados genômicos produzidos por aCGH é uma etapa trabalhosa (Weise et al., 2012) e, de acordo com Shaffer e Bejjani (2009), o tempo para execução e apresentação dos resultados de microarranjos utilizando clones BAC é de 24 a 48 horas, enquanto para os microarranjos utilizando oligonucleotídeos é de aproximadamente 3 a 5 dias. Em relação a esse método, um dos principais questionamentos é que ainda não estão bem estabelecidas as relações entre genótipo e fenótipo. Ou seja, a decisão mais crítica é se uma CNV é considerada benigna ou patológica (Weise et al., 2012).

A citogenética molecular, especialmente a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH – *Fluorescent In Situ Hybridization*), é utilizada para a análise direta da região crítica associada a uma determinada SMM. A técnica de FISH faz uso de sondas de DNA loco-específicas, que hibridizam diretamente aos cromossomos em metáfase ou aos núcleos em intérfase (Shaffer e Bejjani, 2009; Weise et al., 2012). Ela é usada quando o médico suspeita de uma SMM específica ou para a verificação dos dados de aCGH. A técnica de FISH é capaz de detectar alterações submicroscópicas (menores que 5 Mb) em 6,8% dos pacientes com déficit cognitivo ou atraso no desenvolvimento (Shevell et al., 2003). Contudo, apresenta algumas desvantagens, pois trata-se de um método de alto custo, laborioso e demorado (Weksberg et al., 2005). Duplicações são mais difíceis de verificar por FISH do que deleções; no entanto, esta desvantagem pode ser superada através da análise de núcleos em intérfase (Weise et al., 2008).



Mais recentemente, a técnica denominada amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA – *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) foi desenvolvida e consiste na realização de reações de PCR *multiplex*. Somente os iniciadores que hibridizam com as sequências-alvo são amplificados, e os produtos resultantes podem ser analisados por eletroforese capilar. Esse método permite a detecção simultânea de alterações no número de cópias de até 50 sequências genômicas diferentes. Comparando-se o padrão de picos obtidos para um paciente ao padrão de picos de amostras de referência é possível identificar quais sequências mostram alterações no número de cópias (Jehee et al., 2011; Weise et al., 2012). Contudo, essa técnica não é apropriada para investigações cromossômicas em geral. Uma desvantagem significativa é a necessidade de testar pelo menos dez amostras em conjunto para reduzir os custos, uma vez que cinco controles normais são requeridos em cada reação. Esta característica da técnica de MLPA aumenta o tempo necessário para obtenção dos resultados. Além disso, esse método requer o uso de analisadores automatizados de DNA, que são caros para adquirir e manter (Vieira et al., 2013), e análises padrão de MLPA requerem uma quantidade mínima de 20 ng de DNA por amostra (Sørensen et al., 2010).

A técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi inicialmente estabelecida como um método para quantificação de diferentes níveis de expressão gênica. No entanto, sob a necessidade de verificar os resultados de aCGH, a qPCR está também sendo aplicada para detectar CNVs. A técnica de qPCR fornece uma medida quantitativa do número de cópias da região gênica de interesse. Dentre as principais limitações está o desenho de oligonucleotídeos iniciadores precisos, necessário para otimizar as condições da qPCR. Quando comparada às demais técnicas, a qPCR possui diversas vantagens como: baixo custo, rápida execução, menos laboriosa, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade (Weksberg et al. 2005; Chen et al. 2006b; Howald et al. 2006; Schubert and Laccone 2006; Hughes et al. 2007; Frigerio et al. 2011).

A identificação de anormalidades cromossômicas é importante porque fornece aos membros da família uma explicação sobre as causas que levaram seu filho a apresentar uma deficiência de desenvolvimento ou uma anomalia congênita, além de possibilitar um melhor aconselhamento genético sobre os riscos de recorrência e permitir a antecipação de certos problemas médicos que possam necessitar de intervenção (Shaffer e Bejjani, 2009).

#### **4.1.3- Genética e saúde pública no Brasil**

Durante as últimas décadas, ocorreu um progresso excepcional na genômica e biotecnologia. Atualmente, a genética representa uma das mais importantes áreas em desenvolvimento (Knoppers et al., 2010). A disponibilidade de uma grande variedade de técnicas para diagnóstico molecular, como as citadas anteriormente, tornam o teste genético e o aconselhamento genético práticas padrão para confirmar o diagnóstico de inúmeras doenças hereditárias (Gene Tests, 2011).

O Brasil é o quinto país mais populoso do mundo. O sistema público de saúde brasileiro, denominado Sistema Único de Saúde (SUS) atende a maioria da população. O SUS foi implementado em 1990 e baseia-se no acesso universal e igualitário aos serviços e procedimentos de cuidado com a saúde, assistência integral e controle social (Elias e Cohn, 2003). O SUS é um dos maiores sistemas públicos de saúde do mundo (Horovitz et al., 2013). Apesar da ampla cobertura do SUS, o acesso à avaliação e aconselhamento genético é restrito. Essa situação é semelhante à de muitos outros países em desenvolvimento e reflete a carência de geneticistas clínicos e de serviços genéticos no país. O acesso desigual aos serviços públicos de saúde e aos serviços de genética médica no Brasil já foi relatado na literatura médica (Marques-de-Faria et al., 2004; Horovitz et al., 2006; Travassos et al., 2006; Castilla e Luquetti, 2009; Horovitz et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2-3% 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). No Brasil, a prevalência total de doenças genéticas congênitas graves em recém-nascidos foi estimada ser de 57,2 a cada 1.000 nascimentos (Christianson et al., 2006). A deficiência intelectual está associada a muitas doenças genéticas e é considerada a principal causa de comprometimento posterior ao nascimento.

A deficiência intelectual é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns em crianças e adolescentes (Vasconcelos et al., 2004), afetando aproximadamente 3% da população mundial (Shaffer e Bejjani, 2009). O diagnóstico de DI é definido com base em três critérios (American Psychiatric Association, 1994): início do quadro clínico antes de 18 anos de idade; função intelectual significativamente abaixo da média, demonstrada por um quociente de inteligência (QI) igual ou menor a 70; e

deficiência nas habilidades adaptativas em pelo menos duas das seguintes áreas: comunicação, autocuidados, habilidades sociais/interpessoais, auto-orientação, rendimento escolar, trabalho, lazer, saúde e segurança. O QI normal é considerado acima de 85, e os indivíduos com um *score* de 71 a 84 são descritos como tendo função intelectual limítrofe (Ritney, 2003).

A deficiência intelectual é extremamente heterogênea em sua origem, provavelmente consistindo em várias síndromes (há mais de 50 síndromes de DI somente no cromossomo X). É uma das formas mais comuns de deficiência genética e é, de longe, o diagnóstico mais caro nos países industrializados (WHO, 2001). Fatores ambientais (agentes teratogênicos, hipóxia perinatal e infecções) e, principalmente, fatores genéticos tais como anormalidades cromossômicas e mutações pontuais em genes específicos têm sido associados como causadores desse fenótipo. No banco de dados OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) mais de 1.000 condições genéticas conhecidas têm a deficiência intelectual como um componente do fenótipo. Muitas dessas condições são desordens cromossômicas, isto é, síndromes que resultam de deleções ou translocações no genoma, e estão associadas a características como baixa estatura e outras anomalias congênitas (Grayton et al., 2012). Diversas síndromes de microdeleção conhecidas, de alta prevalência na população, possuem a DI como uma de suas principais características fenotípicas.

Dado que 20-50% dos casos de DI são causados por anormalidades cromossômicas (Shaffer e Bejjani, 2009), é altamente recomendado que, após o diagnóstico clínico, seja feita uma triagem molecular. Os exames genéticos e moleculares a serem solicitados incluem a pesquisa de microdeleções, de rearranjos e deleções subteloméricas e de mutações específicas em genes associados à DI (Vasconcelos, 2004).

Estima-se que no Brasil, a cada ano, surjam mais de 90.000 novos casos de DI (Pena, 2005; Pena, 2008). Incluindo o autismo, estes números crescem em 40-50%. A principal preocupação perante uma criança com DI e/ou autismo deve ser o diagnóstico preciso, indispensável para que se possa chegar a um tratamento específico, estabelecer um prognóstico clínico e de qualidade de vida, orientando os pais quanto à evolução da doença e eventuais complicações, e definir um prognóstico reprodutivo para a família com base no risco de recorrência em gestações futuras do casal (assim, é feito o aconselhamento genético). No Brasil, infelizmente, o diagnóstico etiológico da DI e/ou autismo é medicamente negligenciado devido a grande dificuldade de acesso às

metodologias citogenômicas modernas e só pode ser estabelecido em bem menos de 50% dos casos (Pena, 2005; Pena, 2008).

Além das dificuldades enfrentadas pela população para ter acesso à avaliação clínica de pacientes com suspeita de doenças genéticas, os testes laboratoriais nesta área também são limitados no Brasil. De acordo com Horovitz et al. (2003 e 2013), testes para diagnóstico genético estão disponíveis em 47 dos 66 serviços genéticos ligados ao SUS (71%). Embora o cariótipo seja o único teste genético fornecido pelos serviços públicos, ele está disponível apenas em alguns laboratórios, geralmente aqueles ligados às universidades, com recursos humanos limitados. Somente alguns laboratórios possuem equipamentos que permitem a realização de análises cromossômicas de alta resolução, FISH e testes de DNA (Marques-de-Faria et al., 2004; Horovitz et al., 2006). Laboratórios particulares oferecem uma variedade de testes para o diagnóstico de diversas doenças genéticas, mas somente uma minoria da população Brasileira tem condições financeiras de pagar por esses testes genéticos (WHO, 2006). Nos maiores serviços públicos de genética clínica, as condições mais frequentemente testadas são anormalidades cromossômicas, síndrome do X-Frágil e síndromes de microdeleção tais como Angelman, Prader-Willi, Williams-Beuren e velocardiofacial (Horovitz et al., 2013).

De acordo com Viana (2013), muitos pacientes com DI e/ou malformações, com forte suspeita clínica ou com diagnósticos clínicos ainda duvidosos, não podem contar com determinados exames genéticos através do SUS, que seriam importantes para confirmar o diagnóstico clínico. E dentre os pacientes que permanecem sem diagnóstico sintomático, muitos são suspeitos de apresentarem síndromes de microdeleção e aguardam a disponibilidade de exames moleculares para que o diagnóstico seja finalmente confirmado, permitindo planejamentos terapêuticos e reprodutivos mais seguros. A possibilidade do diagnóstico molecular de síndromes de microdeleção de alta prevalência na população e que levam à DI e a outros problemas de atraso no desenvolvimento neuropsicomotor resultaria em grande número de beneficiados.

Mas qual seria o método, dentre todos os disponíveis, mais adequado para implementação no SUS e, por extensão, nos serviços públicos de saúde de outros países em desenvolvimento?

Nos Estados Unidos e Europa, o método principal adotado para o diagnóstico genético de pacientes com DI, atraso no desenvolvimento e distúrbios do espectro do autismo é o aCGH, uma técnica muito dispendiosa. O custo de um exame por aCGH

considerando apenas reagentes de laboratório é de aproximadamente R\$ 1519,24 e, portanto, inadequado à realidade brasileira de recursos limitados (esse valor foi fornecido por um profissional que utiliza essa metodologia para o diagnóstico molecular de SMM). Além disso, o custo de um equipamento completo contendo o *scanner* utilizado para leitura dos microarranjos é de aproximadamente R\$ 420.000,00. Levando-se em conta a elevada prevalência de pacientes com DI no Brasil, seria inviável estabelecer este método como padrão de diagnóstico molecular, especialmente dentro do orçamento do SUS. Outra opção seria o método de FISH; no entanto, ele tem sido considerado uma técnica proibitivamente cara nos países em desenvolvimento (Jehee et al., 2011), principalmente porque essa técnica requer o uso de equipamentos de alto custo (aproximadamente R\$ 226.000,00 para o conjunto de equipamentos que compõem o sistema de captura de imagens). Recentemente, Vieira et al. (2013) utilizaram diferentes técnicas para o diagnóstico genético da síndrome de deleção 22q11 em um centro de referência em Campinas vinculado ao SUS (Rede de Referência no Tratamento de Deformidades Craniofaciais) e determinaram o custo de um exame por FISH e MLPA. Para cálculo dos custos foram considerados somente reagentes de laboratório e os gastos com o transporte das amostras a partir de diversas regiões brasileiras até o centro de referência. De acordo com esses autores, o custo de um exame por FISH foi de R\$ 258,71 usando o protocolo recomendado pelo fabricante e de R\$ 140,23 usando um protocolo adaptado (não descrito pelos autores). O custo de um exame por MLPA, incluindo a extração de DNA, foi de R\$ 158,22. Assim como a técnica de FISH, a MLPA também faz uso de um equipamento dispendioso, que é utilizado para realização de eletroforese capilar (aproximadamente R\$ 315.000,00), o que poderia ser um empecilho para sua escolha como método padrão de diagnóstico no Brasil e em outros países em desenvolvimento.

Diante desse cenário, o que fazer? A solução mais viável seria a utilização de uma técnica de baixo custo, mas que fosse ao mesmo tempo sensível e específica, permitindo que a população Brasileira e de outros países tenham acesso a um diagnóstico genético de qualidade nos serviços públicos de saúde. A técnica de qPCR satisfaz todas essas exigências e, por isso, nós a escolhemos.

A qPCR é considerada um método de diagnóstico loco-específico (*targeted diagnosis*), assim como FISH e MLPA. Ao contrário do aCGH que é uma técnica de diagnóstico amplo, direcionada a todo o genoma, técnicas *targeted* 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, como o Brasil, o diagnóstico loco-específico é mais viável, especialmente no sistema público. É mais sensato 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 cromossômica.

Outras vantagens apresentadas pela técnica de qPCR são: maior flexibilidade e adaptabilidade; rápida execução; menos laboriosa; e pode ser conduzida com um grande número de amostras em paralelo. Além disso, ela é considerada uma metodologia robusta, de fácil interpretação e simples de estabelecer em qualquer laboratório (Weksberg et al. 2005; Chen et al. 2006b; Howald et al. 2006; Schubert e Laccone 2006; Hughes et al. 2007; Frigerio et al. 2011).

No presente estudo, nós utilizamos a técnica de qPCR como um teste de triagem molecular para detecção de microdeleções associadas à síndrome velocardiofacial (síndrome de deleção 22q11), síndrome de Williams-Beuren e monossomia 1p36. A escolha dessas três síndromes justifica-se por serem síndromes de alta prevalência na população e por terem a DI e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor como importantes características fenotípicas.

Um breve relato sobre cada uma dessas três síndromes será feito abaixo, confirmando a importância de suas escolhas nesse trabalho.

#### **4.1.4- Síndrome velocardiofacial**

A síndrome velocardiofacial (VCFS; OMIM #192430), também conhecida como síndrome de DiGeorge (DGS; OMIM #188400) ou síndrome de deleção 22q11 (McDonald-McGinn e Sullivan, 2011), é a segunda doença genética mais comum depois da síndrome de Down (Bassett et al., 2011). O termo síndrome velocardiofacial refere-se aos tipos de sintomas que normalmente levam à apresentação clínica da síndrome: *velo* refere-se ao palato da boca, com as fissuras do palato sendo uma manifestação comum; *cardio* refere-se ao coração, sendo as anormalidades cardiovasculares outra característica da síndrome; e *facial* refere-se à face, pois os indivíduos afetados possuem uma aparência facial característica (Shprintzen et al., 1978). O termo síndrome de DiGeorge faz referência ao médico que inicialmente delineou a condição em meados de 1960 (Dodson et al., 1969). E o termo síndrome de deleção 22q11 refere-se à condição genética, pois essa síndrome é causada por

microdeleções hemizigóticas na banda q11.2 do cromossomo 22 humano (Shprintzen, 2008).

A incidência estimada da VCFS é de aproximadamente 1 a cada 4.000 nascimentos, tornando-a a síndrome de deleção intersticial mais comum em humanos (Scambler, 2000). Sua prevalência independe do sexo ou etnicidade (McDonald-McGinn e Sullivan, 2011). Na maioria dos casos relativos à VCFS as deleções ocorrem *de novo* (Shprintzen, 2008). Menos do que 10% dos indivíduos afetados herdam a deleção a partir de um dos pais, caracterizando-a como um tipo de herança autossômica dominante (Shprintzen et al., 1981; Williams et al., 1985).

A região 22q11.2 é caracterizada pela presença de LCRs, o que a torna particularmente susceptível a ser alvo de deleções/duplicações durante a meiose (Bittel et al., 2009; Portnoi, 2009). Quatro blocos de LCRs (LCR A, LCR B, LCR C e LCR D) são encontrados nessa região e cada bloco é constituído por repetições múltiplas. A deleção surge, tipicamente, devido a um evento de recombinação meiótica desigual (recombinação homóloga não alélica), que pode estar associado ao pareamento errado das LCRs durante a meiose, resultando em *crossing-over* desigual. Esse mecanismo prediz que as deleções e duplicações poderiam ocorrer em frequências iguais. Entretanto, o que se vê na prática é que as deleções ocorrem em uma frequência duas vezes maior que as duplicações (McDonald-McGinn e Sullivan, 2011). Existem relatos de indivíduos com algumas características da VCFS que apresentam microduplicações na região 22q11.2 (Ensenauer et al., 2003)

A maioria dos indivíduos com VCFS (aproximadamente 90%) apresenta deleções de 3 Mb, compreendendo aproximadamente 60 genes, a qual ocorre entre as LCRs A e D, sendo frequentemente referida como região tipicamente deletada. Aproximadamente 8% possuem deleções de 1,5 Mb, contendo cerca de 28 genes e ocorrendo entre as LCRs A e B (Scambler 2000; Shaikh et al., 2000; Shprintzen, 2008; Michaelovsky et al., 2012). Aproximadamente 2% apresentam deleções atípicas, de tamanho menor e em localizações variáveis (Urban et al., 2006). Sugerem-se que as deleções de 1,5 Mb contêm todos os genes cruciais para a etiologia da síndrome (Carlson et al., 1997) e, em particular, para o aumento no risco de desenvolvimento de doenças psiquiátricas (Karayiorgou et al., 1995).

O fenótipo associado às microdeleções 22q11.2 é altamente variável e envolve diversos órgãos. Existem mais de 180 características clínicas distintas associadas à VCFS, tanto do ponto de vista físico quanto comportamental. No entanto, nenhuma

delas é patognomônica ou mesmo obrigatória, o que acaba dificultando o seu diagnóstico clínico (Thomas e Graham, 1997; Robin e Shprintzen, 2005). Assim, a realização de uma avaliação clínica detalhada associada a um teste genético são fundamentais para a identificação dos indivíduos afetados (Koshiyama et al., 2009). Vários casos podem resultar em morte neonatal, enquanto indivíduos levemente afetados podem permanecer sem diagnóstico até mesmo quando adultos (Bales et al., 2010). Um número considerável de fatores pode contribuir para a variabilidade fenotípica observada em indivíduos com VCFS como, por exemplo, a presença de polimorfismos nos genes localizados na região 22q11.2 no cromossomo não-deletado. É também provável que exista uma interação *upstream* e *downstream* entre os genes na região deletada e genes localizados em outra região do genoma (Shprintzen, 2008). Além disso, essa variabilidade também pode ser causada pela heterogeneidade nos pontos de quebra cromossômicos (Drew et al., 2011). Não existe correlação entre a severidade do fenótipo e o tamanho da deleção (Carlson et al., 1997).

As características clínicas mais comuns associadas às microdeleções 22q11.2 incluem: anormalidades cardíacas, principalmente malformações conotrunciais, que ocorrem em aproximadamente 74-80% dos indivíduos afetados; anormalidades do palato, que são relatadas em 49-69% dos pacientes, sendo a insuficiência velofaríngea a anomalia mais frequente; alterações imunológicas, encontradas em aproximadamente 80% dos pacientes, com doenças autoimunes presentes em 10-20%; hipocalcemia; anomalias renais; hiperprolinemia; problemas de alimentação; dificuldades de aprendizagem; distúrbios psiquiátricos (ex: psicose, esquizofrenia); problemas comportamentais (ex: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, transtorno obsessivo-compulsivo); autismo e distúrbios do espectro do autismo (frequência de 14-45%); atraso no desenvolvimento, com aproximadamente 80% dos pacientes apresentando atraso motor e atraso nas habilidades da fala e da linguagem; fala hipernasal, presente em 75% dos indivíduos afetados; e baixa estatura. Estima-se que a DI ocorra em menos de 50% dos casos. A DI é geralmente leve, com menos de 1% de todos os pacientes apresentando DI grave, e cerca de 7% com DI moderada. Outras características menos frequentes também são relatadas, incluindo perda auditiva e anomalias do esqueleto (Ryan et al., 1997; Scambler, 2000; Jawad et al., 2001; Gennery et al., 2002; Perez e Sullivan, 2002; Goldmuntz, 2005; Vorstman et al., 2006; Antshel et al., 2007; Hay, 2007; Hughes et al., 2007; Kobrynski e Sullivan, 2007; Shprintzen, 2008; Drew et al., 2011; McDonald-McGinn e Sullivan, 2011). A deleção 22q11.2 é a



segunda causa mais comum de atraso no desenvolvimento e de doenças cardíacas congênitas depois da síndrome de Down, o que representa aproximadamente 2,4% dos indivíduos com deficiência de desenvolvimento e cerca de 10-15% dos pacientes com tetralogia de Fallot (Bassett et al., 2011).

Uma face "típica" tem sido descrita na maioria dos pacientes com VCFS, caracterizada por rosto comprido, pálpebras encobertas (pálpebras que são parcialmente cobertas por pele quando os olhos estão abertos, devido à configuração da estrutura óssea), hélice da orelha amassada, hipertelorismo, fissuras palpebrais curtas, nariz com raiz e ponte nasal altas ou, ocasionalmente, um nariz tubular com ponta bulbosa e retrognatia (Boorman et al., 2001; Cuneo, 2001; Brunet et al., 2006; Hay, 2007).

Pacientes com deleções atípicas na região 22q11.2 apresentam doenças cardíacas, anormalidades do palato, problemas renais, disfunção endócrina e atraso no desenvolvimento (McDonald-McGinn e Sullivan, 2011).

Pacientes com microduplicações na região 22q11.2 parecem ter um fenótipo menos severo do que os indivíduos portadores de microdeleções. A característica fenotípica mais notável em pacientes com microduplicações é o atraso no desenvolvimento. Doenças cardíacas, anomalias do palato e hipocalcemia são observadas com a mesma frequência (McDonald-McGinn e Sullivan, 2011).

Sugere-se que um pequeno número de genes contribua para a maior parte dos efeitos fenotípicos da deleção, mas que, em algum nível, alguma forma de interação sinérgica entre estes genes esteja ocorrendo para aumentar substancialmente o risco da síndrome (Karayiorgou e Gogos, 2004; Karayiorgou et al., 2010). Embora um ou alguns locos possam ter um maior impacto fenotípico, é o desbalanço de vários genes deletados que determina o fenótipo global. A presença de modificadores genéticos adicionais pode também contribuir para a variabilidade dos fenótipos cognitivos e psiquiátricos da síndrome.

Atualmente, em termos mundiais, o principal método usado para o diagnóstico molecular da VCFS é o aCGH (Urban et al., 2006; Bittel et al., 2009). O método de FISH ainda é amplamente utilizado em alguns países, sendo capaz de detectar a maioria dos pacientes afetados (85-90%) (Ruiter et al., 2003; Hughes et al., 2007; Shprintzen, 2008). Nesse caso são analisados cromossomos em metáfase utilizando sondas específicas para o gene *TUPLE1* ou *N25* (Sørensen et al., 2010). Nos últimos anos, outras técnicas também foram desenvolvidas para detectar microdeleções

22q11.2: MLPA (Fernández et al., 2005; Vorstman et al., 2006; Jalali et al., 2008), qPCR (Weksberg et al., 2005), dentre outras.

As principais vantagens na detecção precoce da VCFS são o reconhecimento e o tratamento antecipados dos problemas associados, tais como as anormalidades cardíacas. Até mesmo os problemas que não necessitam de tratamento imediato podem se beneficiar de um diagnóstico precoce. Por exemplo, problemas de aprendizagem são uma característica quase uniforme da VCFS, e um diagnóstico antecipado poderia ser útil para garantir serviços de educação especial adequados para estas crianças, importante para assegurar que esses pacientes alcancem seu potencial mais elevado. O diagnóstico precoce poderia ajudar com outros problemas, tais como dificuldades de alimentação ou doenças mentais, por razões semelhantes. Se os pais estão conscientes de que certos problemas podem ocorrer como resultado da síndrome e têm conhecimento de quais terapias estão disponíveis, eles poderão ser mais aptos a reconhecer estes problemas e procurar ajuda de uma maneira oportuna. Além de melhorar o tratamento de crianças afetadas, a triagem genética também poderia fornecer informações importantes para as famílias. O aconselhamento genético é importante para que os pais compreendam o diagnóstico e suas implicações (Bales et al., 2010).

#### **4.1.5- Síndrome de Williams-Beuren**

A síndrome de Williams-Beuren (WBS; OMIM #194050) é um dos distúrbios genômicos melhor caracterizado, sendo causada por uma deleção hemizigótica de genes contíguos na banda q11.23 do cromossomo 7, compreendendo aproximadamente 28 genes. Sua incidência é de 1 a cada 7.500/10.000 nascimentos (Strømme et al., 2002). A WBS ocorre *de novo* em praticamente todos os casos (Poerber, 2010); entretanto, alguns poucos relatos de herança autossômica dominante são descritos na literatura (Sadler et al., 1993; Metcalfe et al., 2005).

A região de deleção 7q11.23 é constituída por uma “região de gene de cópia única” (*single copy gene region*) de aproximadamente 1,2 Mb, flanqueada por LCRs que estão organizadas em blocos A, B e C. Esses blocos são agrupados em complexos localizados na parte centromérica (cen), medial (med) e telomérica (tel) da região 7q11.23. Cada um desses complexos tem um tamanho de aproximadamente 320 kb e é formado por um bloco LCR A, B e C (A-B-C cen, A-B-C med, A-B-C tel). Os blocos LCR são formados, principalmente, por cópias truncadas de genes, codificando para

pseudogenes, além de alguns genes que são transcricionalmente ativos. A “região de gene de cópia única” está localizada entre os blocos LCR C-med e B-med (Bayés et al., 2003; Schubert et al., 2009; Merla et al., 2010). Bailey et al. (2003) comprovaram a presença de sequências *Alu* entre os blocos LCR. As sequências *Alu* são “elementos repetitivos nucleares intercalados de sequência curta” (SINE – *Repetitive Short Interspersed Nuclear Elements*) que possuem menos de 500 pb. Supõe-se que os elementos *Alu* predispõem os blocos LCR para eventos de recombinação homóloga, podendo resultar em duplicações, deleções e translocações (Batzler e Deininger, 2002).

As deleções na região 7q11.23 surgem como uma consequência de um alinhamento errado dos cromossomos durante a meiose, o que ocorre devido à alta similaridade de sequência dos blocos LCR, resultando em *crossing-over* desigual (recombinação homóloga não alélica) (Schubert et al., 2009). Cerca de 5% do genoma humano contém LCRs com tamanhos relativamente grandes (> 10 kb) e com alta identidade de sequência (> 95%) (Lander et al., 2001). Sugere-se que regiões de alta similaridade sejam necessárias para facilitar a ocorrência de recombinação homóloga não alélica (Stankiewicz e Lupski, 2002; Inoue e Lupski, 2002). A recombinação inter-cromossomal ou inter-cromátide, envolvendo diferentes blocos LCR com alta identidade de sequência, ocasiona uma deleção e uma duplicação recíproca da região genômica localizada entre os blocos LCR. A recombinação intra-cromátide produz uma deleção e um cromossomo acêntrico circular recíproco (Schubert et al., 2009).

Aproximadamente 95% dos pacientes com WBS apresentam uma deleção de aproximadamente 1,55 Mb causada por um evento de recombinação meiótica desigual entre os blocos LCR B-cen e B-med. Essa região comumente deletada é denominada região crítica da síndrome de Williams-Beuren. Cerca de 3-5% dos indivíduos afetados possuem uma deleção de aproximadamente 1,84 Mb resultante da recombinação desigual entre os blocos LCR A-cen e A-med. Pacientes com deleções atípicas representam de 2-3% do total de indivíduos afetados e possuem deleções de tamanhos parciais (~0,2 Mb a ~2,5 Mb) (Schubert e Laccone, 2006; Etokebe et al., 2008; Schubert et al., 2009).

Os rearranjos envolvendo predominantemente os blocos B-cen e B-med podem ser explicados por dois fatores: a identidade de sequência entre os blocos B-cen e B-med (99,6%) é superior quando comparada à dos blocos A-cen e A-med (98,2%); o tamanho dos blocos B-cen e B-med é menor quando comparado ao tamanho dos blocos A-cen e A-med (Merla et al., 2010). Estudos indicaram que 66,7% das microdeleções

surtem a partir de eventos de recombinação inter-cromossomal desigual, enquanto os rearranjos intra-cromátide ocorrem em 33,3% dos casos (Cuscó et al., 2008). O sequenciamento específico de pontos de quebra na região 7q11.23 em amostras de sêmen revelou que a recombinação inter-cromátide é menos frequente que a recombinação intra-cromátide ou inter-cromossomal (Schubert et al., 2009). Turner et al. (2008), em um estudo também envolvendo amostras de sêmen, verificaram as taxas de microdeleção e microduplicação na região 7q11.23 e observaram que as deleções são geradas em uma taxa superior, mostrando uma razão de microdeleção-microduplicação de 2:1.

Alguns estudos relatam a existência de pacientes com características da WBS apresentando microduplicações na região 7q11.23 (Berg et al., 2007; Merritt e Lindor, 2008; Orellana et al., 2008; Torniero et al., 2008). No entanto, o primeiro relato de um paciente com microduplicação nessa região somente ocorreu em 2005 (Somerville et al., 2005). O tamanho das microduplicações é de aproximadamente 1,5 Mb, podendo existir duplicações maiores e menores. Supõe-se que as microduplicações sejam geradas a partir do mesmo evento de recombinação meiótica desigual que origina as microdeleções na região 7q11.23 (Berg et al., 2007; Schubert et al., 2009), sendo que a recombinação inter-cromossomal parece ser o mecanismo mais comum responsável pela origem das microduplicações (Hannes et al., 2009).

A inversão da região 7q11.23 é encontrada em 27% dos indivíduos afetados e em 33% dos pais que transmitem a herança genética (Osborne et al., 2001). Os pais portadores de inversão na região 7q11.23 apresentam pontos de quebra externos à “região de gene de cópia única”, o que não interrompe qualquer gene ativamente expresso (Osborne et al., 2001; Bayés et al., 2003). A inversão é considerada um polimorfismo benigno porque os seus portadores são fenotipicamente normais (Tam et al., 2008). Entretanto, indivíduos portadores de inversão na região 7q11.23 apresentam risco para geração de gametas possuindo uma microdeleção, porque a inversão aumenta a probabilidade de pareamentos errados durante a meiose (Scherer et al., 2005; Tam et al., 2008).

As características clínicas apresentadas por indivíduos portadores de microdeleções na região 7q11.23 são relativamente diferentes daquelas apresentadas por pacientes carregando microduplicações. As principais características fenotípicas associadas às microdeleções 7q11.23 incluem: anormalidades cardiovasculares (aproximadamente 60-84%), com a estenose aórtica supra-avicular sendo a anomalia

mais comum; anormalidades do tecido conectivo (ex: pele frouxa); dismorfismo facial (ex: testa larga, ponte nasal plana, ponta do nariz arrebitada, bochechas cheias, lábios grossos e boca larga); problemas de crescimento (ex: baixa estatura); problemas endócrinos (ex: hipotireoidismo em 2-40% dos casos); problemas cognitivos e neurocomportamentais; leve a moderada deficiência intelectual; transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (> 50%) e autismo. Além disso, esses indivíduos apresentam severo déficit de construção viso-espacial, o que contrasta com uma relativa capacidade de linguagem verbal e uma extraordinária hipersociabilidade, embora essa última característica esteja muitas vezes associada à ansiedade e depressão (Klein-Tasman e Mervis, 2003; Tassabehji, 2003; Leyfer et al., 2006; Ferrero et al., 2007; Pober et al., 2008; Collins et al., 2010; Merla et al., 2010; Pober, 2010; Delio et al., 2013).

Por outro lado, a apresentação clínica dos pacientes portadores de microduplicações na região 7q11.23 é mais branda, com dismorfismo facial menos característico quando comparado ao dos pacientes que apresentam microdeleções (Merla et al., 2010). O crescimento parece ser normal na maioria dos casos (Merla et al., 2010), hipotonia e epilepsia são os problemas neurológicos mais frequentes (Van der Aa et al., 2009) e existem poucos relatos de anormalidades cardiovasculares (Berg et al., 2007). Há um aumento no predomínio de autismo e também é observado transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Berg et al., 2007; Van der Aa et al., 2009). As características mais marcantes desse grupo de pacientes e que contrastam com os indivíduos portadores de microdeleções são: bom desenvolvimento das habilidades viso-espaciais e atraso no desenvolvimento, caracterizado por um significativo prejuízo da linguagem verbal (Mervis e Klein-Tasman, 2000).

Em termos mundiais, o método de aCGH é o mais utilizado para o diagnóstico molecular da WBS. A técnica de FISH ainda é amplamente usada em determinados países e, nesse caso, são analisados cromossomos em metáfase utilizando sondas específicas para o gene da elastina. Outras técnicas também estão sendo usadas para o diagnóstico molecular da WBS, tais como MLPA e qPCR (Kriek et al., 2007; van Hagen et al., 2007; Cho et al., 2009; Merla et al., 2010). A confirmação da suspeita clínica é essencial para o monitoramento clínico do paciente e aconselhamento genético da família.

#### 4.1.6- Monossomia 1p36

A monossomia 1p36, descrita pela primeira vez por Shapira et al. (1997), se origina a partir de uma deleção heterozigótica da banda mais distal do braço curto do cromossomo 1. Sua incidência é de aproximadamente 1 a cada 5.000 nascimentos, sendo considerada a síndrome de deleção terminal mais comum observada em humanos (Heilstedt et al., 2003a; Gajecka et al., 2007; Rosenfeld et al., 2010). Aproximadamente 95% das deleções associadas à monossomia 1p36 ocorrem *de novo* (Gajecka et al., 2007). A frequência de ocorrência dessa síndrome é a mesma em homens e mulheres e em todos os grupos étnicos (Gajecka et al., 2007). O tamanho das deleções varia de aproximadamente 0,2 Mb a 11 Mb (Heilstedt et al., 2003b; Yu et al., 2003; Ballif et al., 2007; D'Angelo et al., 2010; Rosenfeld et al., 2010; Buck et al., 2011). No entanto, deleções pequenas são atípicas; a maioria dos pacientes com monossomia 1p36 têm deleções terminais grandes (Rosenfeld et al., 2010). Deleções terminais são as mais comuns e estão associadas às características clássicas da monossomia 1p36 (Heilstedt et al., 2003b). Estudos mostram que a maioria das deleções 1p36 são encontradas dentro dos primeiros 4-5 Mb a partir do telômero 1p (Heilstedt et al., 2003b; Ballif et al., 2007; Gajecka et al., 2007).

Quatro classes de rearranjos foram identificadas na monossomia 1p36: deleção terminal aparentemente pura (52%), deleção intersticial (29%), rearranjos complexos (12%) e translocações desbalanceadas (7%) (Shaffer et al., 2006; Ballif et al., 2007; Gajecka et al., 2007). A deleção terminal aparentemente pura é o tipo de rearranjo menos complexo, em que ocorre a perda do segmento mais distal da região 1p36. Entretanto, os pontos de quebra de muitas deleções terminais ainda não foram completamente caracterizados e acredita-se que elas sejam mais complexas em relação ao nível de sequência de DNA. As deleções intersticiais são caracterizadas pela ocorrência de duas quebras próximas ao telômero na região 1p36, resultando na retenção do telômero e na deleção de um segmento próximo a essa região. Os rearranjos complexos incluem deleções com duplicações, triplicações, inversões e/ou inserções. As translocações desbalanceadas resultam em um cromossomo 1 com um segmento deletado de 1p36 (monossomia parcial) e uma região de outro cromossomo presa à extremidade distal de 1p (trissomia parcial) (Gajecka et al., 2007).

Segundo Heilstedt et al. (2003b), se todos os quatro tipos de rearranjos forem considerados, 65% das deleções ocorrem em cromossomos derivados matematicamente e

35% ocorrem em cromossomos derivados paternalmente. Gajecka et al. (2007), em um estudo mais detalhado, verificaram que 46,3% das deleções terminais aparentemente puras são de origem materna, 41,5% são de origem paterna e 12,2% apresentaram origem desconhecida. Considerando as deleções intersticiais, 83,3% foram originadas do cromossomo materno. A maioria das deleções derivadas maternalmente são menores que 5 Mb, ao passo que a maioria das deleções originadas paternalmente são maiores que 5 Mb (Heilstedt et al., 2003b; Gajecka et al., 2007).

Vários mecanismos podem estar envolvidos na geração e/ou estabilização dos rearranjos na região 1p36, e o principal mecanismo de estabilização das deleções 1p36 terminais parecem ser ciclos de quebra-fusão-ponte (*breakage-fusion-bridge cycles*) (Ballif et al., 2003). Em 2007, Gajecka et al. analisaram pontos de quebra na região 1p36 em quatro indivíduos com deleções de tamanhos distintos. Todos os quatro pontos de quebra estavam localizados dentro de elementos de sequência repetitiva do DNA (LINE – *Long Interspersed Nucleotide Elements*; SINE – *Repetitive Short Interspersed Nuclear Elements*; etc.). Isso sugere que elementos de sequência repetitiva também possam ter um papel importante na geração e/ou estabilização das deleções terminais associadas à monossomia 1p36. A recombinação homóloga aberrante entre elementos de sequência repetitiva similares seria um possível mecanismo que poderia explicar a formação e estabilização das deleções terminais (Flint et al., 1996; Gajecka et al., 2007).

Indivíduos com monossomia 1p36 possuem características clínicas uniformes, apresentando um dismorfismo facial característico: fontanelas anteriores grandes de fechamento tardio; microcefalia; braquicefalia; olhos pequenos e profundos; sobrancelhas retas; nariz e ponte nasal achatados; queixo pontudo; orelhas pequenas e mais abaixo ou em posição assimétrica; hipoplasia da face média; boca pequena com os cantos para baixo; fissuras orofaciais envolvendo os lábios e/ou palato (lábio leporino - fenda palatina); entre outras características (Heilstedt et al., 2003b; Battaglia, 2005; Gajecka et al., 2007, Rosenfeld et al., 2010). Todos os indivíduos apresentam atraso no desenvolvimento e deficiência intelectual, com a última variando principalmente de moderada à grave (Shapira et al., 1997; Heilstedt et al., 2003b; Gajecka et al., 2007). A monossomia 1p36 é responsável por até 0,5-0,7% dos casos de deficiência intelectual idiopática (Giraudeau et al., 2001). As habilidades de linguagem são geralmente prejudicadas, com atrasos na fala sendo relatados em grande parte dos pacientes. Acima de 50% apresentam hipotonia muscular, dificuldades de alimentação e epilepsia, com 55% mostrando comportamento auto-abusivo (Heilstedt et al., 2003b; Gajecka et al.,

2007). Problemas cardíacos estruturais ocorrem em aproximadamente 50% dos indivíduos afetados, sendo também observada a presença de cardiomiopatia em menor frequência (Heilstedt et al., 2003b). Outras características clínicas incluem: problemas auditivos, atraso no crescimento, problemas oftalmológicos (estrabismo) e falta de atenção visual (Battaglia, 2005; Gajecka et al., 2007).

Os fenótipos similares observados em pacientes com diferentes tamanhos de deleções e a natureza rica em genes da banda cromossomal 1p36 têm tornado as correlações genótipo-fenótipo difíceis. Existe uma acentuada variabilidade nas deleções, sem localização de pontos de quebra ou tamanhos de deleção comuns (Heilstedt et al., 2003b). Gajecka et al. (2007) demonstraram que não existe correlação entre o tamanho da deleção e o número de características clínicas observadas em pacientes com monossomia 1p36. Até mesmo indivíduos com deleções relativamente pequenas (< 3,0 Mb) podem apresentar a maioria das características relacionadas à essa síndrome (Gajecka et al., 2007). Isso pode indicar que grande parte dos genes associados ao fenótipo da monossomia 1p36 estejam localizados na extremidade distal do cromossomo 1 que é deletada na maioria dos pacientes (Zenker et al., 2002), consistente com uma síndrome de deleção de genes contíguos. Por outro lado, Redon et al. (2005) sugerem que o fenótipo associado à monossomia 1p36 possa ser causado por um efeito de posição. Esses autores relataram o caso de dois pacientes com monossomia 1p36 apresentando características clínicas muito similares e que, no entanto, não tiveram sobreposição das deleções.

As técnicas utilizadas para o diagnóstico molecular da monossomia 1p36 incluem análises citogenéticas, FISH e aCGH (Gajecka et al., 2007), sendo que atualmente o método de aCGH é o mais amplamente usado.

Até o momento, nenhum estudo foi publicado utilizando a técnica de qPCR para a triagem molecular de pacientes com monossomia 1p36. Além disso, os estudos correspondentes à VCFS (Weksberg et al. 2005; Chen et al. 2006b; Weksberg et al. 2007; Frigerio et al. 2011) e à WBS (Howald et al. 2006; Schubert e Laccone, 2006) que utilizaram a técnica de qPCR fizeram uso de um número relativamente grande de marcadores, localizados dentro e ao redor da região crítica de deleção de cada síndrome. Isso porque os objetivos finais eram diversos, desde a detecção e determinação dos tamanhos das deleções, até o mapeamento dos pontos de quebra cromossômicos e estudos de correlação fenótipo-genótipo. Por isso, para direcionar o uso da técnica de qPCR para o nosso objetivo, nós utilizamos, no presente estudo, um número reduzido



de marcadores, todos localizados dentro da região comumente deletada de cada síndrome (região onde está localizada a maioria das deleções), possibilitando a identificação da maioria dos pacientes afetados.

## 4.2- Objetivos específicos

- Desenhar e/ou selecionar a partir da literatura sequências de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes alvo e de referência;
- Confirmar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores, analisar a curva de dissociação (*melting curve*), determinar a concentração ótima de cada iniciador e calcular a eficiência de amplificação dos genes alvo e de referência;
- Fazer ensaios de qPCR utilizando o DNA de indivíduos controles normais e de pacientes que apresentam características clínicas sugestivas das síndromes de microdeleção escolhidas;
- Calcular a alteração no número de cópias alélicas ( $\Delta KC_t$ ) de cada marcador (Weksberg et al., 2005; Hughes et al., 2007), fazer análises estatísticas utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), e calcular o custo de um teste de triagem molecular por qPCR.

## **4.3- Material e Métodos**

### **4.3.1- Indivíduos e avaliação clínica**

No estudo da síndrome velocardiocfacial, um total de 50 controles normais (25 do sexo masculino e 25 do sexo feminino) e 25 pacientes com suspeita clínica da síndrome (15 do sexo masculino e 10 do sexo feminino) foram avaliados. Os principais sinais clínicos observados nestes pacientes incluíram: autismo, TDAH, fissura de lábio e/ou palato, doença cardíaca congênita, dismorfismo facial, fala hipernasal, dificuldades de aprendizagem, microcefalia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, insuficiência velofaríngea, convulsões, deficiência intelectual, baixa estatura e atraso nas habilidades da fala e da linguagem.

No estudo da síndrome de Williams-Beuren, 50 controles normais (os mesmos utilizados no estudo da VCFS) e 28 pacientes com suspeita clínica da síndrome (16 do sexo masculino e 12 do sexo feminino) foram avaliados. Os principais sinais clínicos observados nestes pacientes foram: ansiedade e fobias, traços de personalidade obsessivo-compulsiva, TDAH, anormalidades cardiovasculares (ex: estenose aórtica supra-avalvular), clinodactilia do quinto dedo, anormalidades do tecido conjuntivo, microsomia craniofacial, dismorfismo facial, personalidade "amigável", voz rouca, dificuldade de aprendizagem, deficiência intelectual, microcefalia, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, sobrepeso, estenose pulmonar, convulsões, baixa estatura e alteração na acuidade visual.

A etapa de avaliação clínica dos pacientes com suspeita de VCFS ou WBS foi feita no laboratório GENE - Núcleo de Genética Médica e no Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), localizados na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

No estudo da monossomia 1p36, 50 controles normais (os mesmos utilizados no estudo da VCFS e da WBS) e 39 pacientes com suspeita clínica da síndrome (11 do sexo masculino e 29 do sexo feminino) foram avaliados. Os principais sinais clínicos observados nestes pacientes incluíram: autismo, atraso no desenvolvimento, dismorfismo facial, problemas cardíacos, hiperlipidemia, hipotonia, deficiência intelectual, anomalias congênicas múltiplas, convulsões e baixa estatura.

A avaliação clínica dos pacientes com suspeita de monossomia 1p36 foi realizada no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP), localizado na cidade de São Paulo, Brasil, e por médicos nos Estados Unidos, Canadá e Israel.

#### **4.3.2- Extração e quantificação de DNA**

O DNA genômico foi isolado a partir de linfócitos do sangue periférico e de *swab* bucal utilizando o método de *salting-out* (Lahiri e Nurnberger Junior, 1991) ou através de sistemas de extração automatizados: *Autopure LS*<sup>®</sup> (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN) e *Qiagen M48 Biorobot* (Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA).

Para os ensaios de qPCR, as amostras de DNA foram quantificadas através de experimentos de eletroforese em gel de agarose. Uma alíquota de 1 µL de cada amostra de DNA foi misturada a 5 µL de tampão de corrida 2X (0,25% de xilenocianol, 0,25% de azul de bromofenol e 30% de glicerol). O volume final foi aplicado em gel de agarose 0,8%, corado com *GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain* (Biotinum Inc; Hayward, CA, USA), junto com diferentes padrões de concentração (variando de 1 a 100 ng/µL). A corrida eletroforética foi realizada a 80 volts em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mM, pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) e o resultado visualizado sob luz ultravioleta. Após a quantificação, o DNA foi diluído em água *nuclease-free* para uma concentração final de 10 ng/µL.

#### **4.3.3- Diagnóstico molecular**

Todos os pacientes que apresentavam características clínicas sugestivas das síndromes de microdeleção em estudo foram previamente diagnosticados utilizando as seguintes técnicas: aCGH, FISH, marcadores microssatélites, MLPA e/ou *Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR* (MQF-PCR). O método de MQF-PCR foi recentemente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa para a detecção de microdeleções/microduplicações cromossômicas (Stofanko et al., 2013).

O diagnóstico molecular dos 25 pacientes com suspeita clínica da VCFS foi feito inicialmente por estudos de perda de heterozigosidade de três microssatélites localizados na região crítica da síndrome de deleção 22q11: *D22S264* (Marineau et al., 1992), *D22S941* e *D22S944* (Morrow et al., 1995), que são polimorfismos de repetição

CA. Posteriormente, o método de MQF-PCR (Stofanko et al., 2013) foi utilizado para confirmação dos resultados. Após o diagnóstico molecular, os 25 pacientes foram separados em dois grupos: VCFS\_Grupo 1 e VCFS\_Grupo 2. O primeiro é formado por 9 pacientes que apresentaram microdeleções na região 22q11.2 (7 do sexo masculino e 2 do sexo feminino), e o segundo é constituído por 16 pacientes que não apresentaram anormalidades genéticas na região 22q11.2 por ambas as técnicas (8 do sexo masculino e 8 do sexo feminino). A classificação dos indivíduos participantes em VCFS\_Controles Normais (formado pelos 50 controles normais), VCFS\_Grupo 1 e VCFS\_Grupo 2 foi utilizada na etapa de qPCR.

O diagnóstico molecular de 27 pacientes com suspeita clínica da WBS foi feito por estudos de perda de heterozigidade de quatro microssatélites localizados na região crítica da síndrome de Williams-Beuren: um polimorfismo correspondente ao tetranucleotídeo CCTT no gene *ELN* (Urbán et al., 1997) e três polimorfismos de repetição CA localizados nos genes *ELN* (Foster et al., 1993), *LIMK1* (Mari et al., 1998) e *D7S1870* (Gilbert-Dussardier et al., 1995). Um paciente teve o diagnóstico molecular determinado por aCGH, usando *Agilent SurePrint G3 4x180k array* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Para todos os 28 pacientes, o método de MQF-PCR (Stofanko et al., 2013) foi utilizado para confirmação dos resultados. Após o diagnóstico molecular, os 28 pacientes foram separados em dois grupos: WBS\_Grupo 1 e WBS\_Grupo 2. O primeiro é formado por 18 pacientes que apresentaram microdeleções na região 7q11.23 (9 do sexo masculino e 9 do sexo feminino), e o segundo é constituído por 10 pacientes sem anormalidades genéticas na região 7q11.23 de acordo com os métodos utilizados (7 do sexo masculino e 3 do sexo feminino). A classificação dos indivíduos participantes em WBS\_Controles Normais (formado pelos 50 controles normais), WBS\_Grupo 1 e WBS\_Grupo 2 foi utilizada na etapa de qPCR.

O diagnóstico molecular de dez dos trinta e nove pacientes com suspeita clínica de monossomia 1p36 (4 do sexo masculino e 6 do sexo feminino) foi realizado por FISH e/ou MLPA, de acordo com métodos previamente descritos (D'Angelo et al., 2010) e com a inclusão do *kit SALSA MLPA P070 Human Telomere-5 probemix* (MRC-Holland, [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)). Para os demais pacientes (8 do sexo masculino e 21 do sexo feminino), o diagnóstico molecular foi feito por aCGH. Algumas amostras foram testadas utilizando microarranjos de genoma inteiro, baseados em cromossomos artificiais de bactérias (SignatureChipWG, Signature Genomic Laboratories, Spokane, Washington, USA), de acordo com métodos previamente descritos (Ballif et al. 2008a).

Outras amostras foram testadas usando microarranjos de genoma inteiro, baseados em oligonucleotídeos customizados por *Signature Genomics* (SignatureChipOS, ou a versão 1, um arranjo 105K fabricado por Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA, ou a versão 2, um arranjo 135K fabricado por Roche NimbleGen, Madison, Wisconsin, USA), de acordo com métodos previamente descritos (Ballif et al., 2008b; Duker et al., 2010). Todos os 39 pacientes apresentaram microdeleções na região 1p36 e foram reunidos em um único grupo (1p36\_Grupo 1). A classificação dos indivíduos participantes em 1p36\_Controles Normais (formado pelos 50 controles normais) e 1p36\_Grupo 1 foi utilizada na etapa de qPCR.

A classificação dos pacientes em Grupo 1 e Grupo 2 foi feita exclusivamente para facilitar a descrição e explicação dos resultados obtidos por qPCR. Isso porque para 17 pacientes com suspeita clínica da VCFS (1 paciente do VCFS\_Grupo 1 e 16 pacientes do VCFS\_Grupo 2), para 21 pacientes com suspeita clínica da WBS (11 pacientes do WBS\_Grupo 1 e 10 pacientes do WBS\_Grupo 2) e para os 39 pacientes com características clínicas da monossomia 1p36, os ensaios de qPCR foram realizados como teste “cego”.

O diagnóstico molecular dos pacientes participantes desse estudo foi realizado em laboratórios do Brasil e dos Estados Unidos. No Brasil, essa etapa foi feita no laboratório GENE - Núcleo de Genética Médica (Belo Horizonte, Minas Gerais) e na Unidade de Aconselhamento Genético do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, USP, São Paulo). Nos Estados Unidos, os laboratórios participantes foram *Signature Genomic Laboratories* (Spokane, Washington, USA) e *Cytogenetics and Molecular Diagnostics Laboratory* (University of Miami, Miami, Florida, USA).

A triagem molecular de todos os indivíduos participantes por qPCR foi realizada no laboratório GENE - Núcleo de Genética Médica (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

#### **4.3.4- Declaração de ética**

Um consentimento escrito assinado pelo pai ou responsável foi obtido para uso do material genético de trinta e oito pacientes com suspeita clínica da VCFS ou WBS, cuja avaliação médica foi feita no Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). A aprovação foi concedida

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 Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). Para os demais pacientes, cuja avaliação clínica para VCFS e WBS foi feita no laboratório GENE - Núcleo de Genética Médica, nenhum consentimento verbal ou escrito, ou outras medidas documentadas formais foram fornecidos pelos participantes. Amostras de DNA, anteriormente utilizadas para o diagnóstico destes pacientes e armazenadas no mesmo laboratório, foram anonimizadas e usadas nos ensaios de qPCR, com a aprovação do Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte (número de registro CEP 009/2008).

Um consentimento escrito assinado pelo responsável foi obtido para uso do material genético de dez pacientes com suspeita clínica de monossomia 1p36 cuja avaliação médica foi realizada no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da USP (São Paulo, Brasil). A aprovação foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEP-IB-USP). Para dois pacientes, cuja avaliação clínica para monossomia 1p36 foi realizada fora do país e que haviam sido incluídos em um estudo sobre anormalidades cromossômicas, a aprovação para uso do material genético foi fornecida pelo *Institutional Review Board Spokane*. Amostras de DNA dos demais participantes com suspeita clínica de monossomia 1p36 foram obtidas a partir de procedimentos de diagnóstico prévio realizados no *Signature Genomic Laboratories* (Spokane, Washington, USA) e foram re-identificadas antes da utilização para fins de pesquisa, sem necessitar da aprovação de um comitê de ética específico.

Todos os métodos usados nesse estudo estão de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki.

#### **4.3.5- PCR quantitativa em tempo real (qPCR)**

##### **4.3.5.1- Seleção e/ou desenho de oligonucleotídeos iniciadores**

Os ensaios de qPCR para VCFS foram realizados com os marcadores *COMT* (*catechol-O-methyltransferase*), *PI4KA* (*phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha*), *PRODH* [*proline dehydrogenase (oxidase) 1*] e *SLC7A4* (*solute carrier family 7, member 4*). O marcador *HMBS* (*hydroxymethylbilane synthase*) foi escolhido como

gene de referência e usado na normalização dos dados de qPCR. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram obtidas a partir de Weksberg et al. (2005). Os símbolos utilizados por Weksberg et al. (2005) para representar os marcadores *HMBS*, *PI4KA* e *SLC7A4* foram, respectivamente, *HEM3*, *PIK4CA* e *CAT4*. Todos os símbolos de genes usados em nosso estudo são aqueles aprovados pelo *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) (<http://www.genenames.org>).

Os ensaios de qPCR para WBS foram realizados com os marcadores *ELN* (*elastin*) e *LIMK1* (*LIM domain kinase 1*). O marcador *HMBS* foi utilizado como gene de referência. Entretanto, no estudo da WBS, a sequência do par de iniciadores usado para amplificação do gene *HMBS* foi obtida a partir de Saugier-Veber et al. (2006), sem a adição da extensão universal citada pelos autores. Dessa forma, para diferenciar o gene *HMBS* amplificado pelos dois diferentes pares de iniciadores, foram utilizadas as seguintes notações: *HMBS* (seq. 1) correspondendo à amplificação realizada com o par de iniciadores obtidos a partir de Weksberg et al. (2005), e *HMBS* (seq. 2) correspondendo à amplificação realizada com o par de iniciadores derivados de Saugier-Veber et al. (2006). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *ELN* também foram derivadas de Saugier-Veber et al. (2006), sem a adição da extensão universal. Os iniciadores para amplificação de *LIMK1* foram desenhados exclusivamente para esse trabalho utilizando o programa *Primer3*, versão 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). As sequências foram alinhadas contra o genoma humano inteiro usando o programa *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>). Essa etapa foi realizada para verificar se os iniciadores desenhados estavam amplificando somente a região genômica de interesse e também para garantir que as regiões de anelamento não continham SNPs.

Os ensaios de qPCR para a monossomia 1p36 foram realizados com os marcadores *PRKCZ* (*protein kinase C, zeta*) e *SKI* (*v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog*). Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de ambos os genes foram desenhados seguindo as etapas descritas acima para o desenho dos iniciadores referentes ao marcador *LIMK1*. Como gene de referência foi escolhido o *HMBS* (seq. 2), cujos iniciadores foram idênticos àqueles utilizados nos ensaios de qPCR da WBS (Saugier-Veber et al. 2006).

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho esperado de cada *amplicon* são apresentados na Tabela 13.



**Tabela 13. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos *amplicons* e localização genômica**

Síndrome	Marcador	Cromossomo	Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Tamanho do amplicon (pb)	Localização genômica do amplicon (hg19)
VCFS	<i>COMT</i>	22	COMT-F	GTGCTACTGGCTGACAACGTGAT <sup>b</sup>	100	19,956,086-19,956,185
			COMT-R	GGAACGATTGGTAGTGTGTGCA <sup>b</sup>		
	<i>PI4KA</i>	22	PI4KA-F	ATGCTTGTGCGACGCAGAC <sup>b</sup>	101	21,105,251-21,105,351
			PI4KA-R	CCTCAGCCATGTTGACTCAGC <sup>b</sup>		
	<i>PRODH</i>	22	PRODH-F	GGGAAAGGAGAGTTCAGGCAG <sup>b</sup>	101	18,918,663-18,918,763
			PRODH-R	GCTTGTGAATAGCCTCTGTCCTAG <sup>b</sup>		
<i>SLC7A4</i>	22	SLC7A4-F	TACCTGGGCTTCTTGGATGG <sup>b</sup>	101	21,384,130-21,384,230	
		SLC7A4-R	AAGACAAGCACGCAGCCTATG <sup>b</sup>			
WBS	<i>ELN</i>	7	ELN-F	GTTGGTGTGCGCGTCCC <sup>c</sup>	122	73,474,747-73,474,868
			ELN-R	TCAGGGGACAGGCTCCG <sup>c</sup>		
	<i>LIMK1</i>	7	LIMK1-F	GCCAATACAGCGTATCAGAGGT <sup>d</sup>	149	73,530,004-73,530,152
			LIMK1-R	AGCCACCACCACATTCTTGT <sup>d</sup>		
Monossomia 1p36	<i>PRKCZ</i>	1	PRKCZ-F	ACGGTGTGAGCATGAGGATAC <sup>d</sup>	125	2,020,732-2,020,856
			PRKCZ-R	CAGAGGCTGAAGCAAATGAAC <sup>d</sup>		
	<i>SKI</i>	1	SKI-F	AGCTGATTGGGGGTAGGC <sup>d</sup>	85	2,221,777-2,221,861
			SKI-R	TCAGGCTGAGCAGTGCAG <sup>d</sup>		
— <sup>a</sup>	<i>HMBS</i> (seq. 1)	11	HMBS (1)-F	TGCACGGCAGCTTAACGAT <sup>b</sup>	201	118,963,966-118,964,166
			HMBS (1)-R	AGGCAAGGCAGTCATCAAGG <sup>b</sup>		
	<i>HMBS</i> (seq. 2)	11	HMBS (2)-F	ACGGCTCAGATAGCATAACAAG <sup>c</sup>	185	118,963,676-118,963,860
			HMBS (2)-R	ATGCCTACCAACTGTGGGTCA <sup>c</sup>		

(continuação na próxima página)

VCFS: síndrome velocardiofacial; WBS: síndrome de Williams-Beuren; pb: pares de bases.

— <sup>a</sup> Genes de referência.

<sup>b</sup> Sequências obtidas a partir de Weksberg et al. (2005).

<sup>c</sup> Sequências obtidas a partir de Saugier-Weber et al. (2006).

<sup>d</sup> Sequências desenhadas usando o programa *Primer3*, versão 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). O número de acesso no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) das sequências correspondentes aos genes *LIMK1*, *PRKCZ* e *SKI* que foram utilizadas para desenho dos iniciadores são, respectivamente, NM\_002314.3, NG\_029616.1 e NG\_013084.1.

#### 4.3.5.2- PCR para confirmação da especificidade dos iniciadores

Reações de amplificação por PCR foram feitas com o objetivo de confirmar a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores. Cada reação de amplificação continha 10 ng de DNA genômico; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; tampão *PCR buffer* 1X (Invitrogen™); 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,25 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 unidade de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), totalizando um volume final de 20 μL. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 15 segundos (extensão). Uma última etapa de extensão foi realizada a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação (NTC) para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, onde água estéril foi acrescentada no lugar de DNA. Os produtos de PCR, junto com marcadores de peso molecular [*1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen™) e marcador de 25 pb], foram aplicados em géis de poliacrilamida 5%. A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts por aproximadamente 60 minutos em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mM, pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM). Em seguida, os géis foram incubados em tampão TBE 1X contendo brometo de etídeo na concentração final de 0,5 μg/mL. Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta.

#### 4.3.5.3- Ensaio de qPCR

Cada reação de qPCR continha 5 μL de *SYBR® Green PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); 10 ng de DNA genômico; cada par de oligonucleotídeos iniciadores em sua concentração ótima e água *nuclease-free*, totalizando um volume final de 10 μL. As condições de amplificação consistiram de uma etapa inicial a 50°C por 2 minutos, uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de: 95°C por 15 segundos (desnaturação) e uma etapa única de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Após os 50 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de dissociação (*melting curve*). Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação (NTC) para cada par de oligonucleotídeos iniciadores,

onde água estéril foi acrescentada no lugar de DNA. As corridas de qPCR foram feitas no equipamento *Rotor-Gene® Q* (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) e os dados foram processados utilizando o *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).

A concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador foi determinada por um teste inicial, denominado teste de concentração de *primers*. Considerando os marcadores *COMT*, *HMBS* (seq. 1), *PI4KA*, *PRODH* e *SLC7A4* as concentrações testadas foram 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1  $\mu\text{M}$ . Para os marcadores *ELN*, *LIMK1*, *HMBS* (seq. 2), *PRKCZ* e *SKI* os iniciadores foram testados nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6  $\mu\text{M}$ . A partir desse teste, foram padronizadas as concentrações de cada iniciador *forward* (F) e *reverse* (R) a serem utilizadas nos ensaios de qPCR: 0,1  $\mu\text{M}$  (F)/0,1  $\mu\text{M}$  (R) para *HMBS* (seq. 2) e *SKI*; 0,2  $\mu\text{M}$  (F)/0,2  $\mu\text{M}$  (R) para *COMT*, *HMBS* (seq. 1), *PI4KA*, *PRKCZ*, *PRODH* e *SLC7A4*; 0,3  $\mu\text{M}$  (F)/0,3  $\mu\text{M}$  (R) para *ELN*; e 0,4  $\mu\text{M}$  (F)/0,4  $\mu\text{M}$  (R) para *LIMK1*.

Curvas padrão para cada marcador foram geradas através de ensaios de qPCR envolvendo diluições logarítmicas seriadas de DNA genômico (teste de eficiência de amplificação da qPCR): 20, 10, 5 e 2,5 nM para *ELN*, *HMBS* (seq. 2) e *LIMK1*;  $10^1$ ,  $10^0$ ,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  nM para *COMT*, *HMBS* (seq. 1), *PI4KA*, *PRKCZ*, *PRODH*, *SKI* e *SLC7A4*. Cada diluição foi testada em triplicata. Os valores de *slope* (coeficiente angular da reta) obtidos a partir das curvas padrão foram utilizados no cálculo da eficiência de amplificação da qPCR para cada marcador [Eficiência =  $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ ] e também na normalização dos dados de qPCR. A partir desse teste padronizou-se a quantidade de DNA genômico a ser utilizada em todos os ensaios de qPCR (10 ng/amostra).

Um controle negativo foi utilizado em todas as corridas de qPCR. Esse controle negativo corresponde ao DNA de um indivíduo específico não portador das síndromes em estudo. A presença do controle negativo em cada corrida de qPCR é fundamental para o cálculo do número de cópias alélicas de cada marcador.

### 4.3.6- Análise dos dados de qPCR

#### 4.3.6.1- Cálculo de $KC_t$ e $\Delta KC_t$

As equações utilizadas para normalização dos dados de qPCR ( $KC_t$ ) e para o cálculo da alteração no número de cópias alélicas ( $\Delta KC_t$ ) de cada marcador foram obtidas a partir de Weksberg et al. (2005) e Hughes et al. (2007), e são mostradas logo abaixo (equação 1 e equação 2, respectivamente). Esse método foi desenvolvido a partir de uma adaptação da metodologia para normalização de dados de qPCR criada por Moody et al. (2000) e também descrita por Sijben et al. (2003). De acordo com Weksberg et al. (2005) e Hughes et al. (2007), um valor de  $\Delta KC_t = 0 \pm SD$  (SD: desvio padrão) indica nenhuma alteração no número de cópias alélicas e, portanto, nenhuma anormalidade genética. Valores de  $\Delta KC_t = -1 \pm SD$  indicam perda de uma cópia alélica (microdeleção), e valores de  $\Delta KC_t = 1 \pm SD$  indicam ganho de uma cópia alélica (microduplicação).

$$KC_t = \left( \frac{AC_{tR} - C_{tR}}{S_R} \right) \times S_T + C_{tT} \quad \text{(equação 1)}$$

Onde:

- $KC_t$ :  $C_t$  normalizado do gene alvo.
- $AC_{tR}$ : Média dos valores de  $C_t$  para o gene de referência considerando todas as amostras incluídas em uma mesma corrida de qPCR (controle negativo e pacientes).
- $C_{tR}$ :  $C_t$  do gene de referência para a amostra a ser normalizada (no caso de triplicata usa-se como  $C_{tR}$  a média dos três valores de  $C_t$  do gene de referência para a amostra a ser normalizada).
- $S_R$ : *Slope* da curva padrão para o gene de referência.
- $S_T$ : *Slope* da curva padrão para o gene alvo.
- $C_{tT}$ :  $C_t$  do gene alvo para a amostra a ser normalizada (no caso de triplicata usa-se como  $C_{tT}$  a média dos três valores de  $C_t$  do gene alvo para a amostra a ser normalizada).

$$\Delta KC_t = KC_t \text{ (controle)} - KC_t \text{ (afetado)} \quad \text{(equação 2)}$$

Onde:

- $\Delta KC_t$ : Representa o ganho ou a perda no número de cópias alélicas (*fold copy number change*), ou seja, indica se há ou não alteração no número de cópias de um gene alvo (microdeleção/microduplicação/normal).
- $KC_t \text{ (controle)}$ :  $C_t$  normalizado do gene alvo ( $KC_t$  do gene alvo) para a amostra correspondente ao controle negativo.
- $KC_t \text{ (afetado)}$ :  $C_t$  normalizado do gene alvo ( $KC_t$  do gene alvo) para a amostra correspondente ao paciente com suspeita clínica de uma determinada síndrome genética.

#### 4.3.6.2- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). O teste de D'Agostinho-Pearson foi realizado para verificar se os valores de  $\Delta KC_t$  do grupo dos 50 controles normais de cada síndrome apresentavam distribuição normal. Análises da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*) foram feitas utilizando os valores de  $\Delta KC_t$  obtidos para o grupo dos controles normais e para o grupo positivo (Grupo 1) de cada síndrome. As medidas utilizadas para avaliar a precisão da metodologia de qPCR na discriminação entre os dois grupos acima foram: sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC (AUC – *Area Under the ROC Curve*). Para cada marcador foi obtido um *dot plot*, em que os dados do grupo negativo (controles normais) e do grupo positivo (Grupo 1) são apresentados como pontos em dois eixos verticais e uma linha horizontal indica o ponto de corte (*threshold*) com a melhor separação entre os dois grupos (menor taxa de resultados falso negativos e falso positivos).

#### 4.3.7- Cálculo do custo de um teste de triagem molecular por qPCR

Nessa etapa, os cálculos foram feitos considerando o uso de três marcadores nos ensaios de qPCR (dois genes alvo e um gene de referência) e a realização de análises em triplicata para cada par de iniciadores. Foram calculados os custos com reagentes e materiais de laboratório envolvidos no processo, considerando desde a etapa de extração

de DNA até a qPCR. Todas as cotações e cálculos foram feitos na moeda local (R\$ – real).

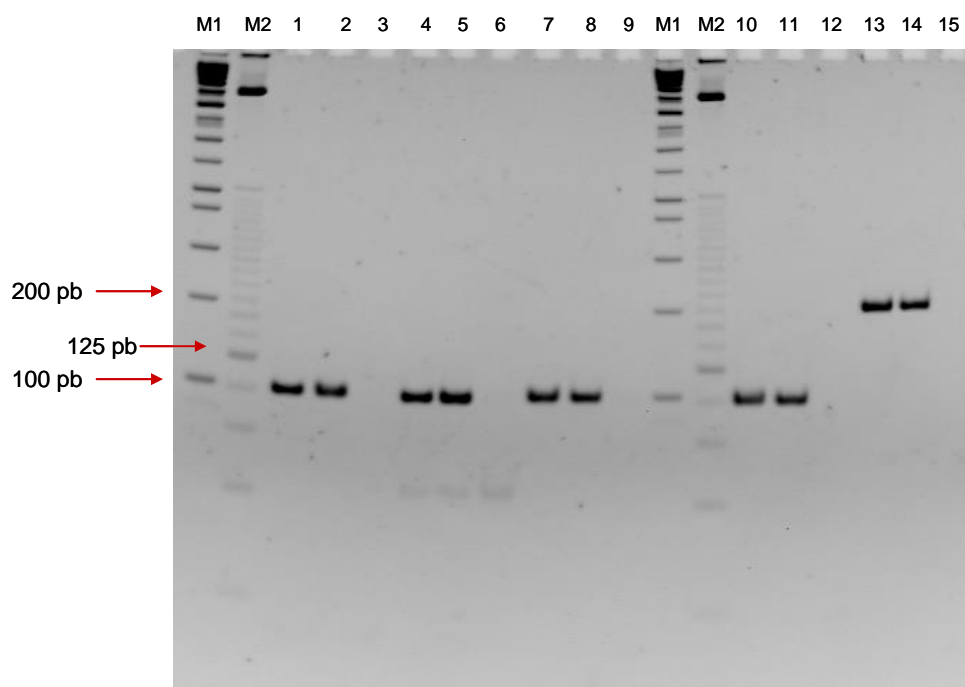
## 4.4- Resultados

### 4.4.1- Resultados de qPCR para a síndrome velocardiofacial

A VCFS foi a primeira síndrome estudada. Ela foi escolhida como um protótipo para validação da metodologia de qPCR na detecção de microdeleções cromossômicas no nosso laboratório e, por isso, nós utilizamos oligonucleotídeos iniciadores cujas sequências já tinham sido descritas na literatura (Weksberg et al., 2005). A escolha da VCFS como protótipo deveu-se principalmente à existência do trabalho publicado por Weksberg et al. (2005), em que dez marcadores foram utilizados para detecção de microdeleções na região 22q11.2 por qPCR, e que foi o trabalho utilizado como base para o desenvolvimento da segunda parte da tese. Mas, para manter o objetivo principal desse trabalho que é o desenvolvimento de um teste de triagem de baixo custo, nós utilizamos apenas quatro dos dez marcadores descritos por Weksberg et al. (2005).

Antes de realizar um ensaio de qPCR é fundamental verificar se o produto da reação resultante da amplificação com cada par de iniciadores é único e do tamanho esperado. Apesar das sequências dos iniciadores terem sido obtidas a partir de um trabalho publicado (Weksberg et al., 2005), essa etapa também foi realizada para a VCFS. Experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida (5%) mostraram a presença de uma banda única e do tamanho esperado correspondente à amplificação dos quatro genes alvo (*COMT*, *PI4KA*, *PRODH* e *SLC7A4*) e do gene de referência *HMBS* (seq. 1) (Figura 6).

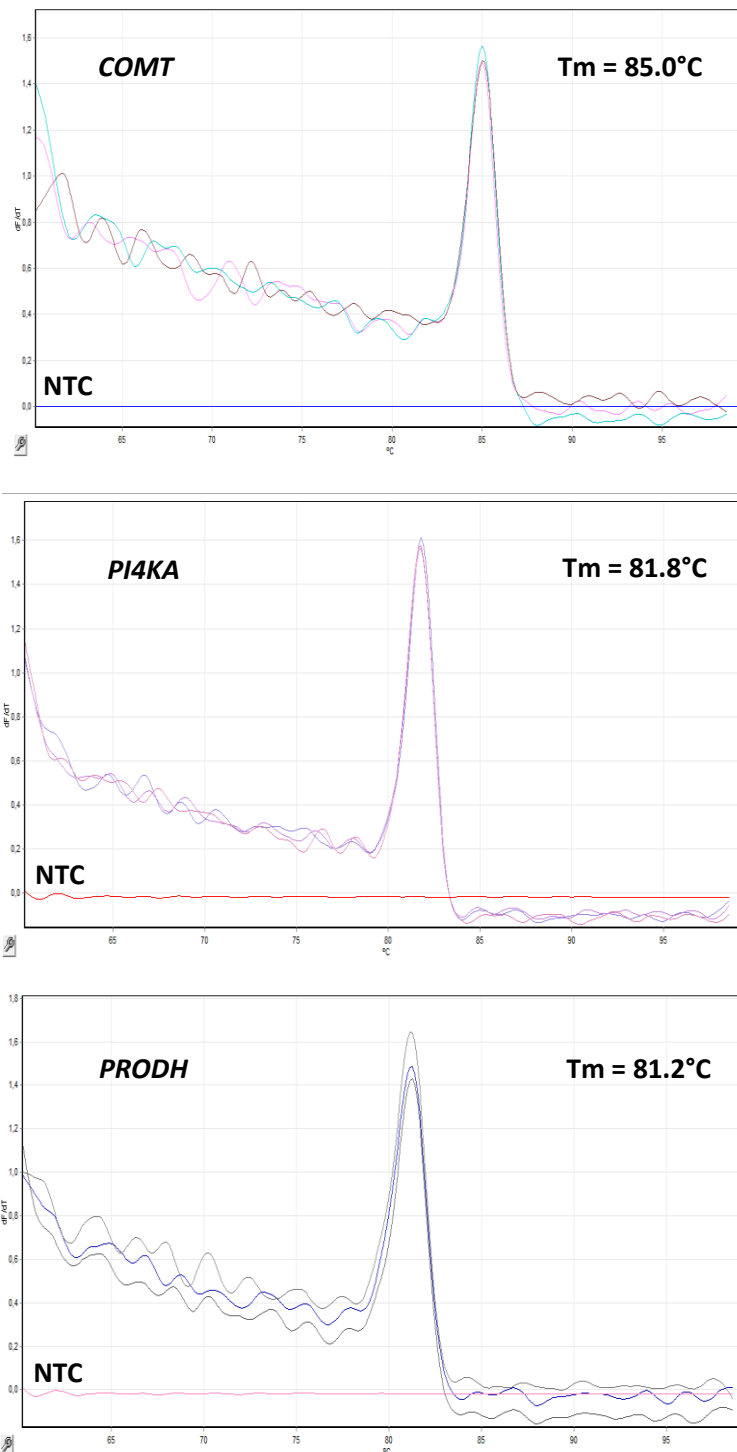




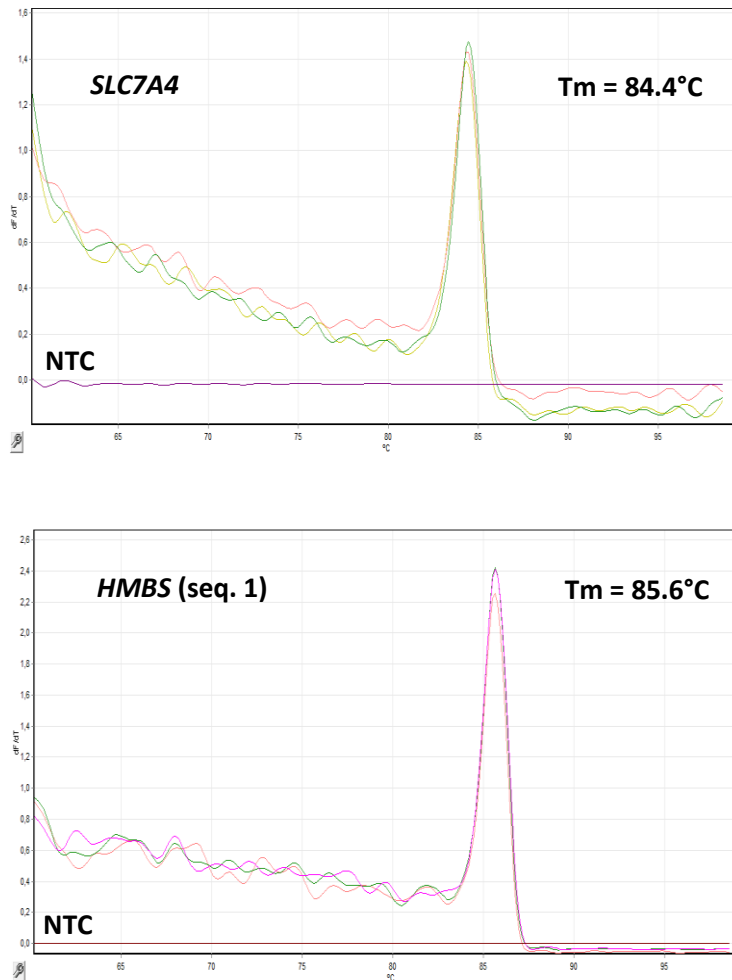
**Figura 6. Gel de poliacrilamida (5%) corado com brometo de etídeo mostrando o tamanho dos *amplicons* produzidos a partir da amplificação por PCR com cada par de iniciadores usados no estudo da VCFS. A ordem da numeração é: (M1) Marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>); (M2) Marcador de 25 pb; (1 e 2) *Amplicon* de 101 pb correspondente à amplificação de *SLC7A4*; (3) Controle branco de amplificação de *SLC7A4*; (4 e 5) *Amplicon* de 100 pb correspondente à amplificação de *COMT*; (6) Controle branco de amplificação de *COMT*; (7 e 8) *Amplicon* de 101 pb correspondente à amplificação de *PI4KA*; (9) Controle branco de amplificação de *PI4KA*; (10 e 11) *Amplicon* de 101 pb correspondente à amplificação de *PRODH*; (12) Controle branco de amplificação de *PRODH*; (13 e 14) *Amplicon* de 201 pb correspondente à amplificação de *HMBS* (seq. 1); (15) Controle branco de amplificação de *HMBS* (seq. 1).**

Nos ensaios de qPCR, a análise da curva de dissociação é a primeira etapa a ser realizada. Essa análise permite verificar a especificidade das reações de qPCR, a formação de dímeros de *primers* e determinar a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de cada *amplicon*. Para que uma amplificação seja considerada específica é necessária a presença de um pico único e bem definido na curva de dissociação. Além disso, é importante que não seja gerado um sinal de fluorescência significativo no controle branco de amplificação, indicando que não há formação de dímeros de *primers*. Se esta tendência é observada, pode-se dizer que o ensaio de qPCR é específico e que a fluorescência é uma medida direta do acúmulo do produto da reação. Para todos os marcadores utilizados no estudo da VCFS, as análises das curvas de dissociação mostraram a ausência de dímeros de *primers* e a presença de um pico único correspondente ao  $T_m$  de cada *amplicon* (Figuras 7 e 8). Esses resultados confirmaram a especificidade dos ensaios de qPCR para amplificação dos marcadores em estudo.

A etapa de otimização da concentração dos oligonucleotídeos iniciadores (teste de concentração de *primers*) é essencial para reduzir a formação de produtos inespecíficos. Para maximizar a sensibilidade da reação de qPCR é necessário utilizar a menor concentração de iniciador que resulta no menor valor de  $C_t$  (*threshold cycle*) e em um sinal de fluorescência ( $\Delta R_n$ ) significativo, com pouca ou nenhuma formação de dímeros de *primers*. Entretanto, também é importante não comprometer a eficiência de amplificação da qPCR (Hughes et al., 2007). Seguindo todas essas informações, a concentração ótima de cada iniciador foi determinada e padronizada para uso nas reações posteriores (Tabela 14).



**Figura 7. Curva de dissociação dos marcadores *COMT*, *PI4KA* e *PRODH* com indicação do  $T_m$  de cada *amplicon*. A curva de dissociação para todos os marcadores mostrou a presença de um pico único e bem definido correspondente ao  $T_m$  de cada *amplicon* analisado e ausência de dímeros de *primers*. NTC: *No Template Control*. Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).**



**Figura 8.** Curva de dissociação dos marcadores *SLC7A4* e *HMBS (seq. 1)* com indicação do  $T_m$  de cada *amplicon*. A curva de dissociação para ambos os marcadores mostrou a presença de um pico único e bem definido, correspondente ao  $T_m$  de cada *amplicon* analisado, e ausência de dímeros de *primers*. NTC: *No Template Control*. Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).

**Tabela 14. Concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador usado no estudo da VCFS determinada através do teste de concentração de *primers***

Síndrome	Nome do oligonucleotídeo	Concentração (µM)
VCFS	COMT-F	0,2
	COMT-R	0,2
	PI4KA-F	0,2
	PI4KA-R	0,2
	PRODH-F	0,2
	PRODH-R	0,2
	SLC7A4-F	0,2
	SLC7A4-R	0,2
— <sup>a</sup>	HMBS (1)-F	0,2
	HMBS (1)-R	0,2

VCFS: síndrome velocardiocfacial.

—<sup>a</sup> Gene de referência.

Posteriormente, foram obtidas curvas padrão de  $C_t$  versus a concentração de *template* para cada marcador (Figuras A3 e A4 em anexo). O *slope* foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação da qPCR. Os resultados mostraram que as reações para a VCFS ocorreram com eficiências relativamente altas (maiores que 87%), apresentando valores de  $R^2$  (coeficiente de determinação) maiores que 0,99 (Tabela 15). Valores de  $R^2$  maiores que 0,98 são geralmente aceitáveis, indicando uma boa eficiência de reação (Hughes et al., 2007).

A primeira etapa na análise dos dados de qPCR foi a normalização dos dados, que consiste na correção dos valores de  $C_t$  obtidos para cada gene alvo utilizando os valores de  $C_t$  do gene de referência. Uma característica fundamental do gene de referência é que ele não deve estar localizado dentro de uma região de variação de número de cópias, ou seja, o número de cópias do gene de referência deve ser o mesmo em todas as amostras analisadas. Essa etapa de normalização dos dados é feita com o objetivo de controlar para variações da reação de qPCR entre as amostras, tais como concentração inicial de *template*, eficiência da reação, erros de pipetagem, qualidade do DNA e outras variáveis que podem adversamente afetar a reação. Pode-se dizer que a normalização dos dados em qPCR é essencial para uma análise de quantificação correta (Hughes et al., 2007). A partir dos valores de  $C_t$  normalizados ( $KC_t$ ), foi feito o cálculo da alteração no número de cópias alélicas ( $\Delta KC_t$ ) dos marcadores *COMT*, *PI4KA*, *PRODH* e *SLC7A4* nos grupos VCFS\_Controles Normais (Tabela A5 em anexo), VCFS\_Grupo 1 (Tabela A6 em anexo) e VCFS\_Grupo 2 (Tabela A7 em anexo). A Tabela 16 mostra uma visão geral dos resultados de  $\Delta KC_t$  para os quatro marcadores nos três grupos acima.

**Tabela 15. *Slope*, eficiência de amplificação da qPCR e valores de R<sup>2</sup> para os genes alvo e de referência do estudo da VCFS**

Síndrome	Marcador	<i>Slope</i>	Eficiência de amplificação	R <sup>2</sup>
VCFS	<i>COMT</i>	-3,6715	87,23%	0,9960
	<i>PI4KA</i>	-3,1750	93,48%	0,9979
	<i>PRODH</i>	-3,1350	91,56%	0,9965
	<i>SLC7A4</i>	-3,2290	95,97%	0,9931
— <sup>a</sup>	<i>HMBS</i> (seq. 1)	-3,1310	91,37%	0,9987

VCFS: síndrome velocardiofacial.

—<sup>a</sup> Gene de referência.

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

**Tabela 16. Visão geral dos resultados de  $\Delta KC_t$  para os marcadores *COMT*, *PI4KA*, *PRODH* e *SLC7A4* nos grupos VCFS\_Controles Normais, VCFS\_Grupo 1 e VCFS\_Grupo 2**

Síndrome	Classificação	Marcador	n	$\Delta KC_t$				
				Média	SD	Mediana	Máximo	Mínimo
VCFS	VCFS_Controles Normais	<i>COMT</i>	50	0,0756	0,2489	0,0825	0,6915	-0,4047
		<i>PI4KA</i>	50	0,0461	0,2076	0,0717	0,4213	-0,5008
		<i>PRODH</i>	50	0,0482	0,2090	0,0376	0,5277	-0,4537
		<i>SLC7A4</i>	50	0,0674	0,1598	0,0825	0,3638	-0,2764
	VCFS_Grupo 1	<i>COMT</i>	9	<b>-1,2034</b>	<b>0,3018</b>	-1,1974	-0,7741	-1,6543
		<i>PI4KA</i>	9	<b>-1,2211</b>	<b>0,2302</b>	-1,2364	-0,8419	-1,6222
		<i>PRODH</i>	9	<b>-1,3255</b>	<b>0,1838</b>	-1,3669	-1,1038	-1,6231
		<i>SLC7A4</i>	9	<b>-0,9958</b>	<b>0,1681</b>	-1,0026	-0,6462	-1,1736
	VCFS_Grupo 2	<i>COMT</i>	16	0,1474	0,1999	0,1554	0,4945	-0,1715
		<i>PI4KA</i>	16	0,1547	0,1852	0,2002	0,4017	-0,2073
		<i>PRODH</i>	16	0,0567	0,1493	0,0875	0,2985	-0,2312
		<i>SLC7A4</i>	16	0,1124	0,1391	0,0831	0,3318	-0,0652

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; n: tamanho da amostra; SD: desvio padrão; VCFS: síndrome velocardiofacial.

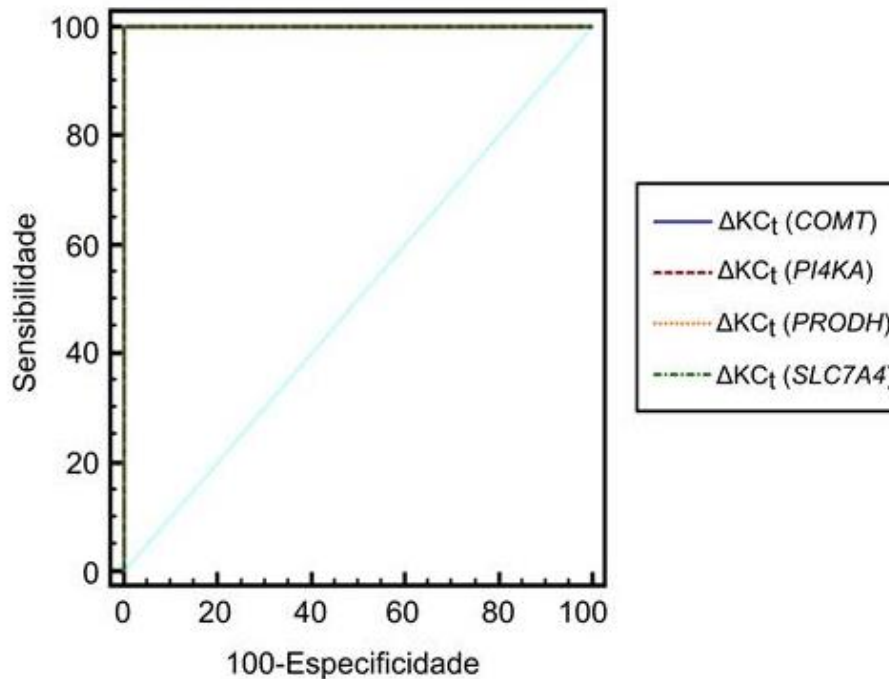
Os resultados de  $\Delta KC_t$  (expressos como a média de  $\Delta KC_t \pm SD$ ) consistentes com a perda de uma cópia alélica são mostrados em negrito.



Para o grupo VCFS\_Controles Normais, o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de zero para todos os marcadores: *COMT* ( $0,0756 \pm 0,2489$ ), *PI4KA* ( $0,0461 \pm 0,2076$ ), *PRODH* ( $0,0482 \pm 0,2090$ ) e *SLC7A4* ( $0,0674 \pm 0,1598$ ), indicando a presença de duas cópias alélicas de cada marcador (Tabela 16).

Para VCFS\_Grupo 1, o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de -1,000 para todos os marcadores: *COMT* ( $-1,2034 \pm 0,3018$ ), *PI4KA* ( $-1,2211 \pm 0,2302$ ), *PRODH* ( $-1,3255 \pm 0,1838$ ) e *SLC7A4* ( $-0,9958 \pm 0,1681$ ) (Tabela 16). Além disso, o valor máximo de  $\Delta KC_t$  obtido para cada marcador no VCFS\_Grupo 1 (*COMT* =  $-0,7741$ ; *PI4KA* =  $-0,8419$ ; *PRODH* =  $-1,1038$  e *SLC7A4* =  $-0,6462$ ) foi menor que os valores mínimos de  $\Delta KC_t$  obtidos no grupo dos controles normais (*COMT* =  $-0,4047$ ; *PI4KA* =  $-0,5008$ ; *PRODH* =  $-0,4537$  e *SLC7A4* =  $-0,2764$ ), mostrando uma completa separação dos resultados de  $\Delta KC_t$  entre os dois grupos (Tabela 16). Esses resultados comprovam que os nove pacientes apresentam microdeleção hemizigótica dos quatro marcadores em estudo, indicando que todos têm síndrome velocardiofacial. Um indivíduo será considerado portador da VCFS se ele apresentar microdeleção hemizigótica de pelo menos um dos quatro marcadores, com um raciocínio semelhante sendo aplicado no estudo das demais síndromes.

Análises estatísticas feitas com o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), que corresponderam ao teste de D'Agostinho-Pearson e análises da curva ROC, corroboraram os resultados descritos acima. Resultados do teste de D'Agostinho-Pearson mostraram que os valores de  $\Delta KC_t$  para os quatro marcadores no grupo VCFS\_Controles Normais apresentavam distribuição normal (dados não mostrados). O gráfico da curva ROC é apresentado na Figura 9.



**Figura 9. Comparação das curvas ROC (Receiver Operating Characteristic curves) para os marcadores *COMT*, *PI4KA*, *PRODH* e *SLC7A4* analisados no estudo da VCFS.** Os valores de  $\Delta KC_t$  dos 50 controles normais (VCFS\_Controles Normais) e dos 9 pacientes com VCFS (VCFS\_Grupo 1) foram considerados para determinação da curva ROC. Houve uma sobreposição das curvas ROC dos quatro marcadores, com todas alcançando o canto superior esquerdo do gráfico. A linha azul na diagonal do gráfico, também denominada “linha de não-discriminação”, é representativa de um teste incapaz de discriminar entre um indivíduo normal e um indivíduo doente (AUC = 0,5). O uso simultâneo dos quatro marcadores nos ensaios de qPCR resultou em um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. O valor de *threshold* escolhido para cada marcador foi:  $\Delta KC_t \leq -0,7741$  (*COMT*),  $\Delta KC_t \leq -0,8419$  (*PI4KA*),  $\Delta KC_t \leq -1,1038$  (*PRODH*) e  $\Delta KC_t \leq -0,6462$  (*SLC7A4*). Os gráficos foram obtidos utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

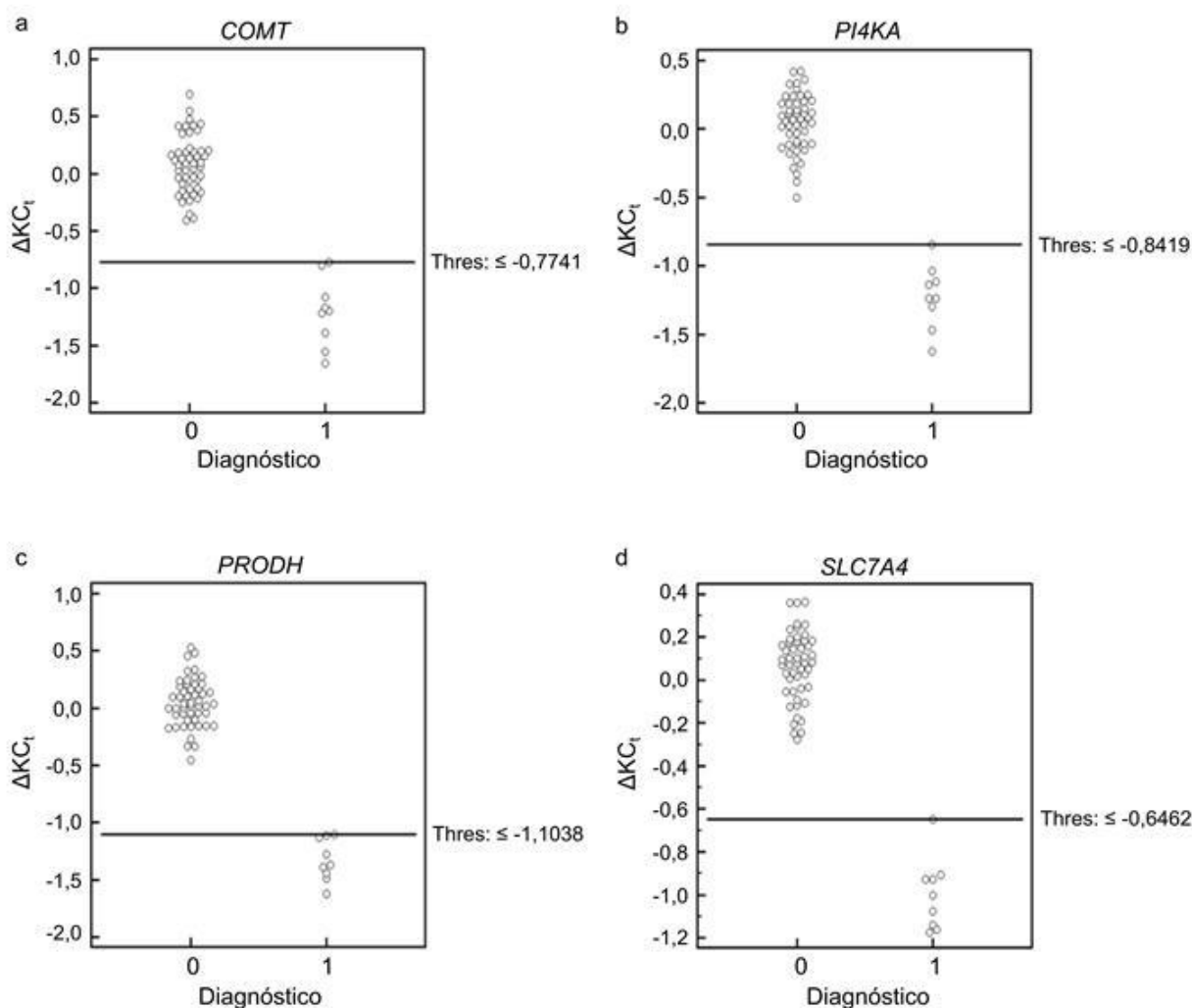
A curva ROC é uma ferramenta fundamental para avaliação de um teste diagnóstico, pois ela calcula a precisão de um teste para discriminar entre indivíduos portadores de uma doença e indivíduos normais (Metz, 1978; Zweig e Campbell, 1993). Um teste capaz de fazer uma discriminação perfeita entre os dois grupos de diagnóstico tem uma curva ROC que atinge o canto superior esquerdo do gráfico (100% de sensibilidade e 100% de especificidade). Para determinação da curva ROC foram considerados os valores de  $\Delta KC_t$  obtidos para o grupo dos 50 controles normais (VCFS\_Controles Normais) e para o grupo positivo (VCFS\_Grupo 1), e as medidas utilizadas para avaliar a precisão da metodologia de qPCR na discriminação entre os dois grupos foram: sensibilidade, especificidade e AUC. A sensibilidade refere-se à probabilidade do resultado de um teste ser positivo quando a doença está presente (taxa de verdadeiros positivos, expresso em porcentagem). A especificidade refere-se à probabilidade do resultado de um teste ser negativo quando a doença não está presente (taxa de verdadeiros negativos, expresso em porcentagem). Em uma curva ROC, a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) é plotada em função da taxa de falsos positivos (100 - especificidade) para diferentes pontos de corte (*threshold*) de um parâmetro. Cada ponto na curva ROC representa um par sensibilidade/especificidade correspondente a um ponto de corte. A área sob a curva ROC é uma medida do desempenho de um teste diagnóstico (índice de precisão do teste). Ela mede o quão bem um parâmetro pode distinguir entre os dois grupos de diagnóstico (doente/normal). No caso específico desse trabalho, o parâmetro refere-se à variável  $\Delta KC_t$  e os diferentes pontos de corte correspondem aos diferentes valores de  $\Delta KC_t$  para cada marcador.

Considerando o uso simultâneo dos quatro marcadores nos ensaios de qPCR, a área sob a curva ROC foi igual a 1,000 (IC 95%; 0,939-1,000). Isso significa que um indivíduo selecionado aleatoriamente do grupo positivo apresenta um valor de  $\Delta KC_t$  menor do que o de um indivíduo selecionado aleatoriamente do grupo dos controles normais em 100% das vezes para, ao menos, um dos quatro marcadores utilizados (Zweig e Campbell, 1993). Isto é, a AUC igual a 1,000 mostra que existe uma separação perfeita dos valores de  $\Delta KC_t$  dos dois grupos. Além disso, o *p-value* correspondente foi igual a zero, indicando que a AUC é significativamente diferente de 0,5 e, portanto, existe evidência de que a metodologia de qPCR seja capaz de distinguir entre os dois grupos (positivo e controles normais). A utilização desses quatro marcadores resultou em um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade (IC 95%; 66,4-100,0) e 100% de especificidade (IC 95%; 92,9-100,0).

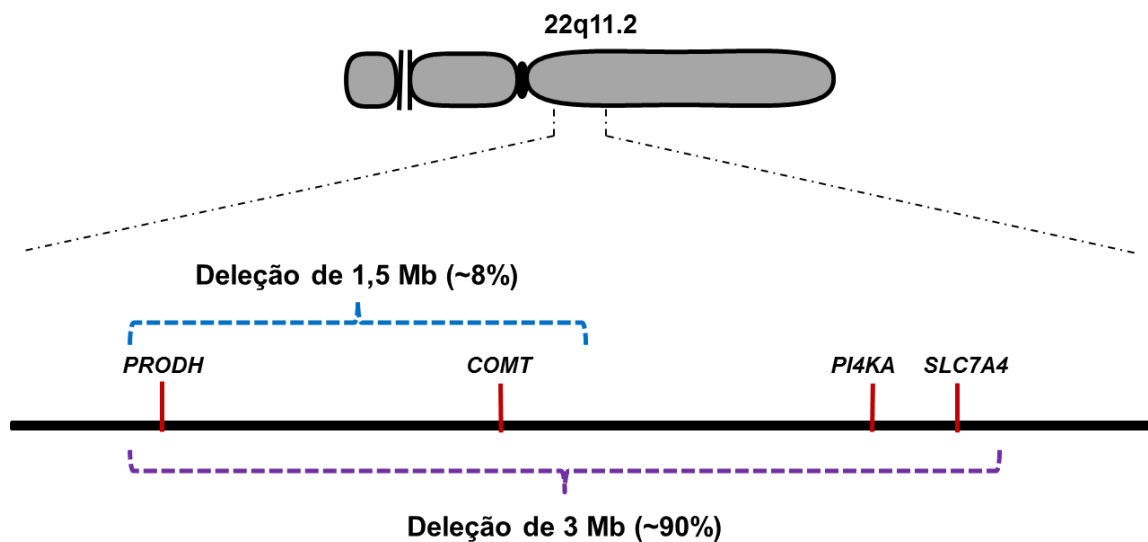
O valor de *threshold* escolhido para cada marcador foi:  $\Delta KC_t \leq -0,7741$  (*COMT*),  $\Delta KC_t \leq -0,8419$  (*PI4KA*),  $\Delta KC_t \leq -1,1038$  (*PRODH*) e  $\Delta KC_t \leq -0,6462$  (*SLC7A4*). Dessa forma, pode-se dizer, por exemplo, que indivíduos que apresentam valores de  $\Delta KC_t \leq -0,6462$  e indivíduos que mostram valores de  $\Delta KC_t > -0,6462$  podem ser identificados, respectivamente, como portadores e não portadores de deleção hemizigótica do gene *SLC7A4*. O mesmo raciocínio é aplicado aos demais marcadores. Para cada marcador foi obtido um *dot plot*, no qual os valores de  $\Delta KC_t$  dos grupos VCFS\_Controles Normais e VCFS\_Grupo 1 são apresentados como pontos em dois eixos verticais e a linha horizontal indica o *threshold*, que corresponde ao valor de  $\Delta KC_t$  escolhido como limite de separação entre os dois grupos (Figura 10).

Para VCFS\_Grupo 2, o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de zero para todos os marcadores: *COMT* ( $0,1474 \pm 0,1999$ ), *PI4KA* ( $0,1547 \pm 0,1852$ ), *PRODH* ( $0,0567 \pm 0,1493$ ) e *SLC7A4* ( $0,1124 \pm 0,1391$ ) (Tabela 16). Os valores de  $\Delta KC_t$  obtidos para cada marcador nesse grupo (*COMT*: de  $-0,1715$  a  $0,4945$ ; *PI4KA*: de  $-0,2073$  a  $0,4017$ ; *PRODH*: de  $-0,2312$  a  $0,2985$ ; *SLC7A4*: de  $-0,0652$  a  $0,3318$ ) situaram-se entre os valores mínimo (*COMT* =  $-0,4047$ ; *PI4KA* =  $-0,5008$ ; *PRODH* =  $-0,4537$ ; *SLC7A4* =  $-0,2764$ ) e máximo (*COMT* =  $0,6915$ ; *PI4KA* =  $0,4213$ ; *PRODH* =  $0,5277$ ; *SLC7A4* =  $0,3638$ ) apresentados pelo grupo dos controles normais (Tabela 16). Além disso, o valor mínimo de  $\Delta KC_t$  obtido para cada marcador no VCFS\_Grupo 2 (*COMT* =  $-0,1715$ ; *PI4KA* =  $-0,2073$ ; *PRODH* =  $-0,2312$ ; *SLC7A4* =  $-0,0652$ ) foi maior que o valor de  $\Delta KC_t$  escolhido como *threshold* para cada marcador (*COMT*:  $\Delta KC_t \leq -0,7741$ ; *PI4KA*:  $\Delta KC_t \leq -0,8419$ ; *PRODH*:  $\Delta KC_t \leq -1,1038$ ; *SLC7A4*:  $\Delta KC_t \leq -0,6462$ ) (Tabela 16). Então, os resultados apresentados pelo VCFS\_Grupo 2 mostram que os dezesseis pacientes possuem duas cópias alélicas de cada marcador analisado. Sabendo-se que esses marcadores estão localizados dentro da região tipicamente deletada de 3 Mb da VCFS (Figura 11), podemos dizer que a triagem molecular desses pacientes por qPCR é sugestiva de um diagnóstico negativo para a síndrome velocardiocfacial.

Todos os resultados obtidos para a síndrome velocardiocfacial usando a técnica de qPCR mostraram 100% de concordância com os resultados previamente determinados por marcadores microssatélites e MQF-PCR, comprovando a eficiência da qPCR na detecção de microdeleções na região 22q11.2.



**Figura 10. Dot plot para os marcadores analisados no estudo da VCFS: (a) *COMT*, (b) *PI4KA*, (c) *PRODH* e (d) *SLC7A4*.** Os valores de  $\Delta K C_i$  dos 50 controles normais (VCFS\_Controles Normais) e dos 9 pacientes com VCFS (VCFS\_Grupo 1) foram considerados para construção do dot plot. O valor de *threshold* (Thres) é mostrado no lado direito de cada gráfico. No eixo horizontal (Diagnóstico), o número zero representa o grupo negativo (VCFS\_Controles normais) e o número 1 representa o grupo positivo (VCFS\_Grupo 1). Cada indivíduo é representado por um círculo dentro do gráfico. A linha horizontal dentro do gráfico indica o valor de *threshold*, que corresponde ao valor de  $\Delta K C_i$  escolhido como limite de separação entre os dois grupos. O uso simultâneo desses marcadores nos ensaios de qPCR resultou em um teste com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Os gráficos foram obtidos utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

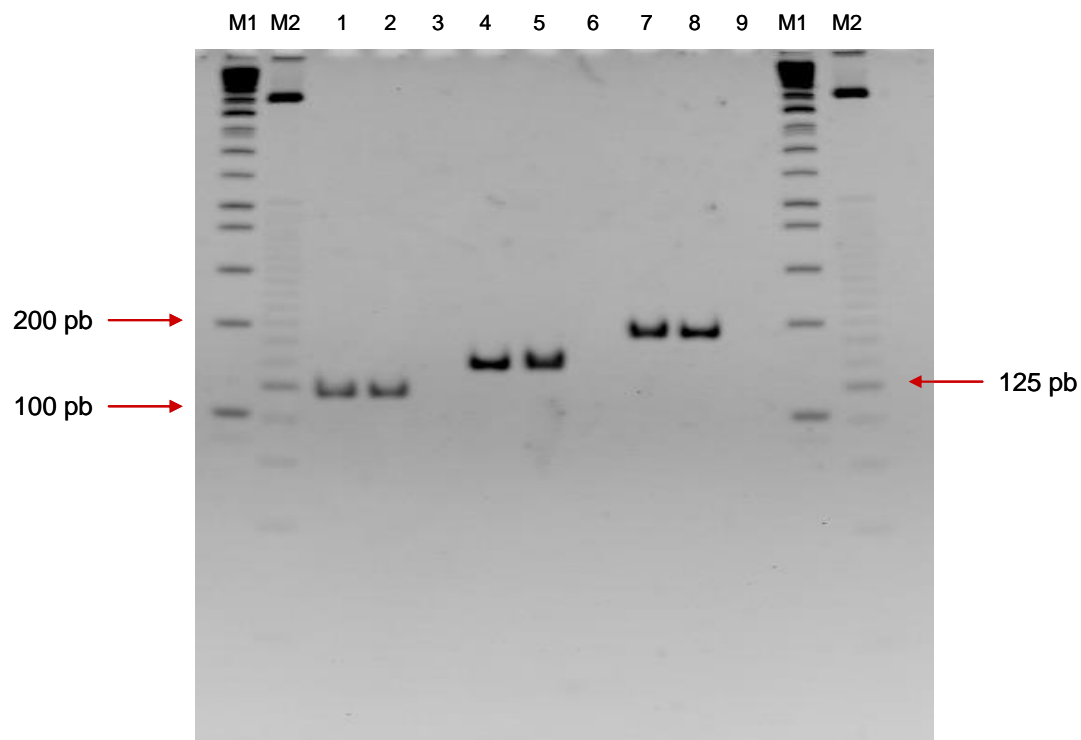


**Figura 11. Representação esquemática da região 22q11.2 e localização dos marcadores *COMT*, *PI4KA*, *PROD H* e *SLC7A4*.** Os quatro marcadores estão localizados dentro da região crítica de 3 Mb, cuja deleção é relatada em aproximadamente 90% dos indivíduos afetados. Os marcadores *COMT* e *PROD H* estão localizados também dentro da região de 1,5 Mb, o segundo intervalo de deleção mais comum da VCFS, e que é encontrado em cerca de 8% dos pacientes.

#### 4.4.2- Resultados de qPCR para a síndrome de Williams-Beuren

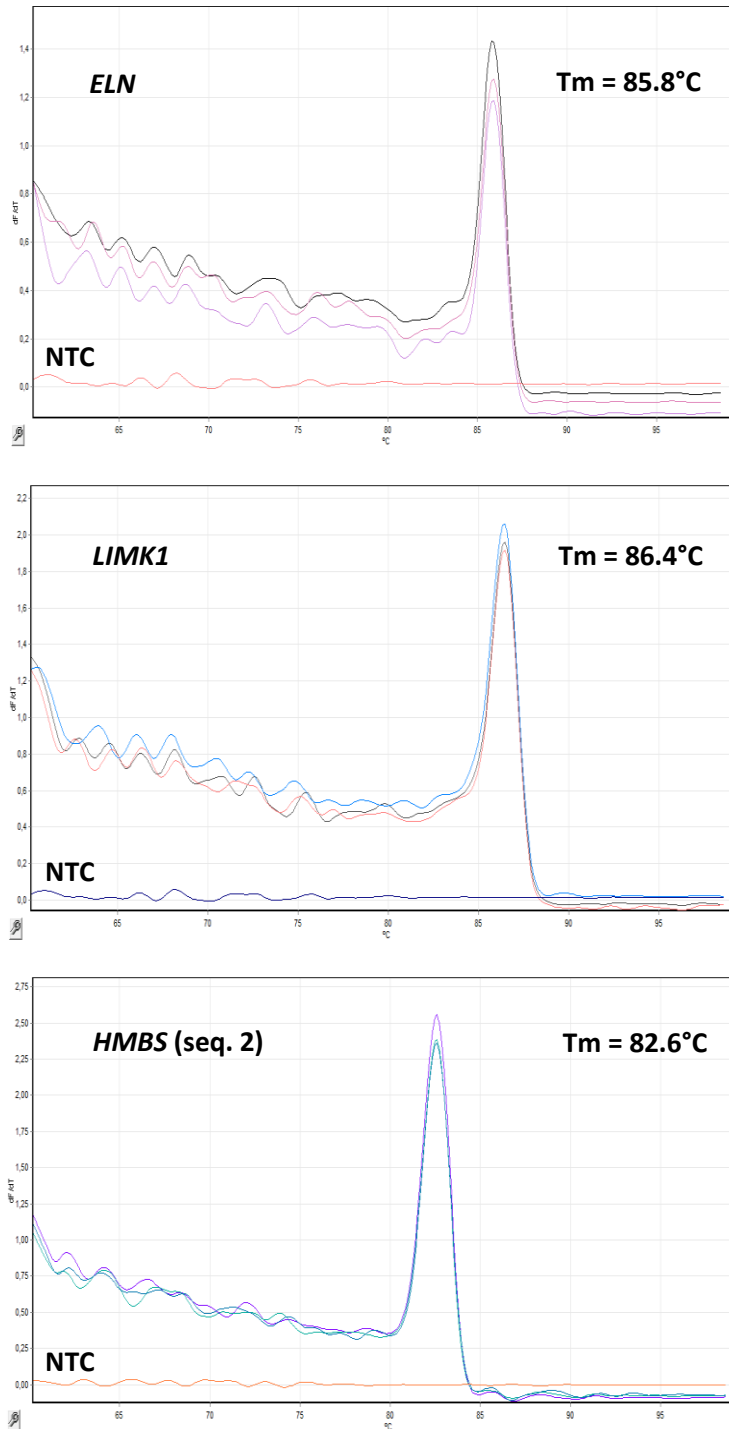
No estudo da WBS, a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos dois genes alvo (*ELN* e *LIMK1*) e do gene de referência *HMBS* (seq. 2) foi comprovada por experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida (5%), que mostraram a presença de uma banda única e do tamanho esperado para cada marcador (Figura 12). Análises da curva de dissociação mostraram a presença de um pico único e ausência de dímeros de *primers* para cada marcador analisado, corroborando os resultados acima e confirmando a especificidade dos ensaios de qPCR (Figura 13).

A concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador foi determinada através do teste de concentração de *primers* e padronizada para uso nas reações posteriores (Tabela 17). A partir do teste de eficiência de amplificação da qPCR foi gerada a curva padrão de  $C_t$  versus a concentração de *template* para cada marcador (Figura A8 em anexo). As reações de qPCR para a WBS ocorreram com eficiências relativamente altas (maiores que 90%), apresentando valores de  $R^2$  maiores que 0,99 (Tabela 18).



**Figura 12.** Gel de poliacrilamida (5%) corado com brometo de etídeo mostrando o tamanho dos *amplicons* produzidos a partir da amplificação por PCR com cada par de iniciadores usados no estudo da WBS. A ordem da numeração é: (M1) Marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>); (M2) Marcador de 25 pb; (1 e 2) *Amplicon* de 122 pb correspondente à amplificação de *ELN*; (3) Controle branco de amplificação de *ELN*; (4 e 5) *Amplicon* de 149 pb correspondente à amplificação de *LIMK1*; (6) Controle branco de amplificação de *LIMK1*; (7 e 8) *Amplicon* de 185 pb correspondente à amplificação de *HMBS* (seq. 2); (9) Controle branco de amplificação de *HMBS* (seq. 2).





**Figura 13. Curva de dissociação dos marcadores *ELN*, *LIMK1* e *HMBS* (seq. 2) com indicação do  $T_m$  de cada *amplicon*. A curva de dissociação para os três marcadores mostrou a presença de um pico único e bem definido, correspondente ao  $T_m$  de cada *amplicon* analisado, e ausência de dímeros de *primers*. NTC: No Template Control. Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).**

**Tabela 17. Concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador usado no estudo da WBS determinada através do teste de concentração de *primers***

<b>Síndrome</b>	<b>Nome do oligonucleotídeo</b>	<b>Concentração (μM)</b>
WBS	ELN-F	0,3
	ELN-R	0,3
	LIMK1-F	0,4
	LIMK1-R	0,4
— <sup>a</sup>	HMBS (2)-F	0,1
	HMBS (2)-R	0,1

WBS: síndrome de Williams-Beuren.

—<sup>a</sup> Gene de referência

**Tabela 18. *Slope*, eficiência de amplificação da qPCR e valores de R<sup>2</sup> para os genes alvo e de referência do estudo da WBS**

Síndrome	Marcador	<i>Slope</i>	Eficiência de amplificação	R <sup>2</sup>
WBS	<i>ELN</i>	-3,1150	90,58%	0,9957
	<i>LIMK1</i>	-3,5860	90,05%	0,9958
— <sup>a</sup>	<i>HMBS</i> (seq. 2)	-3,4350	95,49%	0,9964

WBS: síndrome de Williams-Beuren.

—<sup>a</sup> Gene de referência.

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

Posteriormente, foi feito o cálculo de  $\Delta KC_t$  para os marcadores *ELN* e *LIMK1* nos grupos WBS\_Controles Normais (Tabela A9 em anexo), WBS\_Grupo 1 (Tabela A10 em anexo) e WBS\_Grupo 2 (Tabela A11 em anexo). A Tabela 19 mostra uma visão geral dos resultados de  $\Delta KC_t$  para ambos os marcadores nos três grupos acima.

Os resultados obtidos para o grupo WBS\_Controles Normais mostraram que o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de zero para ambos os marcadores: *ELN* ( $0,0409 \pm 0,1418$ ) e *LIMK1* ( $0,1262 \pm 0,1255$ ), indicando a presença de duas cópias alélicas de cada marcador (Tabela 19).

Para WBS\_Grupo 1, o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de -1,000 para os dois marcadores: *ELN* ( $-0,8192 \pm 0,1192$ ) e *LIMK1* ( $-0,9104 \pm 0,1531$ ) (Tabela 19). Além disso, o valor máximo de  $\Delta KC_t$  obtido para cada marcador no WBS\_Grupo 1 (*ELN* = -0,5943 e *LIMK1* = -0,7262) foi menor que os valores mínimos de  $\Delta KC_t$  obtidos no grupo dos controles normais (*ELN* = -0,2223 e *LIMK1* = -0,1255), mostrando uma completa separação dos resultados de  $\Delta KC_t$  entre os dois grupos (Tabela 19). Esses resultados comprovam que os dezoito pacientes possuem microdeleção hemizigótica de *ELN* e *LIMK1*, indicando que todos têm síndrome de Williams-Beuren.

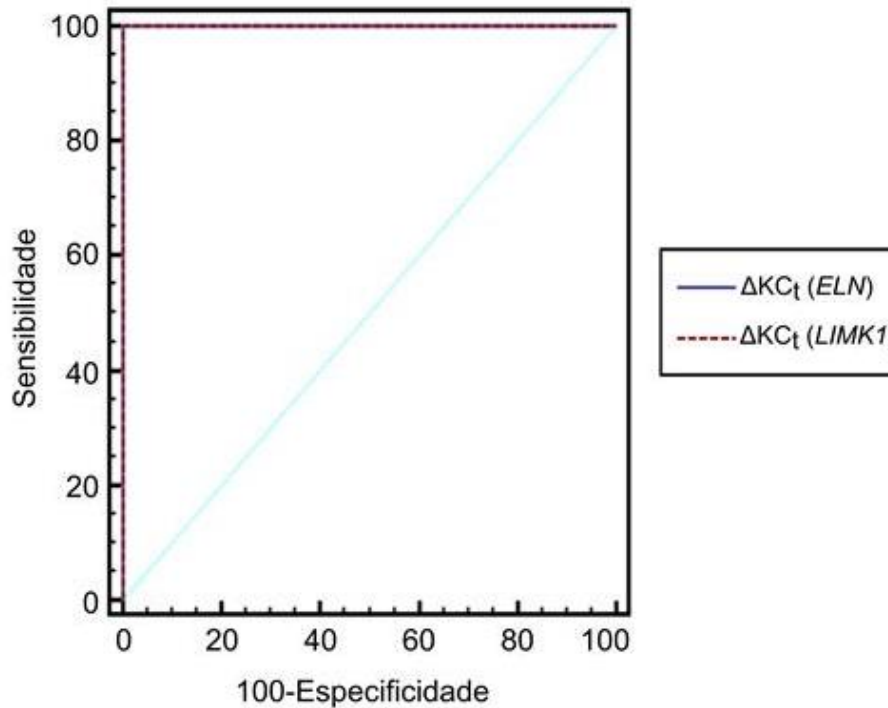
Análises estatísticas feitas com o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), corroboraram os resultados acima. Os valores de  $\Delta KC_t$  para ambos os marcadores no grupo WBS\_Controles Normais apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de D'Agostinho-Pearson (dados não mostrados). O gráfico da curva ROC é apresentado na Figura 14.

**Tabela 19. Visão geral dos resultados de  $\Delta KC_t$  para os marcadores *ELN* e *LIMK1* nos grupos WBS\_Controles Normais, WBS\_Grupo 1 e WBS\_Grupo 2**

Síndrome	Classificação	Marcador	n	$\Delta KC_t$				
				Média	SD	Mediana	Máximo	Mínimo
WBS	WBS_Controles Normais	<i>ELN</i>	50	0,0409	0,1418	0,0412	0,3233	-0,2223
		<i>LIMK1</i>	50	0,1262	0,1255	0,1171	0,3843	-0,1255
	WBS_Grupo 1	<i>ELN</i>	18	<b>-0,8192</b>	<b>0,1192</b>	-0,8250	-0,5943	-1,0490
		<i>LIMK1</i>	18	<b>-0,9104</b>	<b>0,1531</b>	-0,8576	-0,7262	-1,2101
	WBS_Grupo 2	<i>ELN</i>	10	0,1182	0,0718	0,1164	0,2307	0,0301
		<i>LIMK1</i>	10	0,1199	0,1312	0,1151	0,3629	-0,0856

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; n: tamanho da amostra; SD: desvio padrão; WBS: síndrome de Williams-Beuren.

Os resultados de  $\Delta KC_t$  (expressos como a média de  $\Delta KC_t \pm SD$ ) consistentes com a perda de uma cópia alélica são mostrados em negrito.



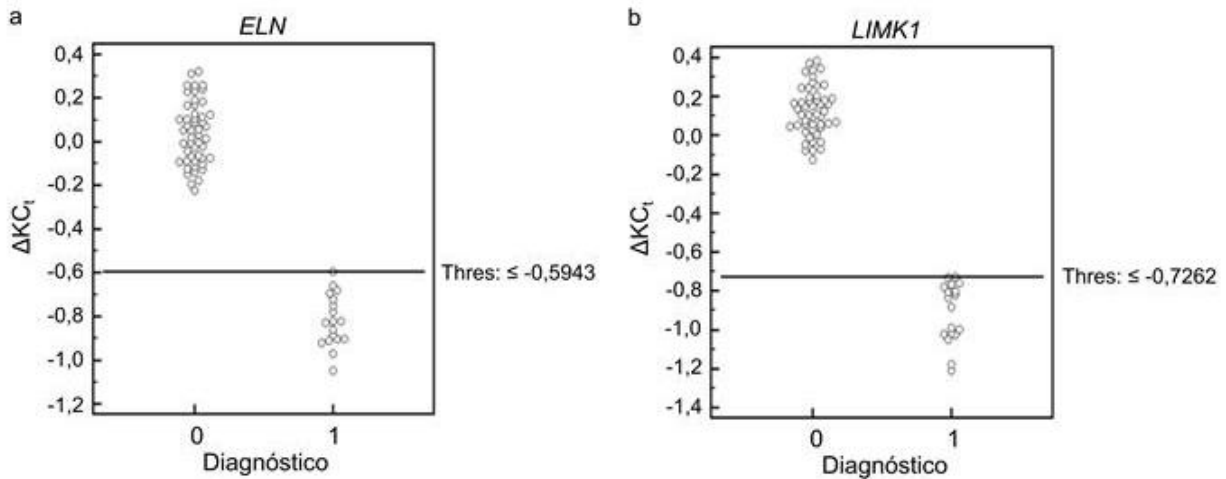
**Figura 14. Comparação das curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic curves*) para os marcadores *ELN* e *LIMK1* analisados no estudo da WBS.** Os valores de  $\Delta KC_t$  dos 50 controles normais (WBS\_Controles Normais) e dos 18 pacientes com WBS (WBS\_Grupo 1) foram considerados para determinação da curva ROC. Houve uma sobreposição das curvas ROC dos dois marcadores, com ambas alcançando o canto superior esquerdo do gráfico. A linha azul na diagonal do gráfico, também denominada “linha de não-discriminação”, é representativa de um teste que não é capaz de discriminar entre um indivíduo normal e um indivíduo doente ( $AUC = 0,5$ ). O uso simultâneo dos dois marcadores nos ensaios de qPCR resultou em um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. O valor de *threshold* escolhido para cada marcador foi:  $\Delta KC_t \leq -0,5943$  (*ELN*) e  $\Delta KC_t \leq -0,7262$  (*LIMK1*). Os gráficos foram obtidos utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Considerando o uso simultâneo dos dois marcadores nos ensaios de qPCR, a AUC e o *p-value* correspondente foram iguais a 1,000 (IC 95%; 0,947-1,000) e zero, respectivamente, indicando que não houve sobreposição dos resultados de  $\Delta KC_t$  dos dois grupos (positivo e controles normais) e que a qPCR foi capaz de diferenciar um grupo do outro. A utilização desses dois marcadores resultou em um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade (IC 95%; 81,5-100,0) e 100% de especificidade (IC 95%; 92,9-100,0).

O valor de *threshold* escolhido para cada marcador foi:  $\Delta KC_t \leq -0,5943$  (*ELN*) e  $\Delta KC_t \leq -0,7262$  (*LIMK1*). Dessa forma, pode-se dizer, por exemplo, que indivíduos que apresentam valores de  $\Delta KC_t \leq -0,7262$  e indivíduos que mostram valores de  $\Delta KC_t > -0,7262$  podem ser identificados, respectivamente, como portadores e não portadores de deleção hemizigótica do gene *LIMK1*. O mesmo raciocínio é aplicado ao marcador *ELN*. Para ambos os marcadores foi obtido um *dot plot* utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) (Figura 15).

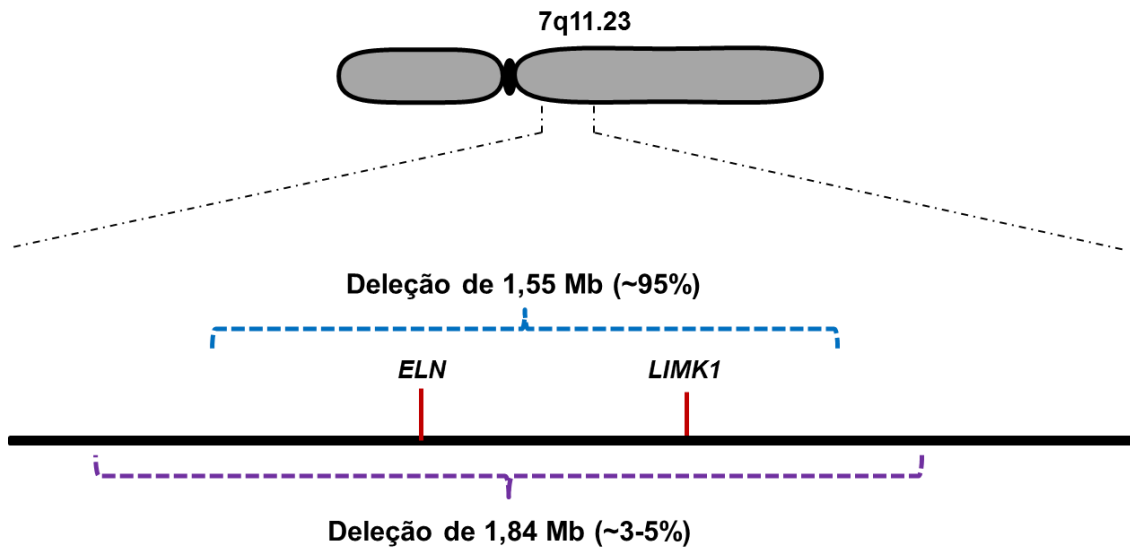
Para WBS\_Grupo 2, o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de zero para os dois marcadores: *ELN* ( $0,1182 \pm 0,0718$ ) e *LIMK1* ( $0,1199 \pm 0,1312$ ) (Tabela 19). Os valores de  $\Delta KC_t$  obtidos para cada marcador nesse grupo (*ELN*: de 0,0301 a 0,2307; *LIMK1*: de -0,0856 a 0,3629) situaram-se entre os valores mínimo (*ELN* = -0,2223; *LIMK1* = -0,1255) e máximo (*ELN* = 0,3233; *LIMK1* = 0,3843) apresentados pelo grupo dos controles normais (Tabela 19). Além disso, o valor mínimo de  $\Delta KC_t$  obtido para cada marcador no WBS\_Grupo 2 (*ELN* = 0,0301 e *LIMK1* = -0,0856) foi maior que o valor de  $\Delta KC_t$  escolhido como *threshold* para *ELN* ( $\Delta KC_t \leq -0,5943$ ) e *LIMK1* ( $\Delta KC_t \leq -0,7262$ ) (Tabela 19). Então, os resultados apresentados pelo WBS\_Grupo 2 mostram que os dez pacientes possuem duas cópias alélicas de ambos os marcadores. Sabendo-se que esses marcadores estão localizados dentro da região crítica da síndrome de Williams-Beuren (1,55 Mb) (Figura 16), podemos dizer que a triagem molecular desses pacientes por qPCR é sugestiva de um diagnóstico negativo para essa síndrome.

Todos os resultados obtidos para a síndrome de Williams-Beuren usando a metodologia de qPCR mostraram 100% de concordância com os resultados previamente determinados por aCGH, marcadores microssatélites e MQF-PCR, comprovando a eficiência da qPCR na detecção de microdeleções na região 7q11.23.



**Figura 15. Dot plot para os marcadores analisados no estudo da WBS: (a) *ELN* e (b) *LIMK1*.** Os valores de  $\Delta KC_t$  dos 50 controles normais (WBS\_Controles Normais) e dos 18 pacientes com WBS (WBS\_Grupo 1) foram considerados para construção do *dot plot*. O valor de *threshold* (Thres) é mostrado no lado direito de cada gráfico. No eixo horizontal (Diagnóstico), o número zero representa o grupo negativo (WBS\_Controles Normais) e o número 1 representa o grupo positivo (WBS\_Grupo 1). Cada indivíduo é representado por um círculo dentro do gráfico. A linha horizontal dentro do gráfico indica o valor de *threshold*, que corresponde ao valor de  $\Delta KC_t$  escolhido como limite de separação entre os dois grupos. O uso simultâneo desses marcadores nos ensaios de qPCR resultou em um teste com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Os gráficos foram obtidos utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).



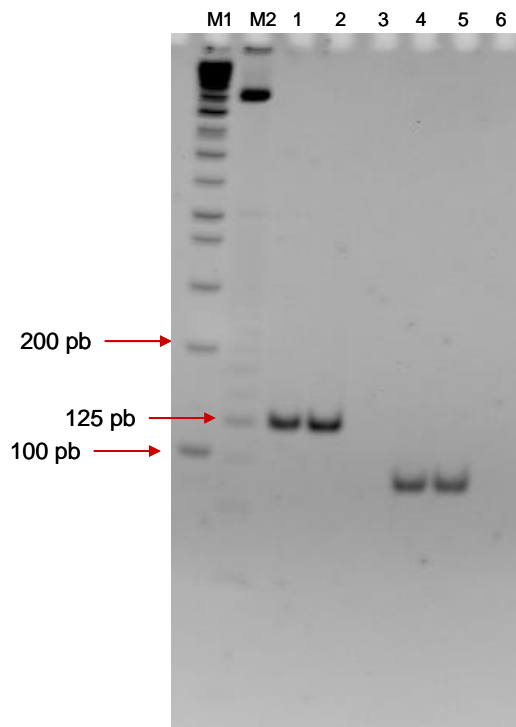


**Figura 16. Representação esquemática da região 7q11.23 e localização dos marcadores *ELN* e *LIMK1*.** Os dois marcadores estão localizados dentro da região crítica de 1,55 Mb, cuja deleção é relatada em aproximadamente 95% dos indivíduos afetados. Ambos os marcadores estão localizados também dentro da região de 1,84 Mb, o segundo intervalo de deleção mais comum da WBS, e que é encontrado em cerca de 3-5% dos pacientes.

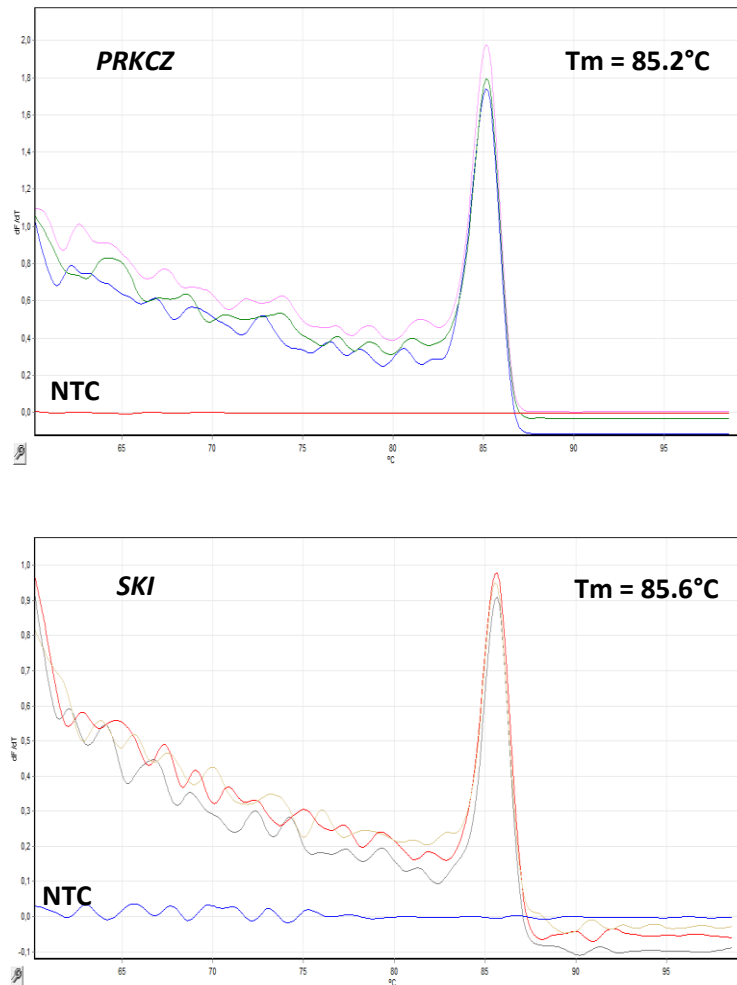
#### 4.4.3- Resultados de qPCR para a monossomia 1p36

No estudo da monossomia 1p36, a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes alvo *PRKCZ* e *SKI*, customizados exclusivamente para esse trabalho, foi comprovada por experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida (5%), que mostraram a presença de uma banda única e do tamanho esperado para cada marcador (Figura 17). Análises da curva de dissociação mostraram a presença de um pico único e bem definido e ausência de dímeros de *primers* para cada marcador analisado, corroborando os resultados acima e confirmando a especificidade dos ensaios de qPCR para a monossomia 1p36 (Figura 18). Todos os resultados correspondentes ao gene de referência *HMBS* (seq. 2) já foram mostrados no item anterior (item 4.4.2) e, portanto, não serão apresentados nessa seção.

As concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores foram otimizadas (Tabela 20) e foram obtidas curvas padrão para os marcadores *PRKCZ* e *SKI* (Figura A12 em anexo). Considerando as eficiências de amplificação do gene de referência *HMBS* (seq. 2) determinada anteriormente e dos genes alvo *PRKCZ* e *SKI*, podemos dizer que as reações de qPCR para a monossomia 1p36 ocorreram com alta eficiência (maiores que 94%), com valores de  $R^2$  maiores que 0,99 (Tabela 21).



**Figura 17.** Gel de poliacrilamida (5%) corado com brometo de etídeo mostrando o tamanho dos *amplicons* produzidos a partir da amplificação por PCR com cada par de iniciadores usados no estudo da monossomia 1p36. A ordem da numeração é: (M1) Marcador *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen<sup>TM</sup>); (M2) Marcador de 25 pb; (1 e 2) *Amplicon* de 125 pb correspondente à amplificação de *PRKCZ*; (3) Controle branco de amplificação de *PRKCZ*; (4 e 5) *Amplicon* de 85 pb correspondente à amplificação de *SKI*; (6) Controle branco de amplificação de *SKI*.



**Figura 18.** Curva de dissociação dos marcadores *PRKCZ* e *SKI* com indicação do  $T_m$  de cada *amplicon*. A curva de dissociação para ambos os marcadores mostrou a presença de um pico único e bem definido, correspondente ao  $T_m$  de cada *amplicon* analisado, e ausência de dímeros de *primers*. NTC: *No Template Control*. Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).

**Tabela 20. Concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador usado no estudo da monossomia 1p36 determinada através do teste de concentração de *primers***

<b>Síndrome</b>	<b>Nome do oligonucleotídeo</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
Monossomia 1p36	PRKCZ-F	0,2
	PRKCZ-R	0,2
	SKI-F	0,1
	SKI-R	0,1

**Tabela 21. *Slope*, eficiência de amplificação da qPCR e valores de  $R^2$  para os genes alvo analisados no estudo da monossomia 1p36**

<b>Síndrome</b>	<b>Marcador</b>	<b><i>Slope</i></b>	<b>Eficiência de amplificação</b>	<b><math>R^2</math></b>
Monossomia 1p36	<i>PRKCZ</i>	-3,1950	94,42%	0,9981
	<i>SKI</i>	-3,1910	94,23%	0,9975

$R^2$ : coeficiente de determinação.

O cálculo de  $\Delta KC_t$  para os marcadores *PRKCZ* e *SKI* foi feito considerando os grupos 1p36\_Controles Normais (Tabela A13 em anexo) e 1p36\_Grupo 1 (Tabela A14 em anexo), com uma visão geral dos resultados de  $\Delta KC_t$  sendo apresentada na Tabela 22.

Para o grupo 1p36\_Controles Normais, o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de zero para ambos os marcadores: *PRKCZ* ( $-0,0612 \pm 0,1554$ ) e *SKI* ( $-0,1264 \pm 0,1401$ ), indicando a presença de duas cópias alélicas de cada marcador (Tabela 22).

Para 1p36\_Grupo 1, o valor da média de  $\Delta KC_t \pm SD$  ficou próximo de  $-1,000$  para os dois marcadores: *PRKCZ* ( $-0,9696 \pm 0,1649$ ) e *SKI* ( $-1,0287 \pm 0,2880$ ) (Tabela 22). Para o marcador *PRKCZ*, o valor máximo de  $\Delta KC_t$  no 1p36\_Grupo 1 ( $-0,6676$ ) foi menor que o valor mínimo de  $\Delta KC_t$  obtido no grupo dos controles normais ( $-0,3661$ ), mostrando uma completa separação dos resultados de *PRKCZ* entre os dois grupos (Tabela 22). Esses resultados mostram que os 39 pacientes possuem microdeleção hemizigótica de *PRKCZ*, o que por sua vez é suficiente para identificá-los como portadores de monossomia 1p36.

Nas análises do marcador *SKI*, um dos pacientes (indivíduo 11 da Tabela A14 em anexo) apresentou um valor de  $\Delta KC_t$  próximo de zero ( $-0,2876$ ), correspondente ao valor máximo de  $\Delta KC_t$  obtido para esse marcador no 1p36\_Grupo 1 (Tabela 22). Esse resultado de  $\Delta KC_t$  se situou entre os valores mínimo ( $-0,3794$ ) e máximo ( $0,1956$ ) apresentados pelo grupo dos controles normais para o marcador *SKI* (Tabela 22), indicando a não-deleção de *SKI* nesse paciente. Entretanto, o paciente 11 apresentou hemizigosidade do gene *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1,2278$ ), confirmando que esse indivíduo tem monossomia 1p36 (Tabela A14 em anexo). Resultados iguais foram obtidos por MLPA (dados não mostrados). Para os demais 38 pacientes, os resultados de  $\Delta KC_t$  para o marcador *SKI* ( $-0,5479$  a  $-1,5803$ ) foram menores que o valor mínimo de  $\Delta KC_t$  no grupo dos controles normais ( $-0,3794$ ), mostrando uma completa separação dos resultados de *SKI* entre os 38 pacientes e os 50 controles normais (Tabela 22). Esses resultados indicam que os 38 pacientes apresentam microdeleção hemizigótica de *SKI*.

**Tabela 22. Visão geral dos resultados de  $\Delta KC_t$  para os marcadores *PRKCZ* e *SKI* nos grupos 1p36\_Controles Normais e 1p36\_Grupo 1**

Síndrome	Classificação	Marcador	n	$\Delta KC_t$				
				Média	SD	Mediana	Máximo	Mínimo
Monossomia 1p36	1p36_Controles Normais	<i>PRKCZ</i>	50	-0,0612	0,1554	-0,0533	0,3551	-0,3661
		<i>SKI</i>	50	-0,1264	0,1401	-0,1514	0,1956	-0,3794
	1p36_Grupo 1	<i>PRKCZ</i>	39	<b>-0,9696</b>	<b>0,1649</b>	-0,9634	-0,6676	-1,2644
		<i>SKI</i>	39	<b>-1,0287</b>	<b>0,2880</b>	-1,0710	-0,2876 <sup>a</sup>	-1,5803

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; n: tamanho da amostra; SD: desvio padrão.

Os resultados de  $\Delta KC_t$  (expressos como a média de  $\Delta KC_t \pm SD$ ) consistentes com a perda de uma cópia alélica são mostrados em negrito.

<sup>a</sup>Resultado de  $\Delta KC_t$  obtido para o paciente 11 (indivíduo 11 na Tabela A14 em anexo), indicativo de não-deleção do gene *SKI*. Esse paciente apresentou hemizigosidade do gene *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1,2278$ ), confirmando que ele tem monossomia 1p36. Resultados iguais foram obtidos por MLPA (dados não mostrados). Os demais 38 pacientes apresentaram resultados de  $\Delta KC_t$  correspondentes à microdeleção hemizigótica de *SKI* (-0,5479 a -1,5803) e *PRKCZ* (-0,6676 a -1,2644).

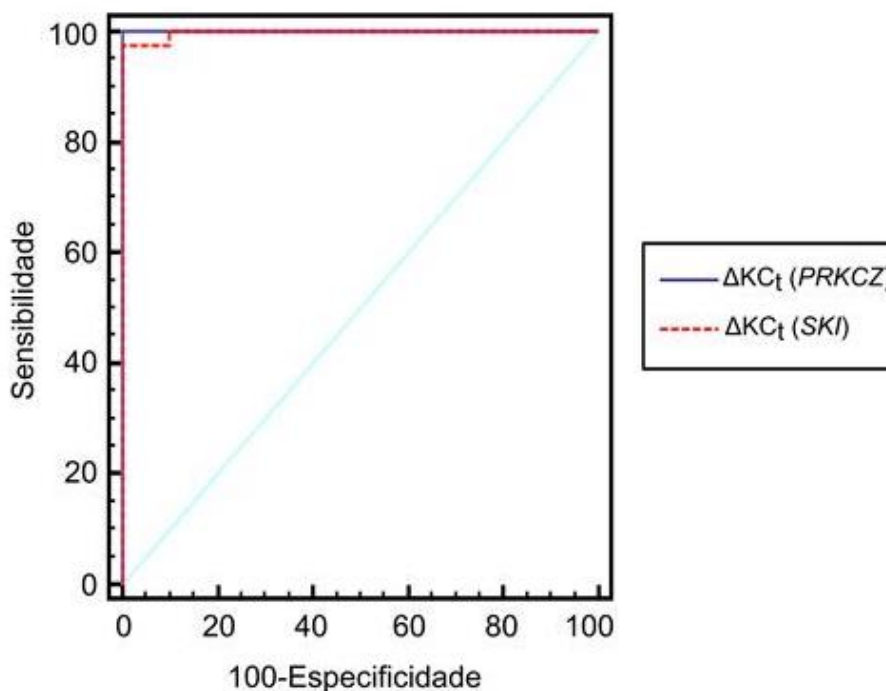


Análises estatísticas feitas com o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium), corroboraram os resultados descritos acima. Os valores de  $\Delta KC_t$  para os dois marcadores no grupo 1p36\_Controles Normais apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de D'Agostinho-Pearson (dados não mostrados). O gráfico da curva ROC é apresentado na Figura 19.

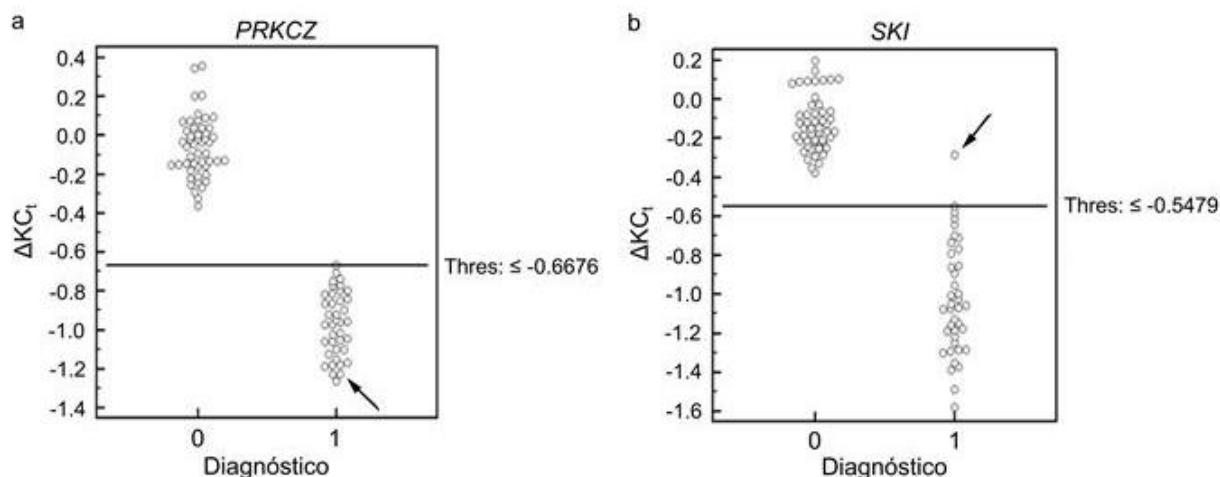
Considerando o uso simultâneo dos dois marcadores nos ensaios de qPCR, a AUC e o *p-value* correspondente foram iguais a 1,000 (IC 95%; 0,959-1,000) e zero, respectivamente, confirmando que a técnica de qPCR foi capaz de diferenciar entre um indivíduo portador de microdeleção hemizigótica na região 1p36 e um indivíduo normal. A utilização desses dois marcadores resultou em um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade (IC 95%; 91,0-100,0) e 100% de especificidade (IC 95%; 92,9-100,0).

Como pode ser observado na Figura 19, houve um pequeno distanciamento da curva ROC a partir do canto superior esquerdo do gráfico na análise correspondente ao marcador *SKI*. A explicação para esse fato reside no resultado de  $\Delta KC_t$  obtido para o paciente 11 (-0,2876). O *software MedCalc* interpretou esse resultado como sendo falso negativo, ou seja, um indivíduo sabidamente positivo mas cujo resultado do teste diagnóstico erroneamente classificou-o como normal. No entanto, como foi anteriormente explicado, esse paciente também não mostrou deleção do gene *SKI* através da técnica de MLPA e, portanto, já era esperado que ele apresentasse um valor de  $\Delta KC_t$  para esse marcador semelhante ao de um indivíduo normal ( $\Delta KC_t$  próximo de zero). Ou seja, o resultado obtido por qPCR é verdadeiro negativo para o marcador *SKI* nesse paciente, novamente corroborando que o teste duplo de qPCR proposto no presente trabalho é 100% sensível e 100% específico para detectar microdeleções na região 1p36.

O valor de *threshold* escolhido para cada marcador foi:  $\Delta KC_t \leq -0,6676$  (*PRKCZ*) e  $\Delta KC_t \leq -0,5479$  (*SKI*). Dessa forma, pode-se dizer, por exemplo, que indivíduos que apresentam valores de  $\Delta KC_t \leq -0,6676$  e indivíduos que mostram valores de  $\Delta KC_t > -0,6676$  podem ser identificados, respectivamente, como portadores e não portadores de microdeleção hemizigótica do gene *PRKCZ*. O mesmo raciocínio é aplicado ao marcador *SKI*. A presença de um único gene deletado é, por si só, suficiente para diagnosticar um paciente como portador de monossomia 1p36. Para ambos os marcadores foi obtido um *dot plot* utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) (Figura 20).



**Figura 19. Comparação das curvas ROC (Receiver Operating Characteristic curves) para os marcadores *PRKCZ* e *SKI* analisados no estudo da monossomia 1p36.** Os valores de  $\Delta KC_t$  dos 50 controles normais (1p36\_Controles Normais) e dos 39 pacientes com monossomia 1p36 (1p36\_Grupo 1) foram considerados para determinação da curva ROC. Para o marcador *PRKCZ* a curva ROC alcançou o canto superior esquerdo do gráfico, e para o marcador *SKI* a curva ROC distanciou-se ligeiramente dessa posição (explicação no corpo do texto). A linha azul na diagonal do gráfico, também denominada “linha de não-discriminação”, é representativa de um teste que não é capaz de discriminar entre um indivíduo normal e um indivíduo doente ( $AUC = 0,5$ ). O uso simultâneo desses dois marcadores nos ensaios de qPCR resultou em um teste diagnóstico com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. O valor de *threshold* escolhido para cada marcador foi:  $\Delta KC_t \leq -0,6676$  (*PRKCZ*) e  $\Delta KC_t \leq -0,5479$  (*SKI*). Os gráficos foram obtidos utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).



**Figura 20. Dot plot para os marcadores analisados no estudo da monossomia 1p36:**

(a) *PRKCZ* e (b) *SKI*. Os valores de  $\Delta KC_t$  dos 50 controles normais (1p36\_Controles Normais) e dos 39 pacientes com monossomia 1p36 (1p36\_Grupo 1) foram considerados para construção do dot plot. O valor de *threshold* (Thres) é mostrado no lado direito de cada gráfico. No eixo horizontal (Diagnóstico), o número zero representa o grupo negativo (1p36\_Controles normais) e o número 1 representa o grupo positivo (1p36\_Grupo 1). Cada indivíduo é representado por um círculo dentro do gráfico. A linha horizontal dentro do gráfico indica o valor de *threshold*, que corresponde ao valor de  $\Delta KC_t$  escolhido como limite de separação entre os dois grupos. O resultado de  $\Delta KC_t$  do paciente 11 é indicado por uma seta preta em ambos os gráficos. Esse paciente não apresentou deleção do gene *SKI* ( $\Delta KC_t = -0,2876$ ), mas ele mostrou hemizigosidade de *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1,2278$ ), confirmando que ele tem monossomia 1p36. Resultados iguais foram obtidos por MLPA (dados não mostrados). O uso simultâneo desses dois marcadores nos ensaios de qPCR resultou em um teste com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Os gráficos foram obtidos utilizando o software *MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

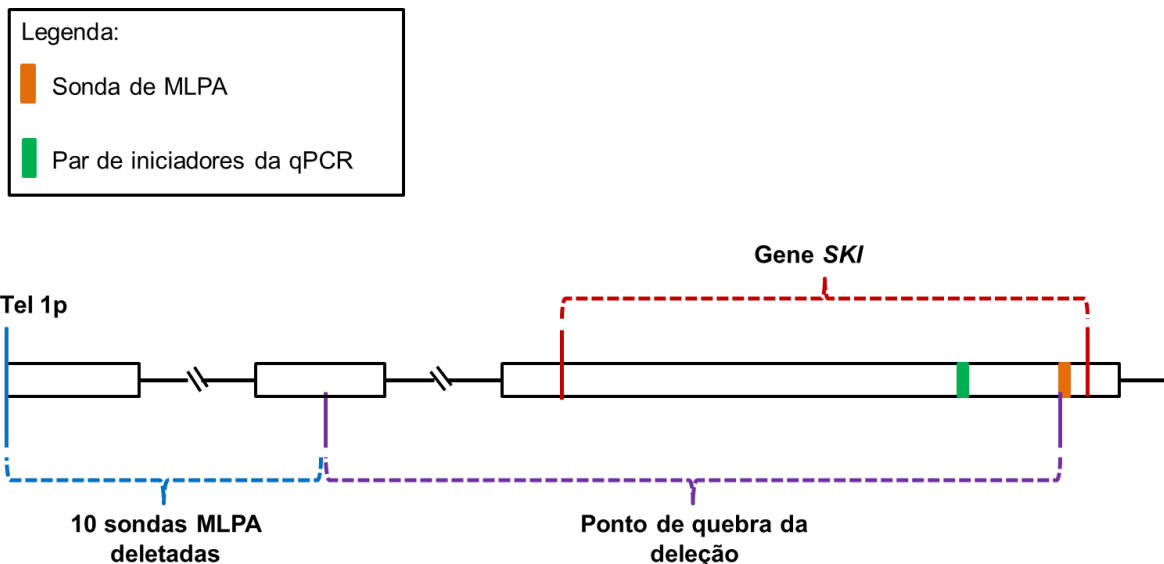
Todos os resultados obtidos para a monossomia 1p36 usando a técnica de qPCR foram suportados pelos resultados previamente obtidos por outros métodos de análises (aCGH, FISH e MLPA). Entretanto, apesar de todos os 39 pacientes terem apresentado resultados positivos por todas as técnicas utilizadas, um esclarecimento deve ser feito em relação ao paciente 10 (indivíduo 10 na Tabela A14 em anexo). Para a maioria dos pacientes de 1p36\_Grupo 1 foi possível determinar que ambos os genes, *PRKCZ* e *SKI*, estavam entre os genes deletados usando as técnicas descritas acima. No caso específico do paciente 10, houve uma divergência nos resultados obtidos especificamente para o gene *SKI*. De acordo com o resultado prévio de MLPA, o paciente 10 é portador de uma translocação desbalanceada entre as regiões subteloméricas 1p e 7q, apresentando uma deleção 1p36 de aproximadamente 1,9-2,2 Mb e uma duplicação 7q cujo tamanho não foi determinado (dados não mostrados). Além disso, a análise por MLPA mostrou que o ponto de quebra da deleção nesse paciente ocorreu entre as coordenadas genômicas chr1:1,956,418-2,237,544 de acordo com o *UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly* (GRCh37/hg19; <http://genome.ucsc.edu/>). Entretanto, apesar do ponto de quebra da deleção incluir parte do gene *SKI*, a sonda de MLPA específica para *SKI* permaneceu intacta nesse paciente. Por outro lado, de acordo com os resultados de qPCR, esse paciente apresentou deleção de ambos os genes: *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1,1885$ ) e *SKI* ( $\Delta KC_t = -1,0710$ ) (Tabela A14 em anexo). Após verificar essa divergência nos resultados nós optamos por repetir a qPCR para o paciente 10, apenas com o objetivo de garantir que nenhum fator (ex: erros de pipetagem) tenha adversamente afetado o primeiro ensaio de qPCR para esse paciente. Como esperado, o resultado foi o mesmo da primeira corrida. Então, uma possível explicação para essa divergência é que a sonda de MLPA e o par de oligonucleotídeos iniciadores da qPCR mapeiam regiões diferentes dentro do gene *SKI*. O gene *SKI* está mapeado entre as coordenadas genômicas chr1:2,160,134-2,241,652 (*UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly*); a sonda de MLPA está mapeada entre as coordenadas chr1:2,237,544-2,237,607 (*UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly*); e o par de iniciadores da qPCR está mapeado entre as coordenadas chr1:2,221,777-2,221,861 (*UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly*). Então, sabendo-se que esse paciente apresentou deleção de dez sondas 1p36 distais à sonda de *SKI* (dados não mostrados) e que o par de iniciadores da qPCR também está localizado distal a essa sonda, é provável que o paciente 10 tenha parte do gene *SKI* deletado (região de localização dos

iniciadores da qPCR) e outra parte intacto (região de localização da sonda de MLPA) (Figura 21).

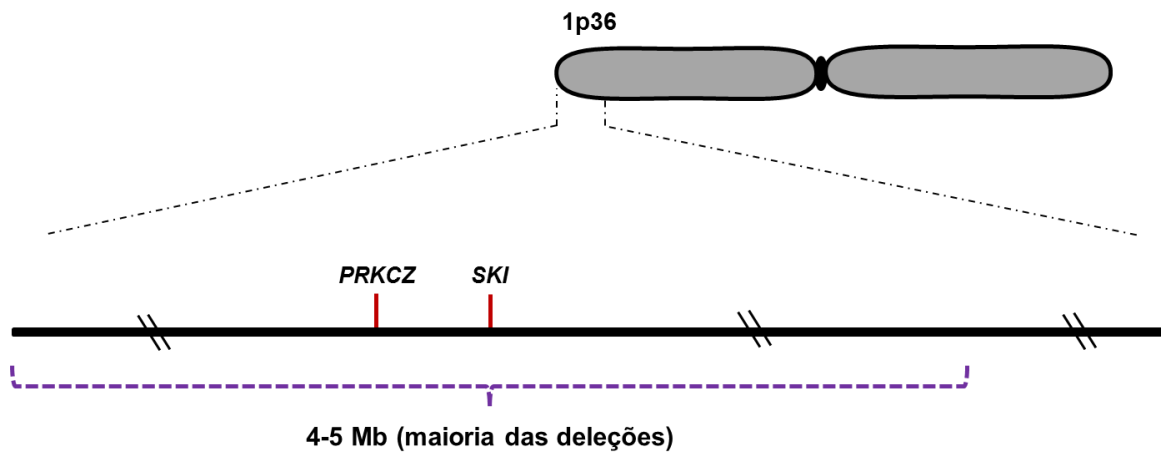
De forma geral, podemos dizer que a metodologia de qPCR foi eficiente e precisa para a detecção de microdeleções na região 1p36. Sabendo-se que os genes *PRKCZ* e *SKI* estão localizados dentro da região que contém a maioria das deleções (4-5 Mb a partir do telômero 1p) (Figura 22), podemos dizer que o ensaio de qPCR apresentado aqui possibilitaria a identificação da maioria dos pacientes com monossomia 1p36.

#### **4.4.4- Custo de um teste de triagem molecular por qPCR**

Para o cálculo do custo de um teste de triagem por qPCR de um paciente com suspeita clínica de VCFS, WBS ou monossomia 1p36, nós consideramos o uso de três marcadores no ensaio de qPCR: dois genes alvo e um gene de referência. O custo seria de aproximadamente R\$ 39,11 (Tabela A15 em anexo) considerando somente os reagentes envolvidos no processo, desde a etapa de extração de DNA até a qPCR. Nesse cálculo não foram considerados os custos com materiais de laboratório, equipamentos, mão de obra e aqueles relacionados à estrutura de apoio do laboratório (ex: área administrativa, instalações laboratoriais, serviço de limpeza, taxas de água/esgoto, etc.). O processo de triagem completo, desde a extração de DNA genômico até a análise dos dados de qPCR, poderia ser realizado em um curto período de tempo (aproximadamente 8 horas). Tabelas contendo todos os dados utilizados para esse cálculo e incluindo algumas informações adicionais são apresentadas nos anexos (Tabela A15 e Tabela A16).



**Figura 21. Representação esquemática da região 1p36 mostrando a localização da sonda de MLPA e do par de iniciadores da qPCR para o gene *SKI* e o ponto de quebra da deleção no paciente 10.** Resultados prévios de MLPA mostraram que o ponto de quebra da deleção nesse paciente ocorreu entre as coordenadas genômicas chr1:1,956,418-2,237,544 (*UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly*). Entretanto, apesar do ponto de quebra da deleção incluir parte do gene *SKI*, a sonda de MLPA específica para *SKI* permaneceu intacta nesse paciente. Por outro lado, os resultados da qPCR mostraram deleção de ambos os genes: *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1,1885$ ) e *SKI* ( $\Delta KC_t = -1,0710$ ). Uma possível explicação para essa divergência é que a sonda de MLPA e o par de iniciadores da qPCR mapeiam regiões diferentes dentro do gene *SKI*, de tal forma que o paciente 10 provavelmente possui parte do gene *SKI* deletado (região de localização dos iniciadores da qPCR) e outra parte intacto (região de localização da sonda de MLPA). As coordenadas genômicas do gene *SKI*, da sonda de MLPA e do par de iniciadores da qPCR são, respectivamente: chr1:2,160,134-2,241,652, chr1:2,237,544-2,237,607 e chr1:2,221,777-2,221,861 (*UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly*).



**Figura 22. Representação esquemática da região 1p36 e localização dos marcadores *PRKCZ* e *SKI*.** Os dois marcadores estão localizados dentro da região que contém a maioria das deleções 1p36 (4-5 Mb a partir do telômero 1p).

## 4.5- Discussão

A deficiência intelectual é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns em crianças e adolescentes (Vasconcelos et al., 2004), afetando aproximadamente 3% da população mundial (Shaffer e Bejjani, 2009). Estima-se que no Brasil, a cada ano, surjam mais de 90.000 novos casos (Pena, 2005; Pena, 2008). Dado que 20-50% dos casos de DI são causados por anormalidades cromossômicas (Shaffer e Bejjani, 2009), é altamente recomendado que, após o diagnóstico clínico, seja feita uma triagem molecular. Algumas síndromes de microdeleção cromossômica de alta prevalência na população possuem a DI e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor como importantes características fenotípicas. Dentre elas destacam-se: síndrome velocardiofacial, síndrome de Williams-Beuren e monossomia 1p36. Considerando-se a prevalência da síndrome velocardiofacial e uma taxa de natalidade brasileira de cerca de 2.800.000 nascidos vivos (Brasil Ministério da Saúde, 2010), uma incidência de aproximadamente 700 novos casos de VCFS seria esperado a cada ano (Viera et al., 2013).

No Brasil, infelizmente, o diagnóstico etiológico da DI é medicamente negligenciado e só pode ser estabelecido em bem menos de 50% dos casos (Pena, 2005; Pena, 2008). Isso ocorre devido a grande dificuldade de acesso às metodologias citogenômicas modernas (Pena, 2005; Pena, 2008), tais como aCGH e FISH, que são muito dispendiosas e, portanto, inadequadas à realidade brasileira de recursos limitados. Embora o cariótipo seja o único teste genético fornecido pelo SUS, ele está disponível apenas em alguns laboratórios, geralmente aqueles ligados às universidades, com recursos humanos limitados. Além disso, análises de cariótipo não são capazes de detectar microdeleções (Vieira et al., 2013). Somente alguns laboratórios possuem equipamentos que permitem a realização de análises cromossômicas de alta resolução, FISH e testes de DNA (Marques-de-Faria et al., 2004; Horovitz et al., 2006).

Considerando-se as características do sistema público de saúde brasileiro, a atual situação dos serviços de diagnóstico genético e também a alta prevalência de síndromes de microdeleção que levam à DI e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, o objetivo principal desse estudo foi contribuir para a otimização de estratégias para o diagnóstico genético no Brasil e que possam ser estendidas a outros países em desenvolvimento. Diante desse cenário, nós vimos na técnica de qPCR a solução mais



viável, pois trata-se de uma metodologia de baixo custo, mas que é ao mesmo tempo sensível e específica, o que permitiria a toda população ter acesso a um diagnóstico genético de qualidade nos serviços públicos de saúde.

No presente estudo, nós utilizamos a metodologia de qPCR como um teste de triagem molecular para detecção de microdeleções associadas à síndrome velocardiocfacial, síndrome de Williams-Beuren e monossomia 1p36. Trabalhos anteriores relataram a aplicação dessa metodologia no estudo da VCFS (Weksberg et al. 2005; Chen et al. 2006b; Weksberg et al. 2007; Frigerio et al. 2011) e da WBS (Howald et al. 2006; Schubert e Laccone, 2006). Entretanto, eles fizeram uso de um número relativamente grande de marcadores, localizados dentro e ao redor da região crítica de deleção de cada síndrome. Até o momento, nenhum estudo sobre a monossomia 1p36 foi publicado utilizando a metodologia de qPCR. Então, para direcionar o uso da técnica de qPCR para o nosso objetivo, nós utilizamos um número reduzido de marcadores, todos localizados dentro da região comumente deletada de cada síndrome (região onde está localizada a maioria das deleções), possibilitando a identificação da maioria dos pacientes afetados.

A discussão referente a cada síndrome será apresentada separadamente, assim como foi feito no tópico “Resultados”.

#### **4.5.1- Síndrome velocardiocfacial**

No estudo da síndrome velocardiocfacial, nós trabalhamos com quatro marcadores localizados dentro da região crítica de deleção, selecionados a partir de um grupo de dez marcadores descritos por Weksberg et al. (2005). Esses autores utilizaram dois genes de referência, *G6PDH* e *HMBS*, dos quais nós escolhemos o segundo para o nosso estudo [*HMBS* (seq. 1)]. Nesse trabalho, eles escolheram validar o uso da técnica de qPCR para a detecção de microdeleções e microduplicações cromossômicas usando a síndrome velocardiocfacial como um modelo teste. Analisaram-se 12 pacientes com características clínicas da síndrome, quatro controles normais e uma amostra com trissomia do cromossomo 22. O diagnóstico prévio por FISH, utilizando a sonda para o gene *TUPLE1*, separou os 12 pacientes em dois grupos: 6 positivos (grupo 1) e 6 negativos (grupo 2) para microdeleções na região 22q11.2. Os resultados de qPCR mostraram 100% de concordância com os resultados obtidos por FISH, sendo que os 6 pacientes do grupo 1 mostraram deleção de oito dos dez marcadores utilizados, todos

localizados dentro da região tipicamente deletada de 3 Mb. A amostra com trissomia do cromossomo 22 apresentou duplicação dos oito marcadores localizados na região de 3 Mb e mostrou duas cópias dos outros dois marcadores, que flanqueavam a região crítica de deleção.

No presente trabalho, os quatro marcadores utilizados nos ensaios de qPCR mostraram-se eficientes na identificação de pacientes portadores de microdeleções na região 22q11.2, não apresentando resultados falso positivos ou falso negativos. Por outro lado, Frigerio et al. (2011) selecionaram seis marcadores (*COMT*, *D22S181*, *D22S936*, *PRODH*, *TUPLE1* e *VPREB1*) descritos por Weksberg et al. (2005) e encontraram resultados falso positivos para seis pacientes utilizando o marcador *VPREB1*.

Dos dez marcadores descritos por Weksberg et al. (2005), oito estavam localizados na região tipicamente deletada de 3 Mb, sendo que três deles também estavam incluídos dentro do segundo intervalo mais comum de deleção (1,5 Mb). Os outros dois marcadores flanqueavam a região crítica. Para garantir a detecção do maior número possível de indivíduos afetados, nós escolhemos aleatoriamente quatro marcadores localizados dentro da região crítica de 3 Mb (*COMT*, *PI4KA*, *PRODH* e *SLC7A4*), mas de tal forma que dois deles estivessem também dentro da região de 1,5 Mb (*COMT* e *PRODH*) (Figura 11). Sabendo-se que a deleção de 3 Mb é relatada em aproximadamente 90% dos indivíduos afetados e a deleção de 1,5 Mb é encontrada em cerca de 8% dos pacientes (Scambler 2000; Shaikh et al., 2000; Shprintzen, 2008; Michaelovsky et al., 2012), podemos dizer que o uso de apenas dois marcadores (*COMT* e *PRODH*) seria suficiente e efetivo para a detecção de aproximadamente 98% dos indivíduos afetados. Por isso, nós sugerimos a utilização dos genes alvos *COMT* e *PRODH*, dentre os quatro marcadores analisados no presente trabalho, para a triagem molecular por qPCR de pacientes com suspeita clínica da VCFS.

No caso específico dos dezesseis pacientes do VCFS\_Grupo 2 que, apesar de apresentarem sinais clínicos sugestivos da síndrome, foram previamente diagnosticados como negativos (microsatélites e MQF-PCR) e não mostraram microdeleções dos quatro marcadores por qPCR, podemos dizer que existe aproximadamente 98% de probabilidade de não serem portadores da síndrome. Entretanto, se esses pacientes forem portadores de microdeleções atípicas, eles podem não ser detectados pela técnica de qPCR, pois trata-se de um método de triagem loco-específico, assim como o método de FISH. Pacientes portadores de microdeleções atípicas, que representam uma pequena

porcentagem do total de indivíduos afetados (aproximadamente 2%), são mais precisamente identificados por métodos de triagem de todo o genoma, como o aCGH.

Chen et al. (2006b) analisaram pacientes com suspeita clínica de DGS/VCFS utilizando um total de cinco marcadores nos ensaios de qPCR: três marcadores localizados na região crítica de 3 Mb e dois marcadores localizados nas extremidades proximal e distal flanqueando essa região. Vinte e oito de um total de 122 pacientes foram diagnosticados como positivos e apresentaram deleções dos três marcadores localizados na região crítica, com esses resultados sendo posteriormente confirmados por FISH. Weksberg et al. (2007), em um outro estudo envolvendo 44 indivíduos com diagnóstico clínico de síndrome de deleção 22q11 (22q11DS), utilizaram 36 marcadores de qPCR para caracterizar os pontos de quebra das deleções. Eles observaram a deleção do gene *COMT* em todos os 44 pacientes e a deleção de *PRODH* em 40 indivíduos, confirmando a deleção desses genes em grande porcentagem dos indivíduos afetados. Ao contrário dos estudos acima que utilizaram o reagente *SYBR® Green* nos ensaios de qPCR, Kariyazono et al. (2001) utilizaram uma sonda *TaqMan®* específica para o gene *UFDIL* localizado na região crítica de 3 Mb para detectar deleções 22q11.2 em 29 pacientes previamente diagnosticados por FISH. Eles obtiveram uma correlação estatística de 99,7% entre os dois métodos. De forma semelhante, Tomita-Mitchell et al. (2010) realizaram ensaios de qPCR *multiplex* (MQPCR – *multiplexed quantitative real-time PCR*) utilizando uma sonda *TaqMan®* específica para o gene *TBX1* na região 22q11.2. Vinte e um indivíduos, de um total de 382, foram identificados como portadores de microdeleção hemizigótica de *TBX1*. Entretanto, de forma geral, ensaios de qPCR realizados com sondas *TaqMan®* tendem a apresentar custo mais elevado do que aqueles feitos com o reagente *SYBR® Green*. Além disso, o diagnóstico feito utilizando uma única sonda *TaqMan®* tende a ter uma taxa superior de erros de classificação (Chen et al., 2006b).

Fernández et al. (2005), em um grupo de 30 pacientes previamente diagnosticados por FISH como portadores de deleções 22q11.2, encontraram 24 deleções de 3 Mb, 6 deleções de 1,5 Mb e nenhuma deleção atípica quando usaram a técnica de MLPA. Stachon et al. (2007) analisaram 63 pacientes com diagnóstico clínico de 22q11DS e detectaram a presença de microdeleções em 53 indivíduos através da técnica de MLPA. Apenas 3 pacientes apresentaram deleções atípicas, sendo que duas delas incluíram o gene *COMT*. Em um estudo de correlação genótipo-fenótipo, Michaelovsky et al. (2012) analisaram 142 pacientes com suspeita clínica de 22q11DS,

utilizando as técnicas de FISH e MLPA. Eles encontraram 110 pacientes portadores de microdeleções na região 22q11.2, com 109 indivíduos apresentando deleção do gene *COMT*. O único paciente sem esse gene deletado mostrou-se portador de uma deleção atípica de aproximadamente 1 Mb. Esses autores também utilizaram a técnica de qPCR para detecção específica de deleção de *PRODH*, gene candidato ao fenótipo de distúrbios psicóticos na 22q11DS (Raux et al., 2007; Prasad et al., 2008), pois o *kit* de MLPA utilizado não continha sondas para esse gene. Eles encontraram deleção de *PRODH* em 94,4% dos 110 pacientes.

Os estudos descritos acima dão suporte aos nossos resultados, pois relatam a deleção dos genes *COMT* e *PRODH* na maioria dos indivíduos afetados. Poucos estudos descreveram a ocorrência de microdeleções atípicas, com a maioria dos pacientes apresentando deleções de 3 Mb, o que dá suporte ao uso de métodos loco-específicos direcionados à região crítica de deleção para a confirmação do diagnóstico clínico. Além disso, grande parte desses trabalhos relataram a detecção de microdeleções 22q11.2 em apenas um subgrupo dos pacientes com suspeita clínica da síndrome, assim como ocorreu no nosso estudo (VCFS\_Grupo 1).

Os genes *COMT* e *PRODH* são candidatos ao fenótipo de psicose e esquizofrenia visto em pacientes com VCFS (Paterlini et al., 2005; Howes e Kapur, 2009; Moncrieff, 2009). O gene *COMT* codifica a enzima catecol-O-metiltransferase que degrada catecolaminas, incluindo a dopamina, principalmente no córtex pré-frontal (Tunbridge et al., 2004; Tunbridge et al., 2006; Williams, 2011). A proteína COMT ocorre em duas isoformas: ligada à membrana, que é principalmente encontrada no cérebro, e a forma solúvel, que é predominantemente observada no tecido periférico (Chen et al., 2004). O gene *PRODH* codifica a prolina desidrogenase, uma enzima da membrana mitocondrial que catalisa o primeiro passo na via de degradação da prolina (Bender et al., 2005). A deleção hemizigótica de *PRODH* também está associada ao fenótipo de hiperprolinemia observado em pacientes com VCFS (Jacquet et al., 2002; Bender et al., 2005). Uma possível explicação para a neuroatividade patológica da prolina é que ela pode interferir com a função normal de alguns neurotransmissores. Enzimaticamente, a prolina pode ser convertida a glutamato, o principal neurotransmissor excitatório, e o glutamato pode ainda ser convertido em GABA (ácido gama-aminobutírico), o principal neurotransmissor inibitório. Assim, a hiperprolinemia no sistema nervoso central poderia perturbar o equilíbrio metabólico normal entre

glutamato e GABA e, portanto, levar à disfunção neuronal (Drew et al., 2011). Entretanto, estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

#### 4.5.2- Síndrome de Williams-Beuren

No estudo da síndrome de Williams-Beuren, nós selecionamos apenas dois marcadores: *ELN* e *LIMK1*, ambos localizados na região crítica de deleção. Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *LIMK1* foram customizados exclusivamente para esse trabalho e mostraram alta especificidade nos ensaios de qPCR (Figura 13). As sequências dos iniciadores para amplificação do gene alvo *ELN* e do gene de referência *HMBS* [*HMBS* (seq. 2)] foram obtidas a partir do trabalho de Saugier-Weber et al. (2006). Esses autores utilizaram a técnica de QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments*) para a detecção de microdeleções e microduplicações cromossômicas em 293 pacientes com DI idiopática. Eles exploraram simultaneamente 12 locos candidatos envolvidos com a DI e que eram alvos de rearranjos genômicos, e utilizaram o loco *HMBS* como gene de referência. Entre os 12 locos havia um gene associado à síndrome de Williams-Beuren (*ELN*) e um gene associado à síndrome velocardiocfacial (*TBX1*). Nos ensaios iniciais de validação da metodologia de QMPSF, eles utilizaram controles positivos que incluíram um paciente portador de WBS e um paciente portador de VCFS, e obtiveram resultados concordantes. Identificaram-se três rearranjos genômicos no grupo de 293 pacientes: deleção 5q35, deleção 22q11 e duplicação 17q11.

No presente trabalho, os resultados de qPCR mostraram que os marcadores *ELN* e *LIMK1* foram eficientes na identificação de pacientes portadores de microdeleções na região 7q11.23, não apresentando resultados falso positivos ou falso negativos. O uso desses dois marcadores possibilitaria a identificação da maioria dos indivíduos afetados, pois os tamanhos de deleções mais comuns, de 1,55 Mb (aproximadamente 95%) e 1,84 Mb (aproximadamente 3-5%) (Schubert e Laccone, 2006; Etokebe et al., 2008; Schubert et al., 2009), contêm ambos os marcadores (Figura 16).

No caso específico dos dez pacientes do WBS\_Grupo 2 que, apesar de apresentarem sinais clínicos sugestivos da síndrome, foram previamente diagnosticados como negativos (aCGH, microssatélites e MQF-PCR) e não mostraram microdeleções dos dois marcadores por qPCR, podemos dizer que existe aproximadamente 98% de probabilidade de não serem portadores da síndrome. Entretanto, assim como para os

dezesseis pacientes do VCFS\_Grupo 2, se esses pacientes forem portadores de microdeleções 7q11.23 atípicas, eles podem não ser detectados pela técnica de qPCR.

Em um estudo pioneiro em 1995, Nickerson et al. mostraram que 91% de um total de 44 pacientes clinicamente diagnosticados com WBS apresentaram deleção do gene *ELN* através da técnica de FISH. Eles concluíram o trabalho dizendo que “o gene da elastina é útil para a identificação de deleções na maioria dos pacientes com WBS”, pois como explicado anteriormente, ele está localizado dentro da região crítica de deleção da síndrome de Williams-Beuren. No entanto, também citaram que “a presença de duas cópias desse gene em um paciente, entretanto, não exclui a WBS como um diagnóstico”, referindo-se à ocorrência, mesmo que em baixa frequência, de microdeleções atípicas que podem não conter esse gene.

Howald et al. (2006) desenharam 11 ensaios de qPCR localizados dentro e ao redor da região crítica da síndrome de Williams-Beuren e os testaram em 92 pacientes com WBS e 61 controles, também obtendo um teste com 100% de sensibilidade e especificidade. Somente dois pacientes apresentaram deleções atípicas, que incluíram *ELN* e *LIMK1*. Schubert e Laccone (2006) utilizaram a técnica de qPCR para detectar e determinar o tamanho de deleções em amostras de DNA de 65 pacientes com suspeita clínica da WBS. Eles utilizaram 12 ensaios de qPCR e encontraram 21 pacientes positivos para WBS, com o tamanho da deleção variando de 0,2 Mb a 2,5 Mb. O paciente com a menor região deletada (0,2 Mb) apresentou deleção de apenas seis genes, dentre eles *ELN* e *LIMK1*, os quais também estavam presentes em cópias únicas em todos os demais indivíduos afetados. Esses estudos utilizaram o reagente *SYBR® Green* nos ensaios de qPCR. Etokebe et al. (2008) detectaram a deleção do gene *ELN* em dois pacientes com diagnóstico clínico da WBS utilizando ensaios de qPCR *duplex (Duplex quantitative PCR array)* com sondas *TaqMan®*. Dutra et al. (2011) analisaram 97 pacientes com diagnóstico clínico da WBS usando cinco marcadores microssatélites e encontraram microdeleções em 84 desses pacientes (86,6%). Eles observaram apenas os dois tamanhos de deleção mais frequentes: 1,55 Mb (90,5%) e 1,84 Mb (9,5%). No ano seguinte, Dutra et al. (2012) avaliaram 88 pacientes com suspeita clínica da WBS usando a técnica de MLPA e o mesmo grupo de marcadores microssatélites e detectaram a presença de microdeleções 7q11.23 em 64 pacientes (72,7%). Os tamanhos das deleções foram de 1,55 Mb (89,1%) e 1,84 Mb (10,9%), com nenhuma detecção de deleções atípicas.

Considerando os resultados descritos acima podemos dizer que, nos estudos em que foi possível determinar quais genes estavam presentes na região deletada, todos incluíram os locos *ELN* e/ou *LIMK1*. Poucos estudos descreveram a ocorrência de microdeleções atípicas e, aqueles que o fizeram, mostraram que *ELN* e *LIMK1* estavam entre os genes deletados. Esses resultados dão suporte à justificativa para o uso de métodos loco-específicos direcionados à região crítica de deleção como uma excelente ferramenta para a confirmação do diagnóstico clínico da WBS. Além disso, grande parte desses trabalhos relataram a detecção de microdeleções 7q11.23 em apenas um subgrupo dos pacientes com suspeita clínica da síndrome, assim como ocorreu no nosso estudo (WBS\_Grupo 1).

No presente trabalho, a escolha dos genes *ELN* e *LIMK1* como marcadores nos ensaios de qPCR foi devido, principalmente, às suas localizações dentro da região crítica da síndrome de Williams-Beuren, o que possibilitaria a detecção da maioria dos indivíduos afetados. Segundo, mas não menos importante, esses genes estão associados a algumas características fenotípicas observadas na maioria dos indivíduos afetados, sugerindo uma maior probabilidade de hemizigidade desses genes nos pacientes com sinais clínicos da síndrome. O gene da elastina é o loco mais estudado da região crítica da WBS. A elastina forma as fibras elásticas da matriz extracelular do tecido conectivo em todo o corpo e a haploinsuficiência de *ELN* é responsável pela estenose aórtica supravalvular, encontrada em aproximadamente 70% dos pacientes (Pober et al., 2008; Pober, 2010), e por outras anormalidades do tecido conectivo (Fazio et al., 1991; Morris et al., 1993; Ewart et al., 1993; Pezet et al., 2008). O gene *LIMK1* codifica uma proteína quinase envolvida na organização do citoesqueleto de actina, que fosforila e inativa a cofilina, uma proteína que atua despolimerizando os filamentos de actina (Pröschel et al., 1995). O remodelamento da actina parece ser crucial para o estabelecimento e a modificação das espinhas dendríticas, que constituem a maioria das conexões sinápticas no hipocampo e estão associadas à formação e manutenção da memória e aprendizagem (Nimchinsky et al., 2002). O gene *LIMK1* é altamente expresso no sistema nervoso central, e estudos *in vivo* mostraram que a proteína LIMK1 está localizada nas sinapses neuromusculares, sugerindo que ele possa estar envolvido na formação e/ou manutenção das sinapses (Scott e Olson, 2007). De forma geral, resultados obtidos a partir de diversos estudos apóiam a hipótese de que o gene *LIMK1* contribua em grande escala para a morfologia do cérebro (estrutura sináptica e plasticidade) e função

cognitiva (cognição espacial e atividade motora) (Frangiskakis et al., 1996; Wang et al., 1998; Meng et al., 2002).

Uma explicação importante no presente estudo é o porquê da utilização de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores diferentes para amplificação do mesmo gene de referência (*HMBS*). No estudo da VCFS, primeira síndrome analisada, nós decidimos manter todo o conjunto de iniciadores a ser utilizado nos ensaios de qPCR a partir de um único trabalho previamente publicado (Weksberg et al., 2005), apesar da disponibilidade dos iniciadores *HMBS* (seq. 2) em nosso laboratório. Dessa forma, seria possível comparar os nossos resultados àqueles publicados e verificar se um número menor de marcadores seria eficiente para a identificação da maioria dos indivíduos afetados. Por outro lado, no estudo da WBS e monossomia 1p36, optamos por utilizar o par de iniciadores derivado de Saugier-Weber et al. (2006) porque ele apresentou maior eficiência de reação (95,49%) quando comparado ao par de iniciadores obtidos a partir de Weksberg et al. (2005) (91,37%).

#### **4.5.3- Monossomia 1p36**

Enquanto a região crítica de deleção da VCFS e da WBS já foi determinada, isso ainda não ocorreu para a monossomia 1p36. A dificuldade para definir a região crítica da monossomia 1p36 ocorre porque existe uma acentuada variabilidade nas deleções, sem localização de pontos de quebra ou tamanhos de deleções comuns (Heilstedt et al., 2003b). Nem todos os pacientes sobrepõem para uma região crítica, com os tamanhos das deleções variando de aproximadamente 0,2 Mb a 11 Mb (Heilstedt et al., 2003b; Yu et al., 2003; Ballif et al., 2007; D'Angelo et al., 2010; Rosenfeld et al., 2010; Buck et al., 2011). No entanto, deleções pequenas são atípicas; a maioria dos pacientes com monossomia 1p36 têm deleções terminais grandes (Rosenfeld et al., 2010). Deleções terminais são as mais comuns e estão associadas às características clássicas da monossomia 1p36 (Heilstedt et al., 2003b). Estudos mostram que a maioria das deleções 1p36 são encontradas dentro dos primeiros 4-5 Mb a partir do telômero 1p (Heilstedt et al., 2003b; Ballif et al., 2007; Gajecka et al., 2007).

Em um dos primeiros grandes estudos relacionados à monossomia 1p36, Heilstedt et al. (2003b) desenvolveram um *contig* de clones de insertos grandes para os 10,5 Mb mais distais de 1p36 e caracterizaram os tamanhos de deleções em 61 indivíduos afetados de 60 famílias, utilizando marcadores microssatélites e FISH. Eles



observaram que, embora os tamanhos das deleções variassem muito (de 1,5 Mb a > 10,5 Mb), a maioria dos pontos de quebra (12,5%) se agruparam em 4-4,5 Mb a partir do telômero e 40% de todos os pontos de quebra ocorreram 3-5 Mb a partir do telômero. Além disso, a maioria dos indivíduos apresentaram deleções terminais puras (72%), em que a sequência subtelomérica 1p mais distal estava ausente e não substituída por uma outra extremidade cromossômica. Em seguida, Yu et al. (2003) utilizaram a técnica de aCGH para estudar 25 dos 61 indivíduos analisados por Heilstedt et al. (2003b) e confirmaram os resultados anteriormente obtidos, encontrando deleções variando de aproximadamente 1,5 Mb a > 10,5 Mb.

Rooms et al. (2004), ao analisarem 75 pacientes com deficiência intelectual idiopática usando a técnica de MLPA, encontraram dois pacientes portadores de deleções terminais na região 1p. O primeiro paciente apresentou uma deleção entre 4,25-5 Mb a partir do telômero na região 1p36.3, determinada por marcadores microssatélites. Nenhuma informação sobre o tamanho de deleção do segundo paciente foi fornecida. O autor finaliza dizendo que ambos os pacientes apresentavam características clínicas semelhantes à da monossomia 1p36. Em um estudo envolvendo 169 anormalidades subteloméricas clinicamente significativas, Ballif et al. (2007) identificaram 32 casos envolvendo a região subtelomérica de 1p36 e determinaram a localização dos pontos de quebra: 54% dentro dos primeiros 5 Mb a partir do telômero 1p e aproximadamente 90% dentro dos primeiros 10 Mb. D'Angelo et al. (2010), utilizando a técnica de MLPA para triagem de deleções 1p36, identificaram nove pacientes positivos para monossomia 1p36, a maioria portadores de deleções terminais puras. Os tamanhos das deleções foram variáveis (~2-10 Mb) e todos apresentaram hemizigidade de *PRKCZ* e *SKI*.

Em outros estudos, realizados com um número menor de pacientes, observou-se também a alteração no número de cópias de *PRKCZ* e *SKI* na maioria dos indivíduos afetados. Gajecka et al. (2005) caracterizaram rearranjos complexos em quatro indivíduos com deleções, duplicações e/ou triplicações de 1p36 e compararam as regiões de desequilíbrio cromossômico a dois casos publicados. Resultados de aCGH e FISH revelaram uma região de sobreposição de 1,1 Mb que quando triplicada estava associada à craniossinostose e quando deletada estava associada a grandes fontanelas anteriores de fechamento tardio. Ela foi denominada por esses autores de região crítica associada ao fechamento da sutura cranial e continha os genes *PRKCZ* e *SKI*, que estavam presentes em número de cópias alteradas em todos os seis pacientes: deletados

em quatro indivíduos e duplicados/triplicados em dois indivíduos. Vieira et al. (2011) usaram a técnica de aCGH para avaliar um paciente que, apesar de apresentar características clínicas semelhantes à da síndrome de Smith-Magenis, não mostrou deleção na região 17p11.2 ou mutação no gene *RAI1*. Eles detectaram uma deleção de aproximadamente 2,15 Mb na região 1p36.32-1p36.33 contendo os genes *PRKCZ* e *SKI*, que levou ao diagnóstico final de monossomia 1p36.

Rosenfeld et al. (2010), utilizando aCGH, identificaram pequenas deleções intersticiais na região 1p36.33 de cinco pacientes com características clínicas da monossomia 1p36, com tamanhos variando de 199 kb a 823 kb. Três pacientes apresentaram deleção hemizigótica de *PRKCZ* e *SKI*. Uma pequena deleção intersticial, de aproximadamente 1,51 Mb, foi encontrada por Gajecka et al. (2010) durante a avaliação de dois irmãos com características fenotípicas brandas da monossomia 1p36, que também abrigou os genes *PRKCZ* e *SKI*. É importante salientar que a maioria dos genes que estavam contidos na menor região de deleção (174 kb) caracterizada por Rosenfeld et al. (2010) não estavam deletados nos pacientes analisados por Gajecka et al. (2010), com apenas um de um total de cinco genes mostrando deleção parcial e os outros permanecendo intactos. Isto mostra novamente que a região crítica de deleção específica para a monossomia 1p36 não foi ainda determinada, o que dificulta muito o seu estudo. Na verdade, não parece existir uma única região crítica para esta síndrome.

De forma geral, os estudos descritos acima dão suporte aos nossos resultados, pois aqueles que especificaram quais genes estavam presentes na região deletada relataram a microdeleção de *PRKCZ* e *SKI* na maioria dos indivíduos afetados. Além disso, de acordo com esses estudos, podemos dizer que os genes *PRKCZ* e *SKI* estão dentro da região que contém a maioria das deleções, porque eles estão localizados a aproximadamente 2 Mb (chr1:1,981,909-2,116,834) e 2,2 Mb (chr1:2,160,134-2,241,652), respectivamente, a partir do telômero 1p (*UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly*) (Figura 22). A haploinsuficiência destes genes tem sido proposta estar relacionada ao fenótipo neurológico visto em pacientes com monossomia 1p36, contribuindo para o atraso no neurodesenvolvimento (Colmenares et al., 2002; Hernandez et al., 2003; D'Angelo et al., 2010; Rosenfeld et al., 2010). Como esta é uma característica observada em todos os pacientes com monossomia 1p36 (Shapira et al., 1997; Heilstedt et al., 2003b; Shaffer and Heilstedt, 2001; Battaglia, 2005), podemos sugerir uma alta probabilidade de encontrar esses dois genes deletados na maioria dos pacientes. A partir dessas observações é que nós escolhemos *PRKCZ* e *SKI* como os

marcadores dos ensaios de qPCR para a monossomia 1p36. Os resultados de qPCR mostraram que ambos os marcadores foram eficientes na identificação de pacientes com microdeleções na região 1p36. Com exceção do resultado do marcador *SKI* para o paciente 10 (indivíduo 10 na Tabela A14 em anexo), todos os resultados de qPCR foram 100% concordantes com os resultados previamente determinados por aCGH, FISH e MLPA. É importante ressaltar que pacientes raros, que possuem principalmente microdeleções intersticiais pequenas e atípicas, poderiam, eventualmente, não ser identificados por este ensaio de qPCR. No entanto, o ensaio de qPCR proposto no presente trabalho possibilitaria a identificação da maioria dos pacientes com monossomia 1p36, podendo ser usado como um excelente teste de triagem molecular para essa síndrome.

O gene *PRKCZ* codifica uma proteína quinase C que é necessária para mediar a diferenciação axônica (Zhang et al., 2007). Uma isoforma constitutivamente ativa específica do cérebro é necessária e suficiente para a potencialização de longa duração das sinapses, que é responsável pela memória (Hernandez et al., 2003). Portanto, a haploinsuficiência desse gene pode impactar o desenvolvimento adequado do cérebro e sua função. O gene *PRKCZ* também tem sido associado a uma variedade de outros processos, incluindo função do músculo cardíaco (Wu e Solaro, 2007) e transporte de glicose estimulado por insulina (Bandyopadhyay et al., 2002). O gene *SKI* é um proto-oncogene que normalmente promove o crescimento celular (Akiyoshi et al., 1999). Ele é ativo em muitos tipos de células e tem um papel específico na proliferação e mielinização das células de Schwann (Atanososki et al., 2004). A haploinsuficiência de *SKI* tem sido proposta estar associada às características dismórficas, hipotonia, atraso motor, deficiência intelectual e fissura de lábio/palato observadas em indivíduos com monossomia 1p36 (Colmenares et al., 2002).

#### **4.5.4- Avaliação dos custos**

Para a implementação de novos testes de diagnóstico nos serviços públicos de saúde existem pontos importantes a serem considerados, tais como: custos com equipamentos, recursos humanos e suporte técnico (Vieira et al., 2013). Comparado às técnicas de aCGH, FISH e MLPA, a qPCR faz uso de um equipamento menos dispendioso (R\$ 91.529,00), aproximadamente 59-78% mais econômico, com os custos

relativos à manutenção seguindo o mesmo raciocínio. Além disso, ela é considerada uma metodologia de fácil execução e simples de estabelecer em qualquer laboratório.

De acordo com nossos resultados, nós sugerimos o uso dos seguintes marcadores para a realização da triagem molecular por qPCR de pacientes com suspeita clínica das síndromes estudadas: *COMT* e *PRODH* (VCFS); *ELN* e *LIMK1* (WBS); *PRKCZ* e *SKI* (monossomia 1p36); gene de referência *HMBS* (todas as três síndromes).

A triagem molecular de um paciente com suspeita clínica de VCFS, WBS ou monossomia 1p36 utilizando três marcadores (dois genes alvo e um gene de referência) teria um custo de aproximadamente R\$ 39,11 (Tabela A15 em anexo) considerando somente os reagentes envolvidos no processo, desde a etapa de extração de DNA até a qPCR.

Decidimos também calcular os custos de uma triagem molecular por FISH, utilizando uma sonda alvo e uma sonda controle, pois se trata de um método loco-específico assim como a qPCR. Para esse cálculo consideramos a triagem molecular de um paciente com suspeita clínica de VCFS/DGS (Tabela A17 em anexo). Seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, o custo seria de aproximadamente R\$ 245,23 considerando apenas os reagentes de laboratório, valor muito próximo àquele determinado por Vieira et al. (2013) (R\$ 258,71), comprovando que os gastos com o transporte das amostras incluído nos valores publicados correspondem a uma parcela muito pequena dos custos finais. Essa concordância reforça a credibilidade das análises de custo feitas por Vieira et al. (2013), possibilitando também uma comparação dos nossos resultados com o custo correspondente à uma análise por MLPA, o qual foi determinado por esses autores (R\$ 158,22).

Dessa forma, comparado a outros métodos de triagem loco-específicos e considerando apenas os custos com reagentes, um teste de triagem por qPCR incluindo a extração de DNA seria aproximadamente 75% e 84% mais econômico do que um teste por MLPA e FISH, respectivamente. Quando comparado ao aCGH, que é utilizado para a triagem de todo o genoma, esses números aumentam para quase 97% (ver item 4.1.3). Além disso, o processo de triagem completo, desde a extração de DNA genômico até a análise dos dados de qPCR, poderia ser realizado em um curto período de tempo (aproximadamente 8 horas).

Por tudo o que já foi exposto, quando um paciente apresenta-se com características clínicas típicas de uma síndrome de microdeleção comum, é economicamente viável usar a qPCR para confirmar a suspeita clínica. No entanto, se a

síndrome não for confirmada por qPCR e o médico ainda suspeitar de uma etiologia cromossômica, métodos que permitem uma análise mais ampla e minuciosa do genoma, como aCGH, devem ser considerados. De acordo com Shaffer e Bejjani (2009), o benefício da análise por aCGH é visto principalmente em pacientes com fenótipos inespecíficos sugestivos de anormalidades cromossômicas.

Em resumo, nossos resultados mostram que a qPCR pode ser considerada um método de triagem molecular rápido, sensível, específico e de baixo custo para a detecção de microdeleções associadas à síndrome velocardiofacial, síndrome de Williams-Beuren e monossomia 1p36. Nós acreditamos que a metodologia descrita no presente trabalho possa representar uma alternativa economicamente viável para implementação no SUS e nos serviços públicos de saúde de outros países em desenvolvimento, permitindo que toda a população tenha acesso a testes genéticos de alta qualidade.

Considerando a magnitude do impacto que anomalias congênitas e doenças genéticas têm sobre a saúde, deve-se assegurar que serviços e testes genéticos sejam verdadeiramente e eticamente integrados aos cuidados com a saúde e tornem-se parte do sistema público de todos os países.

## **5- Considerações Finais e Perspectivas**

A pesquisa genética tem um importante papel na detecção, prevenção, tratamento e/ou aconselhamento genético de doenças que são causadas por anormalidades cromossômicas e variantes de sequência de DNA. O foco no mapeamento e sequenciamento do genoma humano, que constituiu o Projeto Genoma Humano, gerou um grande impacto na pesquisa biomédica nos últimos anos. O PGH forneceu ferramentas importantes para analisar o componente genético das doenças complexas e, em muitos aspectos, abriu caminho para o que está sendo chamado de medicina genômica personalizada (Naidoo et al., 2011). Ele trouxe benefícios também para a genética clínica devido ao potencial para identificação e isolamento de genes causadores de doenças e de marcadores próximos a eles. Como resultado, houve um grande avanço no desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias para o estudo molecular de doenças genéticas humanas.

No presente trabalho, realizamos estudos moleculares de quatro doenças genéticas humanas utilizando a qPCR como metodologia principal. Era nosso interesse identificar SNPs e detectar CNVs associados a doenças genéticas de alta prevalência na população.

Assim, no primeiro estudo, identificamos SNPs associados à DMRI em um grupo caso-controle de 192 indivíduos Brasileiros, através de ensaios de discriminação alélica por qPCR com sondas *TaqMan*® alelo-específicas e análises de RFLP. Este trabalho constituiu uma complementação aos estudos iniciais de Teixeira et al. (2010) e Almeida et al. (2012 e 2013) que avaliaram, respectivamente, a associação de um e três polimorfismos com a DMRI na população Brasileira. Nós analisamos nove SNPs, localizados no genoma nuclear e mitocondrial, e nossos resultados mostraram a associação significativa de quatro SNPs com o risco de DMRI após a correção para as covariáveis: rs1061147 e rs1329428 no gene *CFH*; rs2230199 no gene *C3*; e rs3750847 no gene *ARMS2/LOC387715*. Além disso, Brasileiros auto-declarados Brancos e de ancestralidade Européia mostraram aumento na chance de desenvolvimento da DMRI, com a idade avançada sendo também um fator de risco significativo.

No segundo estudo, realizamos ensaios de qPCR com o reagente *SYBR*® *Green* para a detecção de microdeleções associadas à síndrome velocardiofacial, síndrome de Williams-Beuren e monossomia 1p36. O nosso interesse era utilizar uma metodologia pouco dispendiosa, mas ao mesmo tempo precisa, para a triagem molecular dessas síndromes e que fosse economicamente viável para ser implementada no SUS e nos serviços públicos de saúde de outros países em desenvolvimento. Nossos resultados

mostraram que a qPCR foi eficiente para a detecção de microdeleções nas regiões 22q11.2, 7q11.23 e 1p36 (100% de sensibilidade e 100% de especificidade). Com exceção do resultado do marcador *SKI* para o paciente 10 no estudo da monossomia 1p36, todos os resultados de qPCR foram 100% concordantes com os resultados previamente determinados por outros métodos de análises. E finalmente, a triagem molecular de um paciente utilizando três marcadores (dois genes alvo e um gene de referência) teria um custo de aproximadamente R\$ 39,11 considerando somente os gastos com reagentes, desde a etapa de extração de DNA até a qPCR, e poderia ser realizada em um curto período de tempo (aproximadamente 8 horas).

Portanto, os resultados apresentados no presente trabalho corroboram a eficiência da metodologia de qPCR como uma ferramenta de estudo molecular de doenças genéticas humanas e contribuem de forma significativa para o campo da genética médica.

Na era pós-PGH, o grande desafio reside na interpretação dos dados gerados pelas novas tecnologias de genotipagem e sequenciamento e como a informação genômica pode ser usada para descobrir novos medicamentos ou biomarcadores moleculares para aplicações clínicas que, eventualmente, serão traduzidos em benefício para o paciente. O objetivo final é melhorar o tratamento clínico dos pacientes e conduzir à medicina personalizada através do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos adaptados ao paciente, com base na sua informação genética (Guttmacher et al., 2010; Altman et al., 2011; Naidoo et al., 2011). Com a redução no custo do sequenciamento e os avanços na bioinformática, pode-se esperar que o WGS se tornará a abordagem preferida para definir o espectro de variantes genéticas em cada genoma. No entanto, para que esse enfoque possa ser aplicado na determinação das variantes causais de doenças genéticas complexas, o sequenciamento de um grande número de genomas se faz necessário (Marian, 2012). Nesse sentido, iniciou-se em 2008 o Projeto 1000 Genomas (*1,000 Genomes Project*), com o intuito de sequenciar os genomas de pelo menos 1.000 indivíduos de diferentes populações ao redor do mundo (<http://www.1000genomes.org/>). O principal objetivo deste projeto tem sido o de fornecer um mapa abrangente da variação genética humana para futuros estudos de associação de doenças e de genética de populações (Naidoo et al., 2011). Apesar dos progressos serem promissores, muitos desafios ainda permanecem. Desvendar a genética das doenças complexas será o maior desafio à medida que avançamos para o futuro do diagnóstico molecular.



## **6- Referências Bibliográficas**

- Age-Related Eye Disease Study Research Group (2001) A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Archives of Ophthalmology* 119(10):1417-1436
- Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J, Kusanagi K, Nemoto N, Miyazono K, Kawabata M (1999) c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *The Journal of Biological Chemistry* 274(49):35269-35277
- Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Miranda DM, De Marco LA, Nehemy MB (2012) Homozygosity for the +674C>T polymorphism on VEGF gene is associated with age-related macular degeneration in a Brazilian cohort. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 250(2):185-189
- Almeida LN, Melilo-Carolino R, Veloso CE, Pereira PA, Bastos-Rodrigues L, Sarubi H, Miranda DM, Soubrane G, De Marco L, Nehemy MB (2013) Association Analysis of CFH and ARMS2 Gene Polymorphisms in a Brazilian Cohort with Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Research* 50(2):117-122
- Alsenz J, Schulz TF, Lambris JD, Sim RB, Dierich MP (1985) Structural and functional analysis of the complement component factor H with the use of different enzymes and monoclonal antibodies to factor H. *Biochemical Journal* 232(3):841-850
- Altman RB, Kroemer HK, McCarty CA, Ratain MJ, Roden D (2011) Pharmacogenomics: will the promise be fulfilled? *Nature Reviews Genetics* 12(1):69-73
- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES (2008) Genetic mapping in human disease. *Science* 322(5903):881-888

- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. In: American Psychiatric Association, 4th ed. Washington, DC, pp 39-46
- Antshel KM, Aneja A, Strunge L, Peebles J, Fremont WP, Stallone K, Abdulsabur N, Higgins AM, Shprintzen RJ, Kates WR (2007) Autistic spectrum disorders in velocardiofacial syndrome (22q11.2 deletion). *Journal of Autism and Developmental Disorders* 37(9):1776-1786
- Arakawa S, Takahashi A, Ashikawa K, Hosono N, Aoi T, Yasuda M, Oshima Y, Yoshida S, Enaida H, Tsuchihashi T et al (2011) Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Nature Genetics* 43(10):1001-1004
- Atanasoski S, Notterpek L, Lee HY, Castagner F, Young P, Ehrengruber MU, Meijer D, Sommer L, Stavnezer E, Colmenares C et al (2004) The protooncogene *Ski* controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron* 43(4):499-511
- Bailey JA, Liu G, Eichler EE (2003) An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *The American Journal of Human Genetics* 73(4):823–834
- Bailey JA, Eichler EE (2006) Primate segmental duplications: crucibles of evolution, diversity and disease. *Nature Reviews Genetics* 7(7):552-564
- Balding DJ (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews (Genetics)* 7(10):781-791
- Bales AM, Zaleski CA, McPherson EW (2010) Newborn screening programs: should 22q11 deletion syndrome be added? *Genetics in Medicine* 12(3):135-144
- Ballif BC, Yu W, Shaw CA, Kashork CD, Shaffer LG (2003) Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest pre-meiotic breakage-fusion-bridge cycles are

involved in generating terminal deletions. *Human Molecular Genetics* 12(17):2153-2165

Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG (2007) The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A(16):1850-1857

Ballif BC, Theisen A, Coppinger J, Gowans GC, Hersh JH, Madan-Khetarpal S, Schmidt KR, Tervo R, Escobar LF, Friedrich CA et al (2008a) Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication. *Molecular Cytogenetics* 1:8

Ballif BC, Theisen A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Hersh JH, Bejjani BA, Shaffer LG (2008b) Identification of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16q11.2q12.2. *Clinical Genetics* 74(5):469-475

Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert ML, Quon MJ, Lea-Currie R, Sen A, Farese RV (2002) PKC-zeta mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(2):716-723

Barabási AL, Gulbahce N, Loscalzo J (2011) Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature Reviews Genetics* 12(1):56-68

Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, Marino B, Oskarsdottir S, Philip N, Sullivan K et al (2011) Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Pediatrics* 159(2):332-339.e1

Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ (2006) The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Annals of Human Genetics* 70(Pt 5):658-665

- Battaglia A (2005) Del 1p36 syndrome: a newly emerging clinical entity. *Brain & Development* 27(5):358-361
- Batzler MA, Deininger PL (2002) Alu repeats and human genomic diversity. *Nature Reviews Genetics* 3(5):370-379
- Bayés M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Pérez Jurado LA (2003) Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *The American Journal of Human Genetics* 73(1):131-151
- Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE (2007) Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nature Reviews Genetics* 8(8):639-646
- Bejjani BA, Shaffer LG (2008) Clinical utility of contemporary molecular cytogenetics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9:71-86
- Bender HU, Almashanu S, Steel G, Hu CA, Lin WW, Willis A, Pulver A, Valle D (2005) Functional consequences of PRODH missense mutations. *The American Journal of Human Genetics* 76(3):409-420
- Berg JS, Brunetti-Pierri N, Peters SU, Kang SH, Fong CT, Salamone J, Freedenberg D, Hannig VL, Prock LA, Miller DT et al (2007) Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region. *Genetics in Medicine* 9(7):427-441
- Bittel DC, Yu S, Newkirk H, Kibiryeveva N, Holt A III, Butler MG, Cooley LD (2009) Refining the 22q11.2 deletion breakpoints in DiGeorge syndrome by aCGH. *Cytogenetic and Genome Research* 124(2):113-120
- Bodmer W, Bonilla C (2008) Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature Genetics* 40(6):695-701

- Boorman JG, Varma S, Ogilvie CM (2001) Velopharyngeal incompetence and chromosome 22q11 deletion. *The Lancet* 357(9258):774
- Botstein D, Risch N (2003) Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genetics* 33 Suppl:228-237
- Bowes J, Lawrence R, Eyre S, Panoutsopoulou K, Orozco G, Elliott KS, Ke X, Morris AP, UKRAG, Thomson W et al (2010) Rare variation at the TNFAIP3 locus and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Human Genetics* 128(6):627-633
- Brantley MA Jr, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A (2007) Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology* 114(12):2168-2173.
- Brantley MA Jr, Edelstein SL, King JM, Plotzke MR, Apte RS, Kymes SM, Shiels A (2009) Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye (Lond)* 23(3):626-631
- Brasil Ministério da Saúde (2010) SINASC (Sistema de Informações sobre nascidos vivos). Available at <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>. Accessed August 2012
- Bressler NM (2002) Early detection and treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Journal of the American Board of Family Practice* 15(2):142-152
- Bressler SB, Muñoz B, Solomon SD, West SK, Salisbury Eye Evaluation (SEE) Study Team (2008) Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. *Archives of Ophthalmology* 126(2):241-245

- Brión M, Sanchez-Salorio M, Cortón M, de la Fuente M, Pazos B, Othman M, Swaroop A, Abecasis G, Sobrino B, Carracedo A et al (2011) Genetic association study of age-related macular degeneration in the Spanish population. *Acta Ophthalmologica* 89(1):e12-22
- Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S, ANCHOR Study Group (2006) Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 355(14):1432-1444
- Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballín MR, Guitart M (2006) Microdeletion and microduplication 22q11.2 screening in 295 patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140(22):2426-2432
- Buck A, du Souich C, Boerkoel CF (2011) Minimal genotype--phenotype correlation for small deletions within distal 1p36. *American Journal of Medical Genetics Part A* 155A(12):3164-3169
- Canter JA, Olson LM, Spencer K, Schnetz-Boutaud N, Anderson B, Hauser MA, Schmidt S, Postel EA, Agarwal A, Pericak-Vance MA et al (2008) Mitochondrial DNA Polymorphism A4917G Is Independently Associated with Age-Related Macular Degeneration. *PLoS One* 3(5):e2091
- Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, Patanjali SR, Weissman SM, Anyane-Yeboah K, Warburton D et al (1997) Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velocardiofacial syndrome patients. *The American Journal of Human Genetics* 61(3):620-629
- Castilla EE, Luquetti DV (2009) Brazil: public health genomics. *Public Health Genomics* 12(1):53-58
- CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ (2011) Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related

macular degeneration. *The New England Journal of Medicine*, 364(20): 1897-908.

Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J et al (2004) Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *The American Journal of Human Genetics* 75(5):807-821

Chen LJ, Liu DT, Tam PO, Chan WM, Liu K, Chong KK, Lam DS, Pang CP (2006a) Association of complement factor H polymorphisms with exudative age-related macular degeneration. *Molecular Vision* 12:1536-1542

Chen YF, Kou PL, Tsai SJ, Chen KF, Chan HH, Chen CM, Sun HS (2006b) Computational analysis and refinement of sequence structure on chromosome 22q11.2 region: Application to the development of quantitative real-time PCR assay for clinical diagnosis. *Genomics* 87(2):90-297

Chen M, Forrester JV, Xu H (2007) Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Experimental Eye Research* 84(4):635-645

Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, Jakobsdottir J, Tosakulwong N, Pericak-Vance MA, Campochiaro PA, Klein ML et al (2010a) Genetic variants near *TIMP3* and high-density lipoprotein associated locus influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16):7401-7406

Chen Y, Bedell M, Zhang K (2010b) Age-related Macular Degeneration: Genetic and Environmental Factors of Disease. *Molecular Interventions* 10(5):271-281

Chew EY, Clemons TE, Agrón E, Sperduto RD, Sangiovanni JP, Kurinij N, Davis MD, Age-Related Eye Disease Study Research Group (2013) Long-Term Effects of



Vitamins C and E,  $\beta$ -Carotene, and Zinc on Age-related Macular Degeneration: AREDS Report No. 35. *Ophthalmology* 120(8):1604-1611

Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS (2009) Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *The Korean Journal of Laboratory Medicine* 29(1):71-76

Chong EW, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA, Guymer RH (2008) Alcohol consumption and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Ophthalmology* 145(4):707-715

Christianson A, Howson CP, Modell B (2006) March of Dimes Global Report on Birth Defects. New York. March of Dimes Birth Defects Foundation. Available at: [http://www.marchofdimes.com/downloads/Birth\\_Defects\\_Report-PF.pdf](http://www.marchofdimes.com/downloads/Birth_Defects_Report-PF.pdf) and <http://www.marchofdimes.com/downloads/BirthdefectsAppendix-B.pdf>

Cirulli ET, Goldstein DB (2010) Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nature Reviews Genetics* 11(6):415-425

Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL 3rd, Age-Related Eye Disease Study Research Group (2005) Risk factors for the incidence of advanced age-related macular degeneration in the age-related eye disease study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 112(4):533-539

Coffey PJ, Gias C, McDermott CJ, Lundh P, Pickering MC, Sethi C, Bird A, Fitzke FW, Maass A, Chen LL et al (2007) Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(42):16651-16656

- Collins RT 2nd, Kaplan P, Somes GW, Rome JJ (2010) Cardiovascular abnormalities, interventions, and long-term outcomes in infantile Williams syndrome. *Journal of Pediatrics* 156(2):253-258.e1
- Colmenares C, Heilstedt HA, Shaffer LG, Schwartz S, Berk M, Murray JC, Stavnezer E (2002) Loss of the SKI proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain-dependent defects in *Ski*<sup>-/-</sup> mice. *Nature Genetics* 30(1):106-109
- Conley YP, Jakobsdottir J, Mah T, Weeks DE, Klein R, Kuller L, Ferrell RE, Gorin MB (2006) CFH, ELOVL4, PLEKHA1 and LOC387715 genes and susceptibility to age-related maculopathy: AREDS and CHS cohorts and meta-analyses. *Human Molecular Genetics* 15(21):3206-3218
- Conover WJ (1999) *Practical nonparametric statistics*, 3rd edition. New York
- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P et al (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 464(7289):704-712
- Cruz-González F, Lorenzo-Pérez R, Cañete-Campos C, Hernández-Galilea E, González-Sarmiento R (2013) Influence of CFH, HTRA1 and ARMS2 haplotype polymorphisms in the development of age-related macular disease. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 88(1):3-10
- Cuneo BF (2001) 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomaly face syndromes. *Current Opinion in Pediatrics* 13(5):465-472
- Cuscó I, Corominas R, Bayés M, Flores R, Rivera-Brugués N, Campuzano V, Pérez-Jurado LA (2008) Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Research* 18(5):683-694

- Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES (2001) High resolution haplotype structure in the human genome. *Nature Genetics* 29(2):229-232
- D'Angelo CS, Kohl I, Varela MC, de Castro CI, Kim CA, Bertola DR, Lourenço CM, Koiffmann CP (2010) Extending the phenotype of monosomy 1p36 syndrome and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A(1):102-110
- Deak KL, Horn SR, Rehder CW (2011) The evolving picture of microdeletion/microduplication syndromes in the age of microarray analysis: variable expressivity and genomic complexity. *Clinics in Laboratory Medicine* 31(4):543-564
- Deangelis MM, Silveira AC, Carr EA, Kim IK (2011) Genetics of age-related macular degeneration: current concepts, future directions. *Seminars in Ophthalmology* 26(3):77-9
- Delio M, Pope K, Wang T, Samanich J, Haldeman-Englert CR, Kaplan P, Shaikh TH, Cai J, Marion RW, Morrow BE et al (2013) Spectrum of elastin sequence variants and cardiovascular phenotypes in 49 patients with Williams-Beuren syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 161A(3):527-533
- Despriet DD, Klaver CC, Wittteman JC, Bergen AA, Kardys I, de Maat MP, Boekhoorn SS, Vingerling JR, Hofman A, Oostra BA et al (2006) Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *JAMA* 296(3):301-309
- Despriet DD, van Duijn CM, Oostra BA, Uitterlinden AG, Hofman A, Wright AF, ten Brink JB, Bakker A, de Jong PT, Vingerling JR et al (2009) Complement component C3 and risk of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 116(3):474-480
- Devlin B, Risch N (1995) A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 29(2):311-322

- Devlin B, Roeder K (1999) Genomic control for association studies. *Biometrics* 55(4):997–1004
- Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, Zhao C, Tam PO, Chan WM, Lam DS, Snyder M et al (2006) *HTRA1* promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314(5801):989–992
- Ding X, Patel M, Chan CC (2009) Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 28(1):1-18
- Dodson WE, Alexander D, Al-Aish M, De La Cruz F (1969) The DiGeorge syndrome. *The Lancet* 1(7594):574-575
- Dong L, Qu Y, Jiang H, Dai H, Zhou F, Xu X, Bi H, Pan X, Dang G (2011) Correlation of complement factor H gene polymorphisms with exudative age-related macular degeneration in a Chinese cohort. *Neuroscience Letters* 488(3):283-287
- Donnelly P (2008) Progress and challenges in genome-wide association studies in humans. *Nature* 456(7223):728-731
- Drew LJ, Crabtree GW, Markx S, Stark KL, Chaverneff F, Xu B, Mukai J, Fenelon K, Hsu PK, Gogos JA et al (2011) The 22q11.2 microdeletion: fifteen years of insights into the genetic and neural complexity of psychiatric disorders. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29(3):259-281
- Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG et al (2010) Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *European Journal of Human Genetics* 18(11):1196-1201
- Dutra RL, Pieri Pde C, Teixeira AC, Honjo RS, Bertola DR, Kim CA (2011) Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. *Clinics (Sao Paulo)* 66(6):959-964

- Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, Fonseca FM, Pieri PC, Jehee FS, Bertola DR, Kim CA (2012) Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Research Notes* 5:13
- Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA (2005) Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308(5720):421–424
- Elias PE, Cohn A (2003) Health reform in Brazil: lessons to consider. *American Journal of Public Health* 93(1):44-48
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT et al (2003) Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *The American Journal of Human Genetics* 73(5):1027-1040
- Etokebe GE, Axelsson S, Svaerd NH, Storhaug K, Dembić Z (2008) Detection of Hemizygous Chromosomal Copy Number Variants in Williams-Beuren Syndrome (WBS) by Duplex Quantitative PCR Array: An Unusual Type of WBS Genetic Defect. *International Journal of Biomedical Science* 4(3):161-170
- Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT (1993) Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nature Genetics* 5(1):11-16
- Fagerness JA, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Daly MJ, Seddon JM (2009) Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. *European Journal of Human Genetics* 17(1):100-104
- Fazio MJ, Mattei MG, Passage E, Chu ML, Black D, Solomon E, Davidson JM, Uitto J (1991) Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *The American Journal of Human Genetics* 48(4):696-703

- Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M et al (2005) Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clinical Genetics* 68(4):373-378
- Ferrero GB, Biamino E, Sorasio L, Banaudi E, Peruzzi L, Forzano S, di Cantogno LV, Silengo MC (2007) Presenting phenotype and clinical evaluation in a cohort of 22 Williams-Beuren syndrome patients. *European Journal of Medical Genetics* 50(5):327-337
- Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, Zarepari S, Swaroop A, Iyengar SK, Klein BE, Klein R, Lee KE, Majewski J et al (2005) Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Human Molecular Genetics* 14(15):2257–2264
- Flint J, Rochette J, Craddock CF, Dodé C, Vignes B, Horsley SW, Kearney L, Buckle VJ, Ayyub H, Higgs DR (1996) Chromosomal stabilisation by a subtelomeric rearrangement involving two closely related Alu elements. *Human Molecular Genetics* 5(8):1163-1169
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES IV (2003) Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54:357-374
- Foster K, Ferrell R, King-Underwood L, Povey S, Attwood J, Rennick R, Humphries SE, Henney AM (1993) Description of a dinucleotide repeat polymorphism in the human elastin gene and its use to confirm assignment of the gene to chromosome 7. *Annals of Human Genetics* 57(Pt 2):87-96
- Francis PJ, Schultz DW, Hamon S, Ott J, Weleber RG, Klein ML (2007) Haplotypes in the Complement Factor H (CFH) Gene: Associations with Drusen and Advanced Age-Related Macular Degeneration. *PLoS One* 2(11):e1197

- Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, Klein BP, Ensing GJ, Everett LA, Green ED et al (1996) LIM-kinase1 hemizyosity implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 86(1):59-69
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ (2009) Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews Genetics* 10(4):241-251
- Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM (1999) Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* 106(6):1049-1055
- Friedman DS, O'Colmain BJ, Munõz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J, Eye Diseases Prevalence Research Group (2004) Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Archives of Ophthalmology* 122(4):564-572
- Frigerio M, Passeri E, de Filippis T, Rusconi D, Valaperta R, Carminati M, Donnangelo A, Costa E, Persani L, Finelli P et al (2011) SNPs and real-time quantitative PCR method for constitutional allelic copy number determination, the VPRED1 marker case. *BMC Medical Genetics* 12:61
- Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, Zack DJ, Arakawa S, Cipriani V, Ripke S et al (2013) Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 45(4):433-439, 439e1-2
- Gajecka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Theisen A et al (2005) Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure. *European Journal of Human Genetics* 13(2):139-149
- Gajecka M, Mackay KL, Shaffer LG (2007) Monosomy 1p36 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C Seminars in Medical Genetics* 145C(4):346-356

- Gajecka M, Saitta SC, Gentles AJ, Campbell L, Ciprero K, Geiger E, Catherwood A, Rosenfeld JA, Shaikh T, Shaffer LG (2010) Recurrent interstitial 1p36 deletions: Evidence for germline mosaicism and complex rearrangement breakpoints. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A(12):3074-3083
- Gazave E, Darré F, Morcillo-Suarez C, Petit-Marty N, Carreño A, Marigorta UM, Ryder OA, Blancher A, Rocchi M, Bosch E et al (2011) Copy number variation analysis in the great apes reveals species-specific patterns of structural variation. *Genome Research* 21(10):1626-1639
- Gehrs KM, Jackson JR, Brown EN, Allikmets R, Hageman GS (2010) Complement, age-related macular degeneration and a vision of the future. *Archives of Ophthalmology* 128(3):349-358
- Gene Tests (2011) Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests/>. Accessed December 2011
- Gennery AR, Barge D, O'Sullivan JJ, Flood TJ, Abinun M, Cant AJ (2002) Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Archives of Disease in Childhood* 86(6):422-425
- Gibson NJ (2006) The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta* 363(1-2):32-47
- Gilbert-Dussardier B, Bonneau D, Gigarel N, Le Merrer M, Bonnet D, Philip N, Serville F, Verloes A, Rossi A, Aymé S et al (1995) A novel microsatellite DNA marker at locus D7S1870 detects hemizyosity in 75% of patients with Williams syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 56(2):542-544
- Giraudeau F, Taine L, Biancalana V, Delobel B, Journel H, Missirian C, Lacombe D, Bonneau D, Parent P, Aubert D et al (2001) Use of a set of highly polymorphic minisatellite probes for the identification of cryptic 1p36.3 deletions in a large collection of patients with idiopathic mental retardation. *Journal of Medical Genetics* 38(2):121-5



- Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR et al (2006) Variation in factor B (*BF*) and complement component 2 (*C2*) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 38(4):458–462
- Goldmuntz E (2005) DiGeorge syndrome: new insights. *Clinics in Perinatology* 32(4):963-978, ix-x
- Gorin MB (2012) Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Molecular Aspects of Medicine* 33(4):467-86
- Grayton HM, Fernandes C, Rujescu D, Collier DA (2012) Copy number variations in neurodevelopmental disorders. *Progress in Neurobiology* 99(1):81-91
- Gupta SK, Murthy GV, Morrison N, Price GM, Dherani M, John N, Fletcher AE, Chakravarthy U (2007) Prevalence of early and late age-related macular degeneration in a rural population in northern India: the INDEYE feasibility study. *Investigative of Ophthalmology & Visual Science* 48(3):1007–1011
- Guttmacher AE, McGuire AL, Ponder B, Stefánsson K (2010) Personalized genomic information: preparing for the future of genetic medicine. *Nature Reviews Genetics* 11(2):161-165
- Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, Seddon JM (2006) The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. *Survey of Ophthalmology* 51(4):316-363
- Hageman GS, Mullins RF (1999) Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. *Molecular Vision* 5:28
- Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF (2001) An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging

and age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 20(6):705-732

Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM et al (2005) A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (*HF1/CFH*) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(20):7227–7232

Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR et al (2005) Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308(5720):419-421

Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A et al (2009) Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *Journal of Medical Genetics* 46(4):223-232

Hay BN (2007) Deletion 22q11: spectrum of associated disorders. *Seminars in Pediatric Neurology* 14(3):136-139

Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Kashork CD, Shaffer LG (2003a) Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality. *Clinical Genetics* 64(4):310-316

Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG (2003b). Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 72(5):1200-1212

- Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, Guipponi M, Fichera M, Franke A, Muhle H, de Kovel C, Baker C, von Spiczak S et al (2009) 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nature Genetics* 41(2):160-162
- Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A (2009) Copy number variants, diseases and gene expression. *Human Molecular Genetics* 18(R1):R1-R8
- Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC (2003) Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *The Journal of Biological Chemistry* 278(41):40305-40316
- Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(23):9362-9367
- Hirvelä H, Luukinen H, Läärä E, Sc L, Laatikainen L (1996) Risk factors of age-related maculopathy in a population 70 years of age or older. *Ophthalmology* 103(6):871-877
- Horovitz DD (2003) Atenção aos defeitos congênitos no Brasil: propostas para estruturação e integração da abordagem no sistema de saúde. Tese de Doutorado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro
- Horovitz DD, Cardoso MH, Llerena JC Jr, de Mattos RA (2006) Birth defects in Brazil and health care: proposals for public policies in clinical genetics. *Cadernos de Saúde Publica* 22(12):2599-2609
- Horovitz DD, de Faria Ferraz VE, Dain S, Marques-de-Faria AP (2013) Genetic services and testing in Brazil. *Journal of Community Genetics* 4(3):355-375

- Howald C, Merla G, Digilio MC, Amenta S, Lyle R, Deutsch S, Choudhury U, Bottani A, Antonarakis SE, Fryssira H et al (2006) Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions. *Journal of Medical Genetics* 43(3):266-273
- Howes OD, Kapur S (2009) The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophrenia Bulletin* 35(3):549-562
- Hughes S, Weksberg R, Moldovan L, Squire JA (2007) Use of quantitative PCR for the detection of genomic microdeletions or microduplications. In: S. Hughes and A. Moody (eds) *PCR: Methods Express*, 1st ed. Bloxham, UK, pp 49-62
- Inoue K, Lupski JR (2002) Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 3:199-242
- Ip MS, Scott IU, Brown GC, Brown MM, Ho AC, Huang SS, Recchia FM, American Academy of Ophthalmology (2008) Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 115(10):1837-1846
- Jacquet H, Raux G, Thibaut F, Hecketsweiler B, Houy E, Demilly C, Haouzir S, Allio G, Fouldrin G, Drouin V et al (2002) *PRODH* mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Human Molecular Genetics* 11(19):2243-2249
- Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Ferrell RE, Gorin MB (2008) *C2* and *CFB* Genes in Age-Related Maculopathy and Joint Action with *CFH* and *LOC387715* Genes. *PLoS One* 3(5):e2199
- Jalali GR, Vorstman JA, Errami A, Vijzelaar R, Biegel J, Shaikh T, Emanuel BS (2008) Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Human Mutation* 29(3):433-440

- Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE (2001) Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Journal of Pediatrics* 139(5):715-723
- Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, Pordeus AC, Latini FR, Bertola DR, Kim CA, Passos-Bueno MR (2011) 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. *European Journal of Medical Genetics* 54(4):e425-432
- Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, Cao H, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, Kennedy BA, Hassell RG, Visser ME et al (2010) Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nature Genetics* 42(8):684-687
- Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson DH (2001) Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Experimental Eye Research* 73(6):887-896
- Johnson PT, Betts KE, Radeke MJ, Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV (2006) Individuals homozygous for the age-related macular degeneration risk-conferring variant of complement factor H have elevated levels of CRP in the choroid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(46):17456-17461
- Kanda A, Chen W, Othman M, Branham KE, Brooks M, Khanna R, He S, Lyons R, Abecasis GR, Swaroop A (2007) A variant of mitochondrial protein *LOC387715/ARMS2*, not *HTRA1*, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(41):16227–16232
- Karayiorgou M, Morris MA, Morrow B, Shprintzen RJ, Goldberg R, Borrow J, Gos A, Nestadt G, Wolyniec PS, Lasseter VK et al. (1995) Schizophrenia susceptibility

associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 92(17):7612-7616

Karayorgou M, Gogos JA (2004) The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia. *Molecular Brain Research* 132(2):95-104

Karayorgou M, Simon TJ, Gogos JA (2010) 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience* 11(6):402-416

Kariyazono H, Ohno T, Ihara K, Igarashi H, Joh-o K, Ishikawa S, Hara T (2001) Rapid detection of the 22q11.2 deletion with quantitative real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 15(2):71-73

Katta S, Kaur I, Chakrabarti S (2009) The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview. *Journal of Genetics* 88(4):425-449

Kenealy SJ, Schmidt S, Agarwal A, Postel EA, De La Paz MA, Pericak-Vance MA, Haines JL (2004) Linkage analysis for age-related macular degeneration supports a gene on chromosome 10q26. *Molecular Vision* 10:57–61

Khandhadia S, Cipriani V, Yates JR, Lotery AJ (2012) Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology* 217(2):127-146

Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T, Hansen N, Teague B, Alkan C, Antonacci F et al (2008) Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature* 453(7191):56-64

Kim NR, Kang JH, Kwon OW, Lee SJ, Oh JH, Chin HS (2008) Association between Complement Factor H Gene Polymorphisms and Neovascular Age-Related Macular Degeneration in Koreans. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49(5):2071-2076

- Klaver CC, Wolfs RC, Vingerling JR, Hofman A, de Jong PT (1998) Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study. *Archives of Ophthalmology* 116(5):653–658
- Klein BE, Klein R, Lee KE, Jensen SC (2001) Measures of obesity and age-related eye diseases. *Ophthalmic Epidemiology* 8(4):251-262
- Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR (2004) The epidemiology of age-related macular degeneration. *American Journal of Ophthalmology* 137(3):486-495
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST et al (2005) Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science* 308(5720):385-389
- Klein R, Klein BEK, Knudtson MD, Wong TY, Cotch MF, Liu K, Burke G, Saad MF, Jacobs DR Jr (2006) Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology* 113(3):373–380
- Klein-Tasman BP, Mervis CB (2003) Distinctive personality characteristics of 8-, 9-, and 10-year-olds with Williams syndrome. *Developmental Neuropsychology* 23(1-2):269-290
- Knoppers BM, Leroux T, Doucet H, Godard B, Laberge C, Stanton-Jean M, Fortin S, Cousineau J, Monardes C, Girard N et al (2010) Framing genomics, public health research and policy: points to consider. *Public Health Genomics* 13(4):224-234
- Kobrynski LJ, Sullivan KE (2007) Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *The Lancet* 370(9596):1443-1452

- Kokotas H, Grigoriadou M, Petersen MB (2011) Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49(4):601-616
- Kopplin LJ, Igo RP Jr, Wang Y, Sivakumaran TA, Hagstrom SA, Peachey NS, Francis PJ, Klein ML, SanGiovanni JP, Chew EY et al (2010) Genome-wide association identifies SKIV2L and MYRIP as protective factors for age-related macular degeneration. *Genes & Immunity* 11(8):609-621
- Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, Kim PM, Palejev D, Carriero NJ, Du L et al (2007) Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* 318(5849):420-426
- Kortvely E, Hauck SM, Duetsch G, Gloeckner CJ, Kremmer E, Alge-Priglinger CS, Deeg CA, Ueffing M (2010) ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations. *Investigative of Ophthalmology & Visual Science* 51(1):79-88
- Koshiyama DB, Rosa RF, Zen PR, Pereira VL, Graziadio C, Cóser VM, Ricachinevsky CP, Varella-Garcia M, Paskulin GA (2009) 22q11.2 deletion syndrome: importance of clinical evaluation and FISH analysis. *Revista da Associação Médica Brasileira* 55(4):442-446
- Kriek M, White SJ, Bouma MC, Dauwerse HG, Hansson KB, Nijhuis JV, Bakker B, van Ommen GJ, den Dunnen JT, Breuning MH (2004) Genomic imbalances in mental retardation. *Journal of Medical Genetics* 41(4):249-255
- Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Tanke HJ, Breuning MH, Szuhai K (2007) Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143(6):610-614



- Lahiri DK, Nurnberger, JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19(19): 5444
- Lai YL, Jacoby RO, Jonas AM (1978) Age-related and light-associated retinal changes in Fischer rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 17(7):634-638
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921
- Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA Jr (2009) Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *British Journal of Ophthalmology* 93(5):610-613
- Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, Nickerson RJ, Pool J, Colton TL, Ganley JP et al (1980) The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Survey of Ophthalmology* 24(Suppl):335-610
- Leveziel N, Tilleul J, Puche N, Zerbib J, Laloum F, Querques G, Souied EH (2011) Genetic Factors Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmologica* 226(3):87-102
- Leyfer OT, Woodruff-Borden J, Klein-Tasman BP, Fricke JS, Mervis CB (2006) Prevalence of psychiatric disorders in 4 to 16-year-olds with Williams syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 141B(6):615–622
- Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R, Wade MS, Li Y, Liang L, Zarepari S, Swaroop A et al (2006a) *CFH* haplotypes without the Y402H

coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 38(9):1049-1054

Li Y, Xu L, Jonas JB, Yang H, Ma Y, Li J (2006b) Prevalence of age-related maculopathy in the adult population in China: the Beijing eye study. *American Journal of Ophthalmology* 142(5):788–793

Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY (2012) Age-related macular degeneration. *Lancet* 379(9827):1728–1738

Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, Sullivan CM, Sahoo T, Yatsenko SA, Bacino CA et al (2007) Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One* 2(3):e327

Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM (2006) Common variation in three genes, including a noncoding variant in *CFH*, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 38(9):1055-1059

Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM (2007) Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 39(10):1200-1201

Mandal MN, Ayyagari R (2006) Complement factor H: spatial and temporal expression and localization in the eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47(9):4091-4097

Manolio TA (2010) Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *The New England Journal of Medicine* 363(2):166-176

Manolio TA, Collins FS (2009) The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. *Annual Review of Medicine* 60:443-456

- Mari A, Amati F, Conti E, Bengala M, Novelli G, Dallapiccola B (1998) A highly polymorphic CA/GT repeat (LIMK1GT) within the Williams syndrome critical region. *Clinical Genetics* 53(3):226-227
- Marian AJ (1995) Molecular approaches for screening of genetic diseases. *Chest* 108(1):255-265
- Marian AJ (2012) Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Translational Research* 159(2):64-79
- Marian AJ, Belmont J (2011) Strategic approaches to unraveling genetic causes of cardiovascular diseases. *Circulation Research* 108(10):1252-1269
- Marineau C, Aubry M, Julien JP, Rouleau GA (1992) Dinucleotide repeat polymorphism at the D22S264 locus. *Nucleic Acids Research* 20(6):1430
- Marques-Bonet T, Eichler EE (2009) The evolution of human segmental duplications and the core duplicon hypothesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 74:355-362
- Marques-de-Faria AP, Ferraz VE, Acosta AX, Brunoni D (2004) Clinical genetics in developing countries: the case of Brazil. *Community Genetics* 7(2-3):95-105
- Marshall J (1987) The ageing retina: physiology or pathology. *Eye* 1:282-295
- Matullo G, Di Gaetano C, Guarrera S (2013) Next generation sequencing and rare genetic variants: from human population studies to medical genetics. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54(7):518-532
- McDonald-McGinn DM, Sullivan KE (2011) Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine* 90(1):1-18
- McKay GJ, Silvestri G, Patterson CC, Hogg RE, Chakravarthy U, Hughes AE (2009) Further assessment of the complement component 2 and factor B region

associated with age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50(2):533–539

McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, Vingerling JR, Ho L, de Jong PT, Fletcher AE, Young IS et al (2011) Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration- a pooled analysis of 15 studies. *Human Mutation* 32(2):1407-1416

Mefford HC, Sharp AJ, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney VK, Crolla JA, Baralle D et al (2008) Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *The New England Journal of Medicine* 359(16):1685-1699

Meng Y, Zhang Y, Tregoubov V, Janus C, Cruz L, Jackson M, Lu WY, MacDonald JF, Wang JY, Falls DL et al (2002) Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35(1):121-133

Merla G, Brunetti-Pierrri N, Micale L, Fusco C (2010) Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Human Genetics* 128(1):3-26

Merritt JL, Lindor NM (2008) Further clinical description of duplication of Williams-Beuren region presenting with congenital glaucoma and brachycephaly. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A(8):1055-1058

Mervis CB, Klein-Tasman BP (2000) Williams syndrome: cognition, personality, and adaptive behavior. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 6(2):148-158

Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology* 172(5):2731-2738

Metcalf K, Simeonov E, Beckett W, Donnai D, Tassabehji M (2005) Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clinical Dysmorphology* 14(2):61-65

- Metz CE (1978) Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Medicine* 8(4):283-298
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11(1):31-46
- Michaelovsky E, Frisch A, Carmel M, Patya M, Zarchi O, Green T, Basel-Vanagaite L, Weizman A, Gothelf D (2012) Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome. *BMC Medical Genetics* 13:122
- Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK et al (2011) Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* 470(7332):59-65
- Mitchell P, Smith W, Attebo K, Wang JJ (1995) Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 102(10):1450-1460
- Moody A, Sellers S, Bumstead N (2000) Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 85(1-2):55-64
- Moncrieff J (2009) A critique of the dopamine hypothesis of schizophrenia and psychosis. *Harvard Review of Psychiatry* 17(3):214-225
- Morris CA, Loker J, Ensing G, Stock AD (1993) Supravalvular aortic stenosis cosegregates with a familial 6; 7 translocation which disrupts the elastin gene. *American Journal of Medical Genetics* 46(6):737-744
- Morrow B, Goldberg R, Carlson C, Das Gupta R, Sirotkin H, Collins J, Dunham I, O'Donnell H, Scambler P, Shprintzen R et al (1995) Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 56(6):1391-1403

- Mullins RF, Aptsiauri N, Hageman GS (2001) Structure and composition of drusen associated with glomerulonephritis: implications for the role of complement activation in drusen biogenesis. *Eye (London)* 15(Pt 3):390-395
- Naidoo N, Pawitan Y, Soong R, Cooper DN, Ku CS (2011) Human genetics and genomics a decade after the release of the draft sequence of the human genome. *Human Genomics* 5(6):577-622
- Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, Sobrin L, Parker M, Raychaudhuri S, Tan PL, Oh EC, Merriam JE, Souied E et al (2010) Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16):7395-7400
- Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA (2009) Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324(5925):387-389
- Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, Najjar SS, Zhao JH, Heath SC, Eyheramendy S et al (2009) Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nature Genetics* 41(6):666-676
- Ng TK, Chen LJ, Liu DT, Tam PO, Chan WM, Liu K, Hu YJ, Chong KK, Lau CS, Chiang SW et al (2008) Multiple gene polymorphisms in the complement factor H gene are associated with exudative age-related macular degeneration in Chinese. *Investigative of Ophthalmology & Visual Science* 49(8):3312-3317
- Nickerson E, Greenberg F, Keating MT, McCaskill C, Shaffer LG (1995) Deletions of the elastin gene at 7q11.23 occur in approximately 90% of patients with Williams syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 56(5):1156-1161
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annual Review of Physiology* 64:313-353

- Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ et al (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7):2328-2333
- Orellana C, Bernabeu J, Monfort S, Roselló M, Oltra S, Ferrer I, Quiroga R, Martínez-Garay I, Martínez F (2008) Duplication of the Williams-Beuren critical region: case report and further delineation of the phenotypic spectrum. *BMJ Case Reports*
- Organização Mundial de Saúde (OMS) (2000) World Health Organization, Human Genetics Programme. Primary health care approaches for prevention and control of congenital disorders and disability. Geneva: World Health Organization
- Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, Costa T, Grebe T, Cox S, Tsui LC et al (2001) A 1.5 million-base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nature Genetics* 29(3):321-325
- Oshima Y, Ishibashi T, Murata T, Tahara Y, Kiyohara Y, Kubota T (2001) Prevalence of age related maculopathy in a representative Japanese population: the Hisayama study. *British Journal of Ophthalmology* 85(10):1153–1157
- Paterlini M, Zakharenko SS, Lai WS, Qin J, Zhang H, Mukai J, Westphal KG, Olivier B, Sulzer D, Pavlidis P et al (2005) Transcriptional and behavioral interaction between 22q11.2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice. *Nature Neuroscience* 8(11):1586-1594
- Pena SDJ (2005) Aconselhamento genético da criança com deficiência mental. In: *Deficiência Mental: Abordagem Multidisciplinar*, fascículo no. 4 da série APAE de São Paulo, pp 1-19
- Pena SDJ (2008) Diagnóstico diferencial da criança com deficiência mental. In: *Diagnóstico Diferencial em Pediatria* (LMS Freire, ed) Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, pp 782-788

- Pena SDJ, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP (2009) DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42(10):870-876
- Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO et al (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6(2):e17063
- Perez E, Sullivan KE (2002) Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *Current Opinion in Pediatrics* 14(6):678-683
- Pezet M, Jacob MP, Escoubet B, Gheduzzi D, Tillet E, Perret P, Huber P, Quaglino D, Vranckx R, Li DY et al (2008) Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. *Rejuvenation Research* 11(1):97-112
- Pober, BR (2010) Williams–Beuren Syndrome. *The New England Journal of Medicine* 362(3):239-252
- Pober BR, Johnson M, Urban Z (2008) Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 118(5):1606-1615
- Portnoi MF (2009) Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 52(2–3):88-93
- Prasad SE, Howley S, Murphy KC (2008) Candidate genes and the behavioral phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Developmental Disabilities Research Reviews* 14(1):26-34
- Prasad PS, Schwartz SD, Hubschman JP (2010) Age-related macular degeneration: current and novel therapies. *Maturitas* 66(1):46-50



- Pritchard JK (2001) Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *The American Journal of Human Genetics* 69(1):124-137
- Pritchard JK, Rosenberg NA (1999) Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *The American Journal of Human Genetics* 65(1):220-228
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945-959
- Priya RR, Chew EY, Swaroop A (2012a) Genetic studies of age-related macular degeneration: lessons, challenges, and opportunities for disease management. *Ophthalmology* 119(12):2526-2536
- Priya RR, Rajasimha HK, Brooks MJ, Swaroop A (2012b) Exome sequencing: capture and sequencing of all human coding regions for disease gene discovery. *Methods in Molecular Biology* 884:335-351
- Pröschel C, Blouin MJ, Gutowski NJ, Ludwig R, Noble M (1995) Limk1 is predominantly expressed in neural tissues and phosphorylates serine, threonine and tyrosine residues in vitro. *Oncogene* 11(7):1271-1281
- Ragoussis J (2009) Genotyping technologies for genetic research. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10:117-133
- Ratnapriya R, Chew EY (2013) Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. *Clinical Genetics* 84(2):160-166
- Raux G, Bumsel E, Hecketsweiler B, van Amelsvoort T, Zinkstok J, Manouvrier-Hanu S, Fantini C, Brévière GM, Di Rosa G, Pustorino G et al (2007) Involvement of hyperprolinemia in cognitive and psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome. *Human Molecular Genetics* 16(1):83-91

- Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, Tan PL, Tai AK, Ripke S, Gowrisankar S, Vemuri S, Montgomery K, Yu Y et al (2011) A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 43(12):1232-1236
- Redon R, Rio M, Gregory SG, Cooper RA, Fiegler H, Sanlaville D, Banerjee R, Scott C, Carr P, Langford C et al (2005) Tiling path resolution mapping of constitutional 1p36 deletions by array-CGH: contiguous gene deletion or “deletion with positional effect” syndrome? *Journal of Medical Genetics* 42(2):166-171
- Ritney CD (2003) Learning difficulties: what the neurologist needs to know. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74 Suppl 1:i30-36
- Robin NH, Shprintzen RJ (2005) Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *The Journal of Pediatrics* 147(1):90-96
- Romanoski CE, Che N, Yin F, Mai N, Pouldar D, Civelek M, Pan C, Lee S, Vakili L, Yang WP et al (2011) Network for activation of human endothelial cells by oxidized phospholipids: a critical role of heme oxygenase 1. *Circulation Research* 109(5):e27-41
- Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Ceulemans B, Van Den Ende J, Van Bever Y, Kooy RF (2004) Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Human Mutation* 23(1):17-21
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY, MARINA Study Group (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 355(14):1419-1431
- Rosenfeld JA, Crolla JA, Tomkins S, Bader P, Morrow B, Gorski J, Troxell R, Forster-Gibson C, Cilliers D, Hislop RG et al (2010) Refinement of Causative Genes in

Monosomy 1p36 Through Clinical and Molecular Cytogenetic Characterization of Small Interstitial Deletions. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A(8):1951-1959

Ross RJ, Bojanowski CM, Wang JJ, Chew EY, Rohtchina E, Ferris FL 3rd, Mitchell P, Chan CC, Tuo J (2007) The LOC387715 polymorphism and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Investigative of Ophthalmology & Visual Science* 48(3):1128-1132

Ruiter EM, Bongers EM, Smeets D, Kuijpers-Jagtman AM, Hamel BC (2003) No justification of routine screening for 22q11 deletions in patients with overt cleft palate. *Clinical Genetics* 64(3):216-219

Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M et al. (1997) Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *Journal of Medical Genetics* 34(10):798-804

Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R (1993) The Williams syndrome: evidence for possible autosomal dominant inheritance. *American Journal of Medical Genetics* 47(4):468-470

SanGiovanni JP, Chew EY, Agrón E, Clemons TE, Ferris FL 3rd, Gensler G, Lindblad AS, Milton RC, Seddon JM, Klein R et al (2008) The relationship of dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake with incident age-related macular degeneration: AREDS report no. 23. *Archives of Ophthalmology* 126(9):1274-1279

Saugier-veber P, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, de La Rochebrochard C, Layet V, Drouot N, Le Meur N, Gilbert-Du-Ssardier B, Joly-Hélas G, Moïrot H et al (2006) Simple detection of genomic microdeletions and microduplications using QMPSF in patients with idiopathic mental retardation. *European Journal of Human Genetics* 14(9):1009-1017

- SBO - Sociedade Brasileira de Oftalmologia (2010) As três principais doenças oculares que acometem os idosos. Disponível online em: [http://www.sboportal.org.br/site2/destaque/setembro\\_2010/destaque.asp](http://www.sboportal.org.br/site2/destaque/setembro_2010/destaque.asp)
- Scambler PJ (2000) The 22q11 deletion syndromes. *Human Molecular Genetics* 9(16):2421-2426
- Scherer SW, Gripp KW, Lucena J, Nicholson L, Bonnefont JP, Pérez-Jurado LA, Osborne LR (2005) Observation of a parental inversion variant in a rare Williams-Beuren syndrome family with two affected children. *Human Genetics* 117(4):383-388
- Schmidt S, Hauser MA, Scott WK, Postel EA, Agarwal A, Gallins P, Wong F, Chen YS, Spencer K, Schnetz-Boutaud N et al (2006) Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. *The American Journal of Human Genetics* 78(5):852–864
- Scholl HP, Fleckenstein M, Fritsche LG, Schmitz-Valckenberg S, Göbel A, Adrion C, Herold C, Keilhauer CN, Mackensen F, Mössner A et al (2009) CFH, C3 and ARMS2 are significant risk loci for susceptibility but not for disease progression of geographic atrophy due to AMD. *PLoS One* 4(10):e7418
- Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ (2009) Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Current Opinion in Genetics & Development* 19(3):212-219
- Schubert C (2009) The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell and Molecular Life Sciences* 66(7):1178-1197
- Schubert C, Laccone F (2006) Williams-Beuren syndrome: Determination of deletion size using quantitative real-time PCR. *International Journal of Molecular Medicine* 18(5):799-806

- Scott RW, Olson MF (2007) LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)* 85(6):555-568
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M et al (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305(5683):525-528
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J et al (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316(5823):445-449
- Seddon JM, Santangelo SL, Book K, Chong S, Cote J (2003) A genome wide scan for age-related macular degeneration provides evidence for linkage to several chromosomal regions. *The American Journal of Human Genetics* 73(4):780–790
- Seddon JM, Chen CA (2004) The epidemiology of age-related macular degeneration. *International Ophthalmology Clinics* 44(4):17–39
- Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC (2005) The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Archives of Ophthalmology* 123(3):321-327
- Seddon JM, Sharma S, Adelman RA (2006) Evaluation of clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology* 113(2):260-266
- Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML (2007) Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA* 297(16):1793-1800
- Seddon JM, Reynolds R, Maller J, Fagerness JA, Daly MJ, Rosner B (2009) Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables. *Investigative & Ophthalmology Visual Science* 50(5):2044-2053

- Shaffer LG (2005) American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genetics in Medicine* 7(9):650-654
- Shaffer LG, Lupski JR (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annual Review of Genetics* 34:297-329
- Shaffer LG, Heilstedt HA (2001) Terminal deletion of 1p36. *The Lancet* 358:S9
- Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA (2006) Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *Journal of Pediatrics* 149(1):98-102
- Shaffer LG, Bejjani BA (2009) Using microarray-based molecular cytogenetic methods to identify chromosome abnormalities. *Pediatric Annals* 38(8):440-447
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML et al (2000) Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Human Molecular Genetics* 9(4):489-501
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG (1997) Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 61(3):642-650
- Shevell M, Ashwal S, Donley D, Flint J, Gingold M, Hirtz D, Majnemer A, Noetzel M, Sheth RD, Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology et al (2003) 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* 60(3):367-380

- Shprintzen RJ (2008) Velo-cardio-facial Syndrome: 30 Years of Study. *Developmental Disabilities Research Reviews* 14(1):3-10
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Lewin ML, Sidoti EJ, Berkman MD, Argamaso RV, Young D (1978) A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 15(1):56-62
- Shprintzen RJ, Goldberg RB, Young D, Wolford L (1981) The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics* 67(2):167–172
- Sijben JW, Klasing KC, Schrama JW, Parmentier HK, van der Poel JJ, Savelkoul HF, Kaiser P (2003) Early in vivo cytokine genes expression in chickens after challenge with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide and modulation by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Developmental & Comparative Immunology* 27(6-7):611-619
- Sivakumaran TA, Igo RP Jr, Kidd JM, Itsara A, Kopplin LJ, Chen W, Hagstrom SA, Peachey NS, Francis PJ, Klein ML et al (2011) A 32 kb Critical Region Excluding Y402H in CFH Mediates Risk for Age-Related Macular Degeneration. *PLoS One* 6(10):e25598
- Slavotinek AM (2008) Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Human Genetics* 124(1):1-17
- Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, de Jong PT (2001) Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 108(4):697-704
- Sobrin L, Ripke S, Yu Y, Fagerness J, Bhangale TR, Tan PL, Souied EH, Buitendijk GH, Merriam JE, Richardson AJ et al (2012) Heritability and genome-wide association study to assess genetic differences between advanced age-related macular degeneration subtypes. *Ophthalmology* 119(9):1874-1885

- Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Pérez-Jurado LA et al (2005) Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *The New England Journal of Medicine* 353(16):1694-1701
- Sørensen KM, Agergaard P, Olesen C, Andersen PS, Larsen LA, Ostergaard JR, Schouten JP, Christiansen M (2010) Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. *Journal of Molecular Diagnostics* 12(2):147-151
- Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA, Haines JL (2007) Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Human Molecular Genetics* 16(16):1986–1992
- Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, Gallins P, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA, Haines JL (2008) C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Human Molecular Genetics* 17(12):1821-1824
- Spencer KL, Olson LM, Schnetz-Boutaud N, Gallins P, Agarwal A, Iannaccone A, Kritchevsky SB, Garcia M, Nalls MA, Newman AB et al (2011) Using genetic variation and environmental risk factor data to identify individuals at high risk for age-related macular degeneration. *PLoS One* 6(3):e17784
- Stachon AC, Baskin B, Smith AC, Shugar A, Cytrynbaum C, Fishman L, Mendoza-Londono R, Klatt R, Teebi A, Ray PN et al (2007) Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A(24):2924-2930
- Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Current Opinion in Genetics & Development* 12(3):312-319



- Stankiewicz P, Beaudet AL (2007) Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Current Opinion in Genetics & Development* 17(3):182-192
- Stein JD, Brown MM, Brown GC, Hollands H, Sharma S (2003) Quality of life with macular degeneration: perceptions of patients, clinicians, and community members. *British Journal of Ophthalmology* 87(1):8-12
- Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha PS, 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
- Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K (2002) Prevalence estimation of Williams syndrome. *Journal of Child Neurology* 17(4):269-271
- Sturm RA, Duffy DL, Zhao ZZ, Leite FP, Stark MS, Hayward NK, Martin NG, Montgomery GW (2008) A Single SNP in an Evolutionary Conserved Region within Intron 86 of the HERC2 Gene Determines Human Blue-Brown Eye Color. *The American Journal of Human Genetics* 82(2):424-431
- Swaroop A, Branham KE, Chen W, Abecasis G (2007) Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Human Molecular Genetics* 16 (2):R174-R182
- Swaroop A, Chew EY, Rickman CB, Abecasis GR (2009) Unravelling a late-onset multifactorial disease: From genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10:19-43
- Tam E, Young EJ, Morris CA, Marshall CR, Loo W, Scherer SW, Mervis CB, Osborne LR (2008) The common inversion of the Williams-Beuren syndrome region at 7q11.23 does not cause clinical symptoms. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A(14):1797-1806

- Tassabehji M (2003) Williams-Beuren syndrome: a challenge for genotype-phenotype correlations. *Human Molecular Genetics* 12(Suppl 2):R229-R237
- Teixeira AG, Silva AS, Lin FL, Velletri R, Bavia L, Belfort R Jr, Isaac L (2010) Association of complement factor H Y402H polymorphism and age-related macular degeneration in Brazilian patients. *Acta Ophthalmologica* 88(5):e165-169
- Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, Pirruccello JP, Ripatti S, Chasman DI, Willer CJ et al (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466(7307):707-713
- Thakkinstian A, McKay GJ, McEvoy M, Chakravarthy U, Chakrabarti S, Silvestri G, Kaur I, Li X, Attia J (2011) Systematic review and meta-analysis of the association between complement component 3 and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 173(12):1365-1379
- The International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437(7063):1299-1320
- Theisen A, Shaffer LG (2010) Disorders caused by chromosome abnormalities. *The Application of Clinical Genetics* 3:159-174
- Thomas JA, Graham JM Jr (1997) Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clinical Pediatrics (Philadelphia)* 36(5):253-266
- Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjani NL, Vinos SA, Basilico C, Campochiaro PA (1998) Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *American Journal of Pathology* 153(5):1641-1646

- Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Larson JM, Ghanta S, Feng Y, Simpson PM, Broeckel U, Duffy K, Tweddell JS, Grossman WJ et al (2010) Multiplexed quantitative real-time PCR to detect 22q11.2 deletion in patients with congenital heart disease. *Physiological Genomics* 42A(1):52-60
- Torniero C, Dalla Bernardina B, Novara F, Cerini R, Bonaglia C, Pramparo T, Ciccone R, Guerrini R, Zuffardi O (2008) Dysmorphic features, simplified gyral pattern and 7q11.23 duplication reciprocal to the Williams-Beuren deletion. *European Journal of Human Genetics* 16(8):880-887
- Travassos C, de Oliveira EXG, Viacava F (2006) Desigualdades geográficas e sociais no acesso aos serviços de saúde no Brasil: 1998 e 2003. *Ciência e Saúde Coletiva* 11(4):975-986
- Tsongalis GJ, Coleman WB (2006) Clinical genotyping: the need for interrogation of single nucleotide polymorphisms and mutations in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 363(1-2):127-137
- Tunbridge E, Burnet PW, Sodhi MS, Harrison PJ (2004) Catechol-o-methyltransferase (COMT) and proline dehydrogenase (PRODH) mRNAs in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *Synapse* 51(2):112-118
- Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR (2006) Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biological Psychiatry* 60(2):141-151
- Turner DJ, Miretti M, Rajan D, Fiegler H, Carter NP, Blayney ML, Beck S, Hurles ME (2008) Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nature Genetics* 40(1): 90-95
- Urban AE, Korbel JO, Selzer R, Richmond T, Hacker A, Popescu GV, Cubells JF, Green R, Emanuel BS, Gerstein MB et al (2006) High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling

oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(12):4534-4539

Urbán Z, Csiszár K, Fekete G, Boyd CD (1997) A tetranucleotide repeat polymorphism within the human elastin gene (ELN1). *Clinical Genetics* 51(2):133-134

Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B et al (2009) Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 52(2-3):94-100

van de Ven JP, Nilsson SC, Tan PL, Buitendijk GH, Ristau T, Mohlin FC, Nabuurs SB, Schoenmaker-Koller FE, Smailhodzic D, Campochiaro PA et al (2013) A functional variant in the CFI gene confers a high risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 45(7):813-817

van Hagen JM, Eussen HJ, van Schooten R, van Der Geest JN, Lagers-van Haselen GC, Wouters CH, De Zeeuw CI, Gille JJ (2007) Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genetic Testing* 11(3):321-327

VanNewkirk MR, Nanjan MB, Wang JJ, Mitchell P, Taylor HR, McCarty CA (2000) The prevalence of age-related maculopathy: the visual impairment project. *Ophthalmology* 107(8):1593-1600

Vasconcelos MM (2004) Mental retardation. *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)* 80(2 Suppl):S71-82

Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C et al (2007) Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *European Journal of Human Genetics* 15(11):1105-1114

- Viana MM (2013) Contribuição do fenótipo para o diagnóstico de síndromes de microdeleções por meio de metodologia adequada à realidade brasileira. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais
- Vieira GH, Rodriguez JD, Boy R, de Paiva IS, DuPont BR, Moretti-Ferreira D, Srivastava AK (2011) Differential diagnosis of Smith-Magenis syndrome: 1p36 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 155A(5):988-992
- Vieira TP, Sgardioli IC, Gil-da-Silva-Lopes VL (2013) Genetics and public health: the experience of a reference center for diagnosis of 22q11.2 deletion in Brazil and suggestions for implementing genetic testing. *Journal of Community Genetics* 4(1):99-106
- Vorstman JA, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS (2006) MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Human Mutation* 27(8):814-821
- Zareparsis S, Branham KE, Li M, Shah S, Klein RJ, Ott J, Hoh J, Abecasis GR, Swaroop A (2005) Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *The American Journal of Human Genetics* 77(1):149-153
- Zenker M, Rittinger O, Grosse KP, Speicher MR, Kraus J, Rauch A, Trautmann U (2002) Monosomy 1p36 - a recently delineated, clinically recognizable syndrome. *Clinical Dysmorphology* 11(1):43-48
- Zhang X, Zhu J, Yang GY, Wang QJ, Qian L, Chen YM, Chen F, Tao Y, Hu HS, Wang T et al (2007) Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nature Cell Biology* 9(7):743-754
- Zweig MH, Campbell G (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry* 39(4):561-577

- Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM, Nord AS, Kusenda M, Malhotra D, Bhandari A et al (2008) Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 320(5875):539-543
- Wang JY, Frenzel KE, Wen D, Falls DL (1998) Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *The Journal of Biological Chemistry* 273(32):20525-20534
- Wang G, Spencer KL, Court BL, Olson LM, Scott WK, Haines JL, Pericak-Vance MA (2009) Localization of age-related macular degeneration-associated ARMS2 in cytosol, not mitochondria. *Investigative of Ophthalmology & Visual Science* 50(7):3084-3090
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G (2002) Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 71(4):854-862
- Weeks DE, Conley YP, Tsai HJ, Mah TS, Schmidt S, Postel EA, Agarwal A, Haines JL, Pericak-Vance MA, Rosenfeld PJ et al (2004) Age-related maculopathy: a genome-wide scan with continued evidence of susceptibility locos within the 1q31, 10q26 and 17q25 regions. *The American Journal of Human Genetics* 75(2):174-189
- Weise A, Gross M, Mrasek K, Mkrtchyan H, Horsthemke B, Jonsrud C, Von Eggeling F, Hinreiner S, Witthuhn V, Claussen U et al (2008) Parental-origin-determination fluorescence in situ hybridization distinguishes homologous human chromosomes on a single-cell level. *International Journal of Molecular Medicine* 21(2):189-200
- Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, Pekova S, Bhatt S, Kosyakova N, Liehr T (2012) Microdeletion and microduplication syndromes. *Journal of Histochemistry Cytochemistry* 60(5):346-358

- Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, Squire JA (2005) A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics* 6(180):1-10
- Weksberg R, Stachon AC, Squire JA, Moldovan L, Bayani J, Meyn S, Chow E, Bassett AS (2007) Molecular characterization of deletion breakpoints in adults with 22q11 deletion syndrome. *Human Genetics* 120(6):837-845
- WHO - World Health Organization (2001) *The World Health Report 2001 - Mental Health: New Understanding, New Hope*. World Health Organization
- WHO - World Health Organization (2006) *Medical genetic services in developing countries. The ethical, legal and social implications of genetic testing and screening*. Human Genetics, Chronic Diseases and Health Promotion, WHO, Geneva. Available at <http://www.who.int/genomics/publications/GTS-MedicalGeneticServices-oct06.pdf>
- WHO - World Health Organization (2010) *Global Data on Visual Impairments 2010*. Geneva. Available online at: <http://www.who.int/blindness/GLOBALDATAFINALforweb.pdf>
- Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR (2005) A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *The American Journal of Human Genetics* 76(5):887-893
- Williams NM (2011) Molecular mechanisms in 22q11 deletion syndrome. *Schizophrenia Bulletin* 37(5):882-889
- Williams MA, Shprintzen RJ, Goldberg RB (1985) Male-to-male transmission of the velo-cardio-facial syndrome: a case report and review of 60 cases. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* 5(2):175-180

- Wu SC, Solaro RJ (2007) Protein kinase C zeta. A novel regulator of both phosphorylation and de-phosphorylation of cardiac sarcomeric proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 282(42):30691-30698
- Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, Chen H, Zhao Y, Pearson E, Li X et al (2006) A variant of the *HTRA1* gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314(5801):992–993
- Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF et al (2007) Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine* 357(6): 553–561
- Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA et al (2003) Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Human Molecular Genetics* 12(17):2145-2152
- Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, Souied EH, Richardson AJ, Merriam JE, Buitendijk GH et al (2011) Common variants near *FRK/COL10A1* and *VEGFA* are associated with advanced age-related macular degeneration. *Human Molecular Genetics* 20(18):3699-3709



## **7- Anexos**

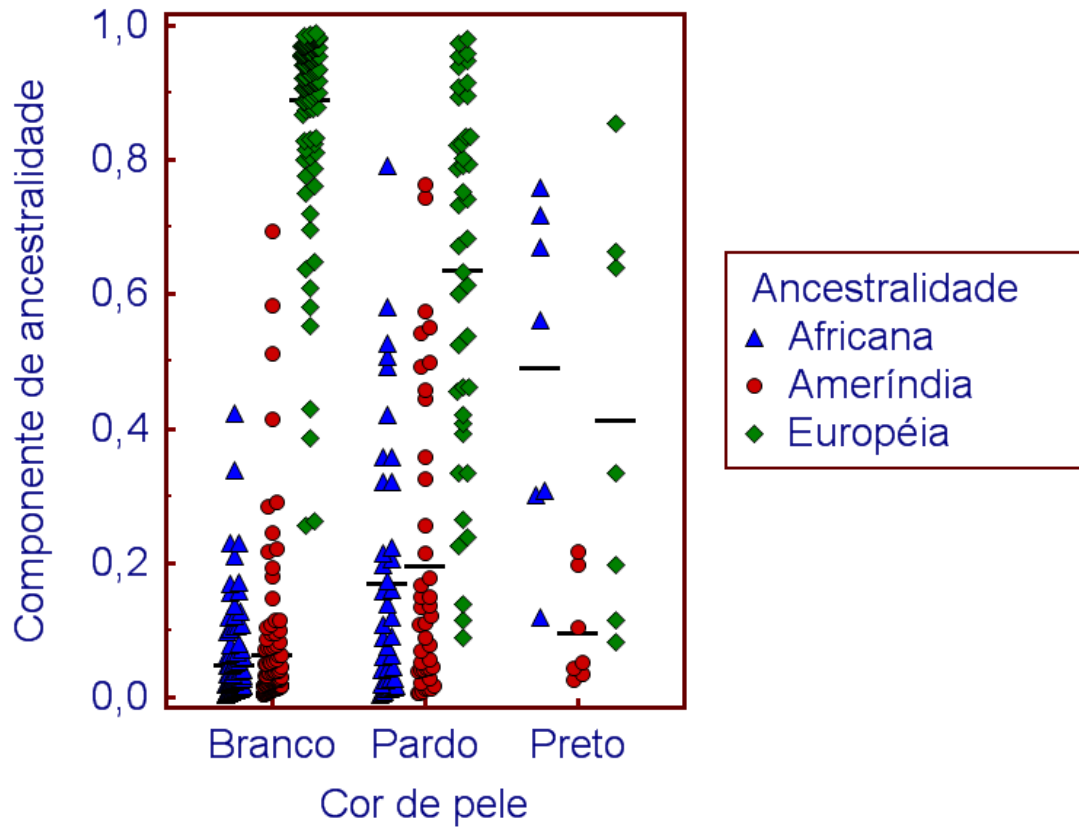
**Tabela A1. Resultados das análises estatísticas relacionando ancestralidade e cor de pele**

Ancestralidade	Classe de cor de pele	n	Teste de Kruskal-Wallis ( <i>p-value</i> )	Difere da classe de cor de pele <sup>a</sup>
Africana	Branco	115	< 1,00 x 10 <sup>-6</sup> *	Pardo e Preto
	Pardo	42		Branco e Preto
	Preto	7		Branco e Pardo
Ameríndia	Branco	115	< 4,00 x 10 <sup>-6</sup> *	Pardo e Preto
	Pardo	42		Branco
	Preto	7		Branco
Européia	Branco	115	< 1,00 x 10 <sup>-6</sup> *	Pardo e Preto
	Pardo	42		Branco
	Preto	7		Branco

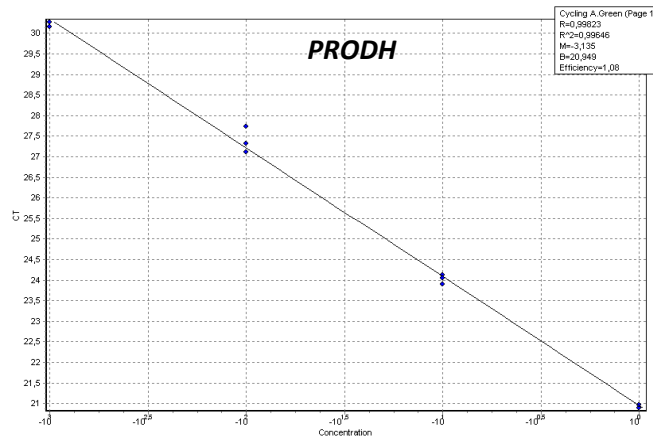
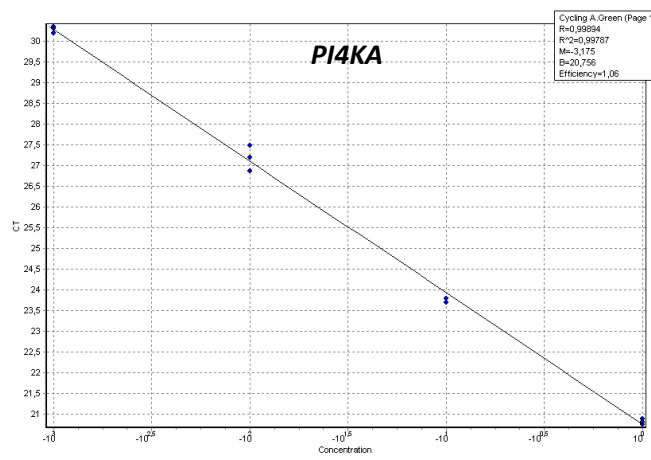
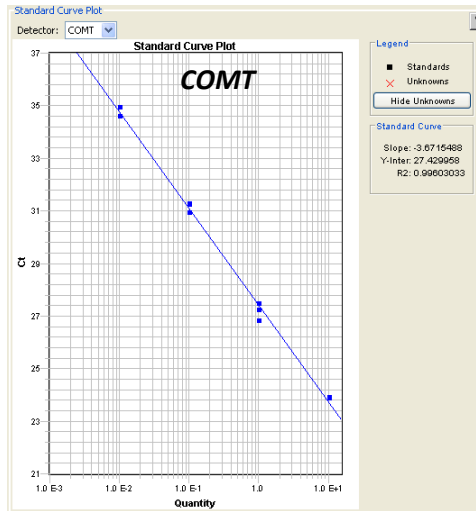
n: tamanho da amostra.

\* *P-value* estatisticamente significativo ( $\alpha = 0,05$ ).

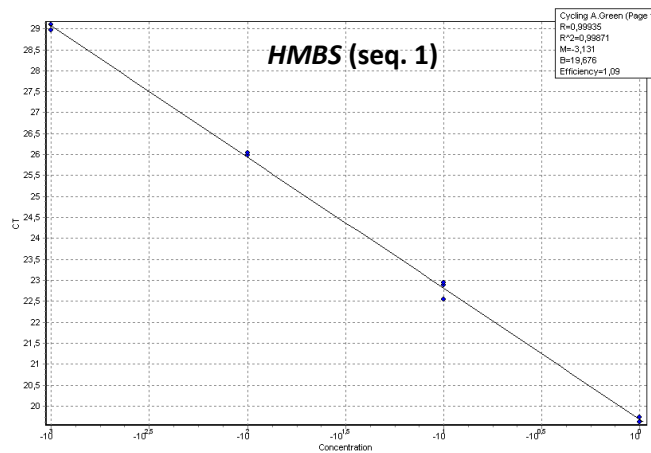
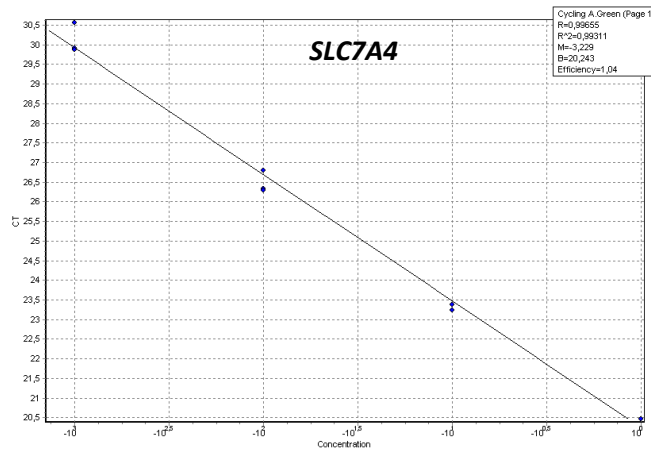
<sup>a</sup>Resultado do teste para comparação de pares de subgrupos de acordo com Conover et al. (1999), feito no *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).



**Figura A2. Gráfico de comparação múltipla mostrando a proporção de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia em cada classe de cor de pele (Branco, Pardo e Preto).** A barra preta horizontal representa a média. Esse gráfico foi obtido utilizando o *software MedCalc*, versão 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).



**Figura A3. Curva padrão para os marcadores *COMT*, *PI4KA* e *PRODH*.** Para cada marcador foi calculado o coeficiente de determinação ( $COMT = 0,9960$ ;  $PI4KA = 0,9979$ ;  $PRODH = 0,9965$ ), *slope* ( $COMT = -3,6715$ ;  $PI4KA = -3,1750$ ;  $PRODH = -3,1350$ ) e intercepto ( $COMT = 27,4299$ ;  $PI4KA = 20,7560$ ;  $PRODH = 20,9490$ ). Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).



**Figura A4. Curva padrão para os marcadores *SLC7A4* e *HMBS* (seq. 1).** Para cada marcador foi calculado o coeficiente de determinação [*SLC7A4* = 0,9931; *HMBS* (seq.1) = 0,9987], *slope* [*SLC7A4* = -3,2290; *HMBS* (seq.1) = -3,1310] e intercepto [*SLC7A4* = 20,2430; *HMBS* (seq.1) = 19,6760]. Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).

**Tabela A5. Resultados de  $\Delta KC_t$  para os 50 controles normais da VCFS**

Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$			
		<i>COMT</i>	<i>PI4KA</i>	<i>PRODH</i>	<i>SLC7A4</i>
	1	-0,1783	-0,1082	-0,0044	-0,0523
	2	0,3841	0,2436	0,3358	0,1917
	3	-0,4047	-0,1778	0,0618	-0,0393
	4	0,1497	0,2064	0,2131	0,1823
	5	-0,1891	-0,1097	-0,1702	0,1601
	6	0,0340	0,4198	0,2097	0,2389
	7	-0,0353	-0,0326	0,0395	0,0336
	8	0,1903	0,2927	0,1635	0,0341
	9	0,1330	0,0473	0,0195	0,2633
	10	-0,0311	0,3594	0,0997	0,0279
	11	0,1630	0,1823	0,0357	0,1852
	12	0,0984	0,1204	0,1189	0,1379
	13	0,1804	-0,1122	0,0162	-0,0526
	14	0,2232	0,0945	0,2368	0,3624
	15	0,2019	0,0552	0,1468	0,1440
	16	-0,0506	-0,1607	0,0963	0,1108
	17	0,1539	-0,0138	0,1369	0,1762
	18	-0,0299	-0,0349	-0,1632	0,0537
	19	-0,3860	-0,2233	-0,0448	-0,1173
	20	0,0896	0,0761	-0,0040	0,0536
	21	-0,3553	-0,0918	-0,1726	0,0718
	22	0,6915	0,3308	0,5277	0,2574
	23	0,1370	0,0253	-0,1564	-0,1240
	24	0,3469	0,4213	0,0433	0,0969
<b>VCFS_Controles Normais</b>	25	0,4243	0,2013	0,2123	0,1847
	26	-0,1603	0,1865	0,1928	0,3604
	27	-0,2172	-0,1501	-0,1066	-0,1898
	28	0,1872	0,0672	0,0147	0,2122
	29	0,1947	0,1145	0,4831	-0,0324
	30	-0,1934	0,0369	-0,2668	-0,2764
	31	-0,0866	0,1834	0,2429	0,0758
	32	0,3610	0,0192	-0,0469	0,2022
	33	0,1195	0,1363	0,2670	0,1499
	34	0,4374	0,3353	0,4569	0,2477
	35	0,0327	0,0298	0,1073	-0,0923
	36	0,0427	0,1398	0,3239	0,0077
	37	0,0633	-0,1067	-0,0433	-0,2467
	38	-0,0132	0,0877	-0,1029	-0,2070
	39	0,0753	0,1102	0,1264	0,0164
	40	0,4141	0,1136	0,2758	0,1017
	41	0,4179	0,2397	0,1731	0,1634
	42	-0,1282	0,2389	0,0039	0,3638
	43	0,0910	-0,2543	-0,3337	-0,1061
	44	0,5494	0,2497	-0,1533	0,1027
	45	-0,1355	-0,2840	-0,4537	-0,2454
	46	-0,2358	-0,5008	-0,3334	-0,1782
	47	-0,2474	-0,3823	-0,1544	0,1161
	48	0,4732	0,1508	-0,0432	0,0852
	49	-0,0544	-0,1371	-0,1631	0,0799
	50	-0,1465	-0,3284	-0,0532	0,0771

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; VCFS: síndrome velocardiocfacial.

**Tabela A6. Resultados de  $\Delta KC_t$  para VCFS\_Grupo 1**

Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$			
		<i>COMT</i>	<i>PI4KA</i>	<i>PRODH</i>	<i>SLC7A4</i>
<b>VCFS_Grupo 1</b>	1	-1,6543	-1,6222	-1,6231	-0,6462
	2	-1,1974	-1,2374	-1,1300	-1,1394
	3	-1,3924	-1,1362	-1,1038	-1,1617
	4	-1,5548	-1,1138	-1,2744	-0,9073
	5	-0,7976	-1,0379	-1,4872	-0,9275
	6	-1,0782	-1,2364	-1,4434	-1,0026
	7	-1,2143	-1,2965	-1,3899	-1,0776
	8	-1,1679	-1,4674	-1,3669	-1,1736
	9	-0,7741	-0,8419	-1,1113	-0,9260

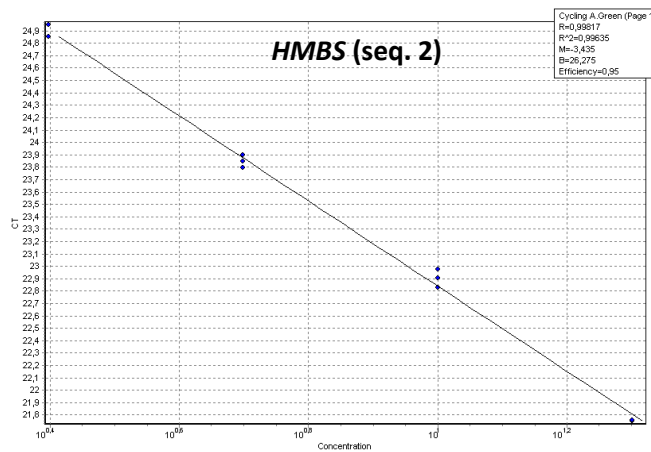
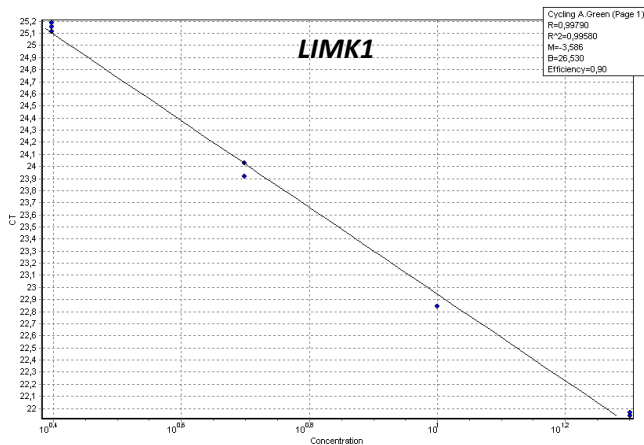
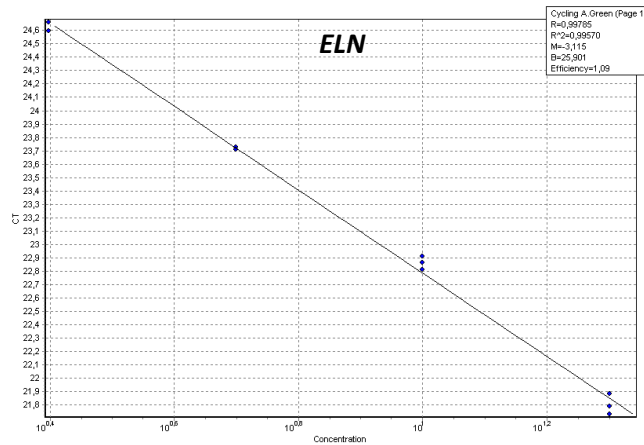
$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; VCFS: síndrome velocardiocfacial.

**Tabela A7. Resultados de  $\Delta KC_t$  para VCFS\_Grupo 2**

Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$			
		<i>COMT</i>	<i>PI4KA</i>	<i>PRODH</i>	<i>SLC7A4</i>
VCFS_Grupo 2	1	0,2648	-0,0681	0,1256	0,2394
	2	0,3375	-0,2073	-0,0628	0,3318
	3	0,1204	0,4017	0,0493	-0,0652
	4	0,0974	0,2587	0,0424	-0,0651
	5	0,3346	0,3708	0,2384	0,2208
	6	-0,0337	0,3242	0,1565	0,2579
	7	-0,1715	-0,0741	-0,0145	0,2008
	8	-0,1378	0,0035	-0,0497	-0,0590
	9	0,1904	0,3622	0,1263	0,0932
	10	0,0690	0,2518	-0,2312	-0,0556
	11	0,0978	0,0494	-0,1704	0,0711
	12	0,4945	0,1748	0,2985	0,0399
	13	0,4093	0,2256	-0,0854	0,3027
	14	0,2216	0,2724	0,1311	0,2050
	15	-0,1466	-0,0130	0,1355	0,0077
	16	0,2106	0,1419	0,2184	0,0730

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; VCFS: síndrome velocardiocfacial.





**Figura A8. Curva padrão para os marcadores *ELN*, *LIMK1* e *HMBS* (seq. 2).** Para cada marcador foi calculado o coeficiente de determinação [*ELN* = 0,9957; *LIMK1* = 0,9958; *HMBS* (seq. 2) = 0,9964], *slope* [*ELN* = -3,1150; *LIMK1* = -3,5860; *HMBS* (seq. 2) = -3,4350] e intercepto [*ELN* = 25,9010; *LIMK1* = 26,5300; *HMBS* (seq. 2) = 26,2750]. Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).

**Tabela A9. Resultados de  $\Delta KC_t$  para os 50 controles normais da WBS**

Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$	
		<i>ELN</i>	<i>LIMKI</i>
	1	0,0721	-0,0332
	2	-0,0027	0,1059
	3	-0,1143	-0,0762
	4	0,2310	0,3349
	5	-0,0222	0,0770
	6	0,0878	0,0981
	7	0,2336	0,1595
	8	0,0560	0,1100
	9	-0,1939	0,3843
	10	-0,0892	0,1389
	11	0,0537	0,2622
	12	0,1648	0,1242
	13	0,0748	0,1042
	14	-0,0430	0,1615
	15	-0,0755	0,0283
	16	-0,0055	0,2572
	17	-0,0047	-0,1255
	18	0,0156	0,3034
	19	0,1270	-0,0765
	20	0,2600	0,0516
	21	0,1041	0,0052
	22	-0,0731	0,1511
	23	-0,1775	0,1696
	24	0,1853	-0,0329
<b>WBS_Controles</b>	25	0,3233	-0,0703
<b>Normais</b>	26	0,2571	0,1763
	27	0,0304	0,2050
	28	0,0520	0,3292
	29	0,1056	0,3434
	30	0,1697	0,2432
	31	-0,1475	0,0453
	32	0,2395	0,2438
	33	0,1235	0,0568
	34	0,0875	0,0702
	35	-0,0925	-0,0098
	36	-0,1394	0,0951
	37	-0,0658	0,1823
	38	0,1898	0,1663
	39	0,2578	0,2708
	40	-0,0236	0,1877
	41	0,1025	0,3735
	42	-0,1246	0,0570
	43	-0,1276	-0,0469
	44	0,3117	0,0402
	45	-0,0897	0,0600
	46	-0,1036	0,0577
	47	-0,2223	0,1953
	48	-0,0652	0,1537
	49	0,0195	0,1815
	50	0,1122	0,0196

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; WBS: síndrome de Williams-Beuren.

**Tabela A10. Resultados de  $\Delta KC_t$  para WBS\_Grupo 1**

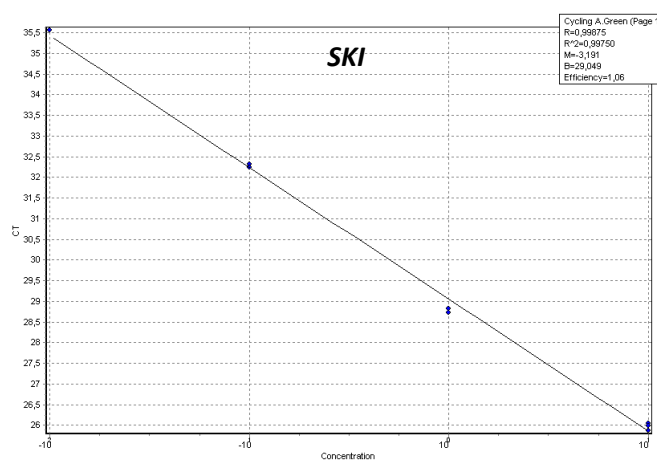
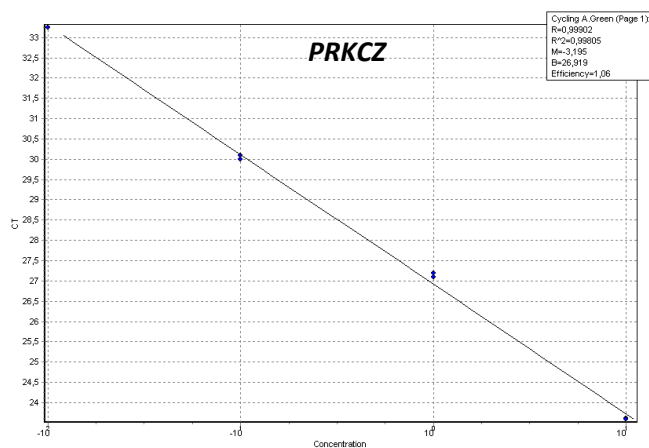
Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$	
		<i>ELN</i>	<i>LIMKI</i>
WBS_Grupo 1	1	-0,9114	-0,7306
	2	-0,7498	-0,7575
	3	-0,6780	-0,8826
	4	-0,9707	-0,8053
	5	-0,9035	-0,7650
	6	-0,7772	-1,0276
	7	-0,6594	-1,2101
	8	-0,8593	-1,0162
	9	-0,8206	-1,0225
	10	-0,8294	-1,0512
	11	-0,8205	-0,8169
	12	-0,9014	-0,9977
	13	-0,6952	-0,7770
	14	-0,5943	-0,7262
	15	-0,7228	-0,8027
	16	-0,9195	-0,9893
	17	-0,8842	-0,8326
	18	-1,0490	-1,1767

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; WBS: síndrome de Williams-Beuren.

**Tabela A11. Resultados de  $\Delta KC_t$  para WBS\_Grupo 2**

Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$	
		<i>ELN</i>	<i>LIMKI</i>
WBS_Grupo 2	1	0,1297	0,0700
	2	0,1306	0,2402
	3	0,0301	0,1954
	4	0,0351	0,1215
	5	0,1031	0,1793
	6	0,1784	0,1088
	7	0,0736	-0,0856
	8	0,0568	0,0065
	9	0,2307	0,3629
	10	0,2143	-0,0004

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas; WBS: síndrome de Williams-Beuren.



**Figura A12. Curva padrão para os marcadores *PRKCZ* e *SKI*.** Para cada marcador foi calculado o coeficiente de determinação ( $PRKCZ = 0,9981$ ;  $SKI = 0,9975$ ), *slope* ( $PRKCZ = -3,1950$ ;  $SKI = -3,1910$ ) e intercepto ( $PRKCZ = 26,9190$ ;  $SKI = 29,0490$ ). Esses gráficos foram obtidos utilizando *Rotor-Gene Q Series Software*, versão 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).

**Tabela A13. Resultados de  $\Delta KC_t$  para 50 controles normais da monossomia 1p36**

Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$	
		<i>PRKCZ</i>	<i>SKI</i>
	1	-0,0074	-0,2087
	2	-0,0467	-0,1680
	3	0,0793	0,0978
	4	0,0923	-0,1688
	5	-0,1521	-0,0831
	6	-0,0198	0,0886
	7	0,0035	0,0921
	8	-0,1814	-0,0329
	9	-0,2216	-0,1132
	10	0,0379	-0,2697
	11	-0,2022	-0,1232
	12	0,3551	-0,2088
	13	-0,0598	-0,0730
	14	-0,1319	-0,1181
	15	-0,1492	-0,2148
	16	-0,2138	-0,0623
	17	0,2010	-0,2487
	18	0,3441	0,1956
	19	-0,0950	-0,3521
	20	-0,1465	-0,2946
	21	-0,1079	-0,2855
	22	-0,0241	-0,2563
	23	-0,0348	-0,2170
	24	-0,2366	-0,1446
<b>1p36_Controles</b>	25	0,0103	-0,1026
<b>Normais</b>	26	-0,2395	-0,0786
	27	-0,3661	-0,2200
	28	-0,2513	-0,0660
	29	-0,3256	-0,3794
	30	0,0228	-0,3301
	31	-0,2923	-0,2553
	32	-0,1458	-0,3089
	33	-0,0347	-0,1881
	34	-0,1632	-0,1509
	35	-0,0198	0,0069
	36	-0,2690	-0,1764
	37	0,2061	-0,1931
	38	-0,0330	-0,1283
	39	-0,1300	-0,1682
	40	0,0382	0,0818
	41	0,0733	-0,2126
	42	-0,0118	0,1018
	43	0,1093	0,0932
	44	-0,0951	-0,2411
	45	-0,1358	-0,1519
	46	-0,1325	-0,1884
	47	0,0384	-0,0276
	48	0,0707	0,1046
	49	0,0891	0,1431
	50	-0,1565	-0,1126

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas

**Tabela A14. Resultados de  $\Delta KC_t$  para 1p36\_Grupo 1**

Classificação	Indivíduos	$\Delta KC_t$	
		<i>PRKCZ</i>	<i>SKI</i>
	1	-1,0444	-1,5803
	2	-0,9740	-1,0794
	3	-0,9203	-1,1887
	4	-1,2644	-1,2929
	5	-1,1825	-1,4869
	6	-1,1014	-1,1596
	7	-1,2279	-1,3524
	8	-1,1512	-1,3902
	9	-1,0553	-1,2166
	10	-1,1885	-1,0710
	11	-1,2278	<b>-0,2876</b>
	12	-0,9493	-1,3007
	13	-0,7394	-1,0284
	14	-0,8178	-0,8545
	15	-0,9758	-1,3748
	16	-1,1804	-0,8959
	17	-0,7972	-0,8640
	18	-0,8646	-1,2867
	19	-0,7494	-1,1506
<b>1p36_Grupo 1</b>	20	-0,8139	-0,7105
	21	-0,8971	-0,5823
	22	-0,7758	-0,7017
	23	-0,7976	-0,7339
	24	-0,7712	-0,9568
	25	-0,6676	-0,7665
	26	-0,8649	-1,0072
	27	-1,0624	-1,0569
	28	-0,8522	-1,0492
	29	-0,9593	-1,0733
	30	-0,9222	-1,1846
	31	-1,0196	-1,2841
	32	-1,0632	-1,1287
	33	-1,1011	-0,9986
	34	-0,9634	-1,1797
	35	-0,7056	-0,6125
	36	-0,8442	-0,5479
	37	-1,1256	-0,6454
	38	-1,1701	-0,7919
	39	-1,0243	-1,2477

$\Delta KC_t$ : alteração no número de cópias alélicas. O resultado de  $\Delta KC_t$  do marcador *SKI* para o paciente 11 está em negrito e indica a presença de duas cópias alélicas de *SKI*. Esse paciente apresentou microdeleção hemizigótica de *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1,2278$ ), confirmando que ele tem monossomia 1p36. Resultados iguais foram obtidos por MLPA (dados não mostrados).

**Tabela A15. Dados para o cálculo dos custos com reagentes e materiais de laboratório utilizados na triagem molecular de um paciente por qPCR (dois genes alvo e um gene de referência)**

<b>CUSTOS COM REAGENTES E MATERIAIS DE LABORATÓRIO (qPCR)</b>				
<b>Etapa 1a: Extração de DNA (1 paciente)</b>				
<b>Etapa</b>	<b>Reagente/Material</b>	<b>Consumo por exame</b>	<b>Base de cálculo</b>	<b>Preço final (R\$)</b>
Obtenção da amostra	Escova para coleta de swab oral	1 unidade	100 unid – R\$ 19,90	0,1990
	Etanol 70%	1,00 mL	500,00 mL – R\$ 73,04	0,1461
Extração	Tubo para armazenamento de swab oral	1 unidade	500 unid – R\$ 195,10	0,3902
	Isopropanol	0,60 mL	1000,00 mL – R\$ 58,08	0,0348
	LPA 0,25%	5,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	20,00 mL – R\$ 19,81	0,0050
	Microtubo (1,5 mL)	2 unidades	500 unid – R\$ 38,60	0,1544
	Cloreto de sódio (6,0 M)	0,04 g	1000,00 g – R\$ 184,00	0,0074
	Papel toalha	2 folhas	120 folhas – R\$ 3,25	0,0542
	Ponteiras 0,1 - 10 µL	3 unidades	960 unid – R\$ 156,00	0,4875
	Ponteiras 2,0 - 200 µL	6 unidades	960 unid – R\$ 157,00	0,9813
	Ponteiras 100 - 1000 µL	4 unidades	960 unid – R\$ 165,00	0,6875
	Proteinase K (20mg/mL)	10,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	25,00 mL – R\$ 908,57	0,3634
	Solução de High TE	200,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	200,00 mL – R\$ 4,93	0,0049
	Solução de Lise Madisen	270,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	200,00 mL – R\$ 10,37	0,0140
	Solução de Low TE	200,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	200,00 mL – R\$ 0,78	0,0008
	<b>Etapa 1b: Extração de DNA (1 controle negativo)<sup>a</sup></b>			
Obtenção da amostra	Escova para coleta de swab oral	1 unidade	100 unid – R\$ 19,90	0,1990
	Etanol 70%	1,00 mL	500,00 mL – R\$ 73,04	0,1461
	Tubo para armazenamento de swab oral	1 unidade	500 unid – R\$ 195,10	0,3902
Extração	DNA genômico	10,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	0,20 mL – R\$ 2,80	0,1400

(continuação na próxima página)



<b>Etapa 2: Quantificação de DNA (1 paciente + 1 controle negativo)</b>				
<b>Etapa</b>	<b>Reagente/Material</b>	<b>Consumo por exame</b>	<b>Base de cálculo</b>	<b>Preço final (R\$)</b>
Gel	Agarose	0,96g	500,00 g – R\$ 1200,00	2,3040
	TBE (1X)	120,00 mL	1000,00 mL – R\$ 7,20	0,8640
Preparo da amostra	GelRed™	12,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	500,00 mL – R\$ 648,70	0,0156
	Ponteiras 0,1 - 10 µL	26 unidades	960 unid – R\$ 156,00	4,2250
	Tampão de amostra (6X)	1,33 x 10 <sup>-3</sup> mL	3,00 mL – R\$ 137,00	0,0607
Corrida eletroforética	Padrões de concentração (10 padrões)	10,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	1,00 mL – R\$ 83,28	0,8328
	Ponteiras 0,1 - 10 µL	12 unidades	960 unid – R\$ 156,00	1,9500
	TBE (1X)	900,00 mL	1000,00 mL – R\$ 7,20	6,4800
<b>Etapa 3: qPCR (1 paciente + 1 controle negativo)</b>				
Diluição de DNA (10 ng/µL)	Microtubo (1,5 mL)	2 unidades	500 unid – R\$ 38,60	0,1544
	Água Nuclease-Free	40,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	50,00 mL – R\$ 201,50	0,1612
	Ponteiras 0,1 - 10 µL	2 unidades	960 unid – R\$ 156,00	0,3250
	Ponteiras 2,0 - 200 µL	2 unidades	960 unid – R\$ 157,00	0,3271
Ensaio de qPCR	Luvas sem talco	2 pares	50 pares – R\$ 23,89	0,9556
	Microtubos (0,6 mL)	3 unidades	500 unid – R\$ 60,75	0,3645
	Água Nuclease-Free	86,40 x 10 <sup>-3</sup> mL	50,00 mL – R\$ 201,50	0,3482
	Ponteiras 0,1 - 10 µL (com filtro)	12 unidades	960 unid – R\$ 281,00	3,5125
	Ponteiras 20 - 200 µL (com filtro)	6 unidades	960 unid – R\$ 266,00	1,6625
	Primer F (10 µM) (~20 pb por sequência)	24 reações	2500 reações – R\$ 36,00	0,3456
	Primer R (10 µM) (~20 pb por sequência)	24 reações	2500 reações – R\$ 36,00	0,3456
	Strip Tubes and Caps - 0,1 mL	21 unidades	1000 unid – R\$ 965,00	20,2650
SYBR® Green PCR Master MIX (2X)	120,00 x 10 <sup>-3</sup> mL	5,00 mL – R\$ 1108,61	26,6066	
<b>Custo com reagentes = R\$ 39,1083</b>				
<b>Custo com materiais de laboratório = R\$ 37,4033</b>				
<b>Custo total com reagentes e materiais de laboratório = R\$ 76,5116</b>				

<sup>a</sup>Um controle negativo deve estar presente em todas as corridas de qPCR.

Nos cálculos considerou-se a realização de análises em triplicata para cada par de iniciadores nas corridas de qPCR.

**Tabela A16. Dados para o cálculo dos custos relacionados à produção de soluções e padrões**

Soluções/Padrões				
Soluções/Padrões	Reagentes	Quantidade	Base de cálculo	Preço final (R\$)
Padrões de concentração (10 padrões) - 1,00 mL cada	Corante 6X com ficoll	1,67 mL	3,00 mL – R\$ 137,00	76,2633
	DNA genômico (100,0 ng/μL)	0,50 mL	0,20 mL – R\$ 2,80	7,0000
	H <sub>2</sub> O milli-Q q.s.p	5,00 mL	5000,00 mL – R\$ 12,50	0,0125
	Total = R\$ 83,2758 = R\$ 83,28			
High TE (200,00 mL)	EDTA	2,98 g	500,00 g – R\$ 368,00	2,1933
	H <sub>2</sub> O milli-Q q.s.p	200,00 mL	5000,00 mL – R\$ 12,50	0,5000
	Tris-HCl	3,15 g	500,00 g – R\$ 355,00	2,2365
	Total = R\$ 4,9298 = R\$ 4,93			
Low TE (200,00 mL)	EDTA	0,74 x 10 <sup>-1</sup> g	500,00 g – R\$ 368,00	0,0545
	H <sub>2</sub> O milli-Q q.s.p	200,00 mL	5000,00 mL – R\$ 12,50	0,5000
	Tris-HCl	0,32 g	500,00 g – R\$ 355,00	0,2272
	Total = R\$ 0,7817 = R\$ 0,78			
LPA 0,25% (20,00 mL)	Acetato de sódio	1,64 x 10 <sup>-3</sup> g	1000,00 g – R\$ 78,12	0,0001
	Acrilamida	5,00 g	500,00 g – R\$ 512,00	5,1200
	EDTA	0,37 x 10 <sup>-1</sup> g	500,00 g – R\$ 368,00	0,0272
	Etanol absoluto	25,00 mL	1000,00 mL – R\$ 96,45	2,4113
	H <sub>2</sub> O milli-Q q.s.p	30,00 mL	5000,00 mL – R\$ 12,50	0,0750
	Persulfato de amônio	2,28 g	250,00 g – R\$ 48,00	0,4378
	Temed	10,00 mL	100,00 mL – R\$ 100,48	10,0480
	Tris-HCl	0,63 x 10 <sup>-3</sup> g	500,00 g – R\$ 355,00	0,0004
	Tube falcon	1 unidade	25 unid – R\$ 42,20	1,6880
	Total = R\$ 19,8078 = R\$ 19,81			

(continuação na próxima página)

<b>Soluções / Padrões</b>	<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Base de cálculo</b>	<b>Preço final (R\$)</b>
Lise de Madisen (200,00 mL)	EDTA	2,98 g	500,00 g – R\$ 368,00	2,1933
	H <sub>2</sub> O milli-Q q.s.p	200,00 mL	5000,00 mL – R\$ 12,50	0,5000
	Cloreto de sódio	11,69 g	1000,00 g – R\$ 184,00	2,1510
	SDS	4,00 mL	500,00 mL – R\$ 411,00	3,2880
	Tris-HCl	3,15 g	500,00 g – R\$ 355,00	2,2365
	Total = R\$ 10,3687 = R\$ 10,37			
TBE 1X (1,00 x 10 <sup>3</sup> mL)	Ácido bórico	5,50 g	1000,00 g – R\$ 184,00	1,0120
	EDTA	0,75 g	500,00 g – R\$ 368,00	0,5520
	H <sub>2</sub> O milli-Q q.s.p	1000,00 mL	5000,00 mL – R\$ 12,50	2,5000
	Tris-base	10,80 g	500,00 g – R\$ 145,00	3,1320
	Total = R\$ 7,1960 = R\$ 7,20			

**Tabela A17. Dados para o cálculo dos custos com reagentes e materiais de laboratório utilizados na triagem molecular de um paciente por FISH (uma sonda alvo e uma sonda controle)**

<b>CUSTOS COM REAGENTES E MATERIAIS DE LABORATÓRIO (FISH)</b>				
<b>Etapa</b>	<b>Reagente/Material</b>	<b>Consumo por exame</b>	<b>Base de cálculo<sup>a</sup></b>	<b>Preço final (R\$)</b>
Cariótipo (sem a etapa de coloração da lâmina)	Ácido acético glacial	15,00 mL	1000,00 mL — R\$ 125,00	1,8750
	Álcool metílico	45,00 mL	1000,00 mL — R\$ 87,16	3,9222
	Cloreto de potássio	0,09 g	1000,00 g — R\$ 21,60	0,0019
	Colcemid 10 mg/mL	0,10 mL	10,00 mL — R\$ 56,50	0,5650
	Fitohemaglutinina	0,17 mL	10,00 mL — R\$ 172,00	2,9240
	Lâmina 26 x 76 mm	2 unidades	50 unid — R\$ 4,69	0,1876
	Meio de cultura RPMI 1640 com L-Glutamina e Tampão HEPES	8,69 mL	500,00 mL — R\$ 145,00	2,5201
	Microtubo (2,0 mL)	2 unidades	1 unid — R\$ 0,09	0,1800
	Óleo de imersão	0,1 mL	50,00 mL — R\$ 19,47	0,0389
	Penicilina/Estreptomicina	0,17 mL	20,00 mL — R\$ 74,00	0,6290
	Pipeta de plástico Pasteur descartável (3,0 mL)	5 unidades	1 unid — R\$ 0,04	0,2000
	Pipeta sorológica descartável (10,0 mL)	5 unidades	1 unid — R\$ 0,69	3,4500
	Ponteiras 2,0 - 200 µL	2 unidades	1 unid — R\$ 0,16	0,3200
	Ponteiras 100 - 1000 µL	1 unidade	1 unid — R\$ 0,17	0,1700
	Soro fetal bovino	1,04 mL	500,00 mL — R\$ 193,88	0,4033
	Tubo fundo cônico (15,0 mL)	2 unidades	1 unid — R\$ 0,30	0,6000

(continuação na próxima página)

<b>Etapa</b>	<b>Reagente/Material</b>	<b>Consumo por exame</b>	<b>Base de cálculo<sup>a</sup></b>	<b>Preço final (R\$)</b>
Preparo da lâmina de FISH	Citrato de sódio	0,88 g	1000,00 g — R\$ 389,80 *	0,3430
	Cloreto de sódio	1,75 g	1000,00 g — R\$ 184,00 *	0,3220
	Etanol absoluto	102,00 mL	1000,00 mL — R\$ 96,45 *	9,8379
	Lamínula de vidro 22 x 22 mm	2 unidades	100 unid — R\$ 1,01	0,0202
	Ponteiras 0,1 - 10 µL	2 unidades	1 unid — R\$ 0,16	0,3200
	Sonda de DNA VCFS/DGS TUPLE 1	1 teste	10 testes — R\$ 2218,41 *	221,8410
	Tween-20	0,02 mL	500,00 mL — R\$ 145,68	0,0058
<b>Custo com reagentes = R\$ 245,2291</b>				
<b>Custo com materiais de laboratório = R\$ 5,4478</b>				
<b>Custo total com reagentes e materiais de laboratório = R\$ 250,6769</b>				

<sup>a</sup>Para todos os reagentes, exceto para aqueles marcados em \* (citrato de sódio, cloreto de sódio, etanol absoluto e sonda de DNA VCFS/DGS TUPLE 1), os preços utilizados na coluna “base de cálculo” foram obtidos diretamente na seção de almoxarifado do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, com autorização do Dr. Leonardo Vasconcellos [coordenador de Ensino e Pesquisa da Unidade Funcional de Patologia e Medicina Laboratorial (UFPML) do Hospital das Clínicas da UFMG]. Nesse caso, os preços foram cotados por pregão eletrônico, o que pode, devido à concorrência, reduzir os custos de alguns reagentes e materiais de laboratório.

## **8- Apêndice**

## Research Article

# Accurate, Fast and Cost-Effective Diagnostic Test for Monosomy 1p36 Using Real-Time Quantitative PCR

Pricila da Silva Cunha,<sup>1</sup> Heloisa B. Pena,<sup>2</sup> Carla Sustek D'Angelo,<sup>3</sup>  
Celia P. Koiffmann,<sup>3</sup> Jill A. Rosenfeld,<sup>4</sup> Lisa G. Shaffer,<sup>5</sup> Martin Stofanko,<sup>2</sup>  
Higgo Gonçalves-Dornelas,<sup>2</sup> and Sérgio Danilo Junho Pena<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

<sup>2</sup> GENE-Núcleo de Genética Médica, Avenida Afonso Pena 3111, 9th Floor, Belo Horizonte 30130-909, MG, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, SP, Brazil

<sup>4</sup> Signature Genomic Laboratories, PerkinElmer, Inc., Spokane, WA 99207, USA

<sup>5</sup> Paw Print Genetics, Genetic Veterinary Sciences, Inc., Spokane, WA 99202, USA

Correspondence should be addressed to Sérgio Danilo Junho Pena; [spena@gene.com.br](mailto:spena@gene.com.br)

Received 30 December 2013; Accepted 11 February 2014; Published 15 April 2014

Academic Editor: Mariann Harangi

Copyright © 2014 Pricila da Silva Cunha et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Monosomy 1p36 is considered the most common subtelomeric deletion syndrome in humans and it accounts for 0.5–0.7% of all the cases of idiopathic intellectual disability. The molecular diagnosis is often made by microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH), which has the drawback of being a high-cost technique. However, patients with classic monosomy 1p36 share some typical clinical characteristics that, together with its common prevalence, justify the development of a less expensive, targeted diagnostic method. In this study, we developed a simple, rapid, and inexpensive real-time quantitative PCR (qPCR) assay for targeted diagnosis of monosomy 1p36, easily accessible for low-budget laboratories in developing countries. For this, we have chosen two target genes which are deleted in the majority of patients with monosomy 1p36: *PRKCZ* and *SKI*. In total, 39 patients previously diagnosed with monosomy 1p36 by aCGH, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), and/or multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) all tested positive on our qPCR assay. By simultaneously using these two genes we have been able to detect 1p36 deletions with 100% sensitivity and 100% specificity. We conclude that qPCR of *PRKCZ* and *SKI* is a fast and accurate diagnostic test for monosomy 1p36, costing less than 10 US dollars in reagent costs.

## 1. Introduction

Monosomy 1p36 (OMIM #607872) is one of the most common chromosome abnormalities in humans, affecting approximately 1 in 5,000 live births. It is considered the most common subtelomeric deletion syndrome in humans, resulting from a heterozygous deletion of the most distal chromosomal band on the short arm of chromosome 1 [1–3]. Monosomy 1p36 is generally sporadic [2] and is believed to account for 0.5–0.7% of all cases of idiopathic intellectual disability. Several mechanisms may be involved in the generation and/or stabilization of the rearrangements in the 1p36 region, which may include terminal and interstitial deletions,

derivative chromosomes, and more complex rearrangements, but the major mechanism stabilizing terminal deletions appears to be breakage-fusion-bridge (BFB) cycles [4]. There are no common breakpoints and the deletion sizes vary from <1 Mb to >10 Mb [2, 3, 5–8]. The majority of the patients with monosomy 1p36 have large terminal deletions [3], generally found within the first 4–5 Mb from the 1p telomere [2, 5, 7].

Patients with classic monosomy 1p36, who represent the majority of cases reported in the literature, have some typical clinical characteristics, with a phenotype that has been incorporated into standard malformation syndrome atlases [9]. It involves developmental delay and intellectual

disability, both generally severe to profound, hypotonia and feeding problems in infancy and characteristic dysmorphic facial features which include: microcephaly, large late-closing anterior fontanelle, deep-set eyes, broad nasal bridge, straight eyebrows, and pointed chin [2, 9, 10]. Other features in some individuals include seizures, hearing loss, structural heart defects, cardiomyopathy, and behavior abnormalities. Some recent studies have reported the identification of a small proportion of patients with atypical “expanded” 1p36 phenotype, making the differential diagnosis difficult [11, 12]; however, according to Giannikou et al. [12], in these cases, the coexistence of additional “copy number variants” (CNVs) elsewhere in the genome may affect and explain partially or completely the variability of their clinical phenotype.

The laboratory validation of the clinical diagnosis is essential for establishing a medical prognosis and providing genetic counseling to the family. Since many 1p36 deletions are not able to be visualized by light microscopy, the molecular confirmation nowadays is most often achieved by microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). However, the high cost of this test limits its broad adoption, especially in developing countries [13].

Since a characteristic phenotype has been defined, monosomy 1p36 is amenable to targeted molecular diagnosis. For that, we felt that real-time quantitative PCR (qPCR) met the requirements of cost-effectiveness and easy execution [13–18]. Thus, we report the development of a sensitive, rapid, and affordable qPCR diagnostic method for monosomy 1p36, using two target genes which are deleted in the majority of patients with monosomy 1p36: *PRKCZ* and *SKI*. Using such double-pronged methodology we have been able to detect, with 100% sensitivity and 100% specificity, the 1p36 deletion in 39 patients who had been previously diagnosed by aCGH, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), and/or multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).

## 2. Material and Methods

**2.1. Subjects.** We studied 39 patients previously diagnosed with monosomy 1p36 (“Positive Group”; 11 males and 28 females). Twenty-eight patients (7 males and 21 females) had the diagnosis confirmed by aCGH at Signature Genomic Laboratories (Spokane, WA, USA). Some samples were tested by whole-genome, bacterial artificial chromosome-based microarray (SignatureChipWG, Signature Genomic Laboratories, Spokane, WA, USA) according to previously described methods [19], while others were analyzed by whole-genome, oligonucleotide-based microarrays custom-designed by Signature Genomics (SignatureChipOS, either version 1, a 105K-feature array manufactured by Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, or version 2, a 135K-feature array manufactured by Roche NimbleGen, Madison, WI, USA) according to previously described methods [20, 21]. Ten patients (4 males and 6 females) were diagnosed using the techniques of FISH and/or MLPA, according to previously described methods [8], with addition of SALSA MLPA kit P070 Human Telomere-5 probemix (MRC-Holland, <http://www.mlpa.com/>). This step was carried out at Unidade de Aconselhamento Genético of the Centro de Estudos do Genoma Humano

of Universidade de São Paulo (Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, USP). One patient (male) was commercially diagnosed by aCGH at the Cytogenetics and Molecular Diagnostics Laboratory (University of Miami, Miami, FL, USA). As controls, we ran DNA from 50 normal patients (“Normal Controls”; 25 males and 25 females) from GENE-Núcleo de Genética Médica.

**2.2. Ethics Statement.** A written consent, approved by the Ethics Committee on Research on Humans of the Instituto de Biociências of Universidade de São Paulo (CEP-IB-USP), was obtained from the guardians of ten patients with monosomy 1p36 for using their genetic material. Two patients with monosomy 1p36 were enrolled in a research study on chromosome abnormalities approved by the Institutional Review Board Spokane. DNA samples from other participants with monosomy 1p36 were obtained from diagnostic procedures prior and anonymized prior to research use, without requiring specific ethics committee approval. This study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

**2.3. Real-Time Quantitative PCR (qPCR).** The qPCR assays for monosomy 1p36 were performed with two target genes: *PRKCZ* (protein kinase C, zeta) and *SKI* (v-ski avian sarcoma viral oncogene homolog). The primers used for amplification of both markers were designed using the Primer3 program, version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). The primer sequences were aligned against the entire human genome using the UCSC program (<http://www.genome.ucsc.edu/>). This step was performed to ensure that the primers amplified only the genomic region of interest and also to guarantee that the forward and reverse primers were free of single nucleotide polymorphisms (SNPs). The *HMBS* marker (hydroxymethylbilane synthase) was chosen as reference gene, and the primer sequences used for its amplification were derived from Saugier-Weber et al. [22], without the addition of the universal extension cited by the authors. The primer sequences and the sizes of the amplicons are shown in Table 1.

Each qPCR reaction contained 5  $\mu$ L of SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); 10 ng of genomic DNA; forward and reverse primers at optimized concentrations; and sterile water up to a final volume of 10  $\mu$ L. The reaction profile was an initial step of 50°C for 2 min and a step of denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and combined annealing and extension at 60°C for 60 sec. All the samples were subjected to gradual denaturation to determine the melting curve after 50 amplification cycles. A “no template control” (NTC) was made in all the qPCR reactions for each pair of primers containing all the reagents except DNA. The qPCR reactions were performed using Rotor-Gene Q (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) equipment, and the data were processed by the associated Rotor-Gene Q Series Software, version 1.7 (build 94) (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA).

The optimum concentration of each primer was determined by an initial test called concentration test of primers. The concentrations tested were 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.6  $\mu$ M.



TABLE 1: qPCR primer sequences, genomic location, and size of each amplicon.

Marker	Chr	Primer name	Sequence (5' → 3')	Amplicon size	Genomic location of amplicon (hg19)
<i>PRKCZ</i> <sup>a</sup>	1	PRKCZ-F	ACGGTGTGAGCATGAGGATAC <sup>c</sup>	125	2,020,732-2,020,856
		PRKCZ-R	CAGAGGCTGAAGCAAATGAAC <sup>c</sup>		
<i>SKI</i> <sup>a</sup>	1	SKI-F	AGCTGATTGGGGGTAGGC <sup>c</sup>	85	2,221,777-2,221,861
		SKI-R	TCAGGCTGAGCAGTGCAG <sup>c</sup>		
<i>HMBS</i> <sup>b</sup>	11	HMBS-F	ACGGCTCAGATAGCATAACAAG <sup>d</sup>	185	118,963,676-118,963,860
		HMBS-R	ATGCCTACCAACTGTGGGTCA <sup>d</sup>		

Chr: chromosome; <sup>a</sup>target gene; <sup>b</sup>reference gene; <sup>c</sup>primer sequences designed using Primer3 software, version 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>); <sup>d</sup>primer sequences derived from Saugier-Veber et al. [22].

From this test, the concentrations of each forward (F) and reverse (R) primer to be used in qPCR reactions were standardized in 0.1  $\mu$ M (F)/0.1  $\mu$ M (R) for *HMBS* and *SKI* and 0.2  $\mu$ M (F)/0.2  $\mu$ M (R) for *PRKCZ*.

Standard curves for all the primer sets were generated with series of log dilution of genomic DNA: 20, 10, 5, and 2.5 nM for *HMBS* and 10<sup>1</sup>, 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, and 10<sup>-2</sup> nM for *PRKCZ* and *SKI*. Each dilution was tested in triplicate. Slopes derived from standard curves were used to calculate the efficiency of the qPCR reaction for each marker and also to normalize qPCR data. Reaction specificity was confirmed with melting curves analysis and polyacrylamide gel electrophoresis experiments.

A negative control sample was used in all the qPCR runs. This negative control corresponds to the DNA of an individual who is not affected by monosomy 1p36. The presence of the negative control in each qPCR run is fundamental for the final calculation of copy number change of each marker.

**2.4. Analysis of the qPCR Data.** The equations used for normalization of the qPCR data and for the calculation of the allelic copy number of each marker were derived from studies of Weksberg et al. [13] and Hughes et al. [17]. The D'Agostino-Pearson test for normal distribution of the values of fold copy number change ( $\Delta KC_t$ ) and ROC curve (receiver operating characteristic curve) analyzes were made using MedCalc software, version 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). The measures used to assess the accuracy of qPCR in discriminating between the group of normal controls and the positive group were sensitivity, specificity, and area under the ROC curve (AUC). For each marker a dot plot was also obtained using MedCalc software.

### 3. Results

Polyacrylamide gel electrophoresis experiments (data not shown) and melting curve analyzes confirmed the specificity of the qPCR assays for amplification of the reference gene (*HMBS*) and of the two target genes (*PRKCZ* and *SKI*) (see Figures 1(a), 1(b), and 1(c) for melting curve of, resp., *HMBS*, *PRKCZ*, and *SKI*).

The qPCR reactions occurred with high efficiency (greater than 94%), with  $R^2$  values of the standard curve greater than 0.99 (Table 2).

TABLE 2: Slope, amplification efficiency, and  $R^2$  values for all the markers.

Marker	Slope	Amplification efficiency	$R^2$
<i>PRKCZ</i> <sup>a</sup>	-3.1950	94.42%	0.9981
<i>SKI</i> <sup>a</sup>	-3.1910	94.23%	0.9975
<i>HMBS</i> <sup>b</sup>	-3.4350	95.49%	0.9964

$R^2$ : determination coefficient; <sup>a</sup>target gene; <sup>b</sup>reference gene.

The calculation of  $\Delta KC_t$  for *PRKCZ* and *SKI* was performed considering the groups "Normal Controls" (Supplementary Table 1, available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/836082>) and "Positive Group" (Supplementary Table 2). Table 3 shows an overview of the  $\Delta KC_t$  results for the two above groups. The value of the mean  $\Delta KC_t \pm SD$  for the normal controls was near zero for both markers: *PRKCZ* ( $-0.0612 \pm 0.1554$ ) and *SKI* ( $-0.1264 \pm 0.1401$ ), indicating the presence of two allelic copies of each marker (Table 3).

The value of the mean  $\Delta KC_t \pm SD$  for the positive group was near -1.000 for the two markers: *PRKCZ* ( $-0.9696 \pm 0.1649$ ) and *SKI* ( $-1.0287 \pm 0.2880$ ) (Table 3). The maximum value of  $\Delta KC_t$  for *PRKCZ* in the positive group ( $-0.6676$ ) was lower than the minimum value of  $\Delta KC_t$  obtained in the group of normal controls ( $-0.3661$ ), showing a complete separation of *PRKCZ* results between the two groups (Table 3). These results show that the 39 patients have hemizygous microdeletion of *PRKCZ*, which in turn is sufficient to identify them as having monosomy 1p36.

In the analysis of the *SKI* marker, one of the patients (subject 11 of Supplementary Table 2) showed a  $\Delta KC_t$  value near zero ( $-0.2876$ ), corresponding to the maximum value of  $\Delta KC_t$  obtained for this marker in the positive group (Table 3). This result of  $\Delta KC_t$  was located in the normal range for the *SKI* marker (Table 3). However, this patient presented clear hemizyosity of *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1.2278$ ), confirming the presence of monosomy 1p36 (Supplementary Table 2). Equal results had been previously obtained by MLPA (data not shown).  $\Delta KC_t$  results of the *SKI* marker for the remaining 38 patients ( $-0.5479$  to  $-1.5803$ ) were lower than the minimum value of  $\Delta KC_t$  obtained in the group of normal controls ( $-0.3794$ ), showing a complete separation of *SKI* results between the 38 patients and the 50 normal controls (Table 3).

TABLE 3: Overview of the qPCR markers results.

Sample types	Marker	<i>n</i>	$\Delta KC_t$				
			Mean	SD	Median	Maximum	Minimum
Normal controls	<i>PRKCZ</i>	50	-0.0612	0.1554	-0.0533	0.3551	-0.3661
	<i>SKI</i>	50	-0.1264	0.1401	-0.1514	0.1956	-0.3794
Positive group	<i>PRKCZ</i>	39	<b>-0.9696</b>	<b>0.1649</b>	-0.9634	-0.6676	-1.2644
	<i>SKI</i>	39	<b>-1.0287</b>	<b>0.2880</b>	-1.0710	-0.2876 <sup>a</sup>	-1.5803

$\Delta KC_t$ : fold copy number change; *n*: sample size; SD: standard deviation.

$\Delta KC_t$  results (expressed as mean  $\Delta KC_t \pm SD$ ) consistent with the loss of one allelic copy are indicated in bold.

<sup>a</sup> $\Delta KC_t$  result obtained for patient 11 (subject 11 of Supplementary Table 2), indicative of nondeletion of *SKI* gene. This patient presented hemizyosity of *PRKCZ* ( $\Delta KC_t = -1.2278$ ), confirming that he has monosomy 1p36. Equal results were obtained by MLPA (data not shown). The remaining 38 patients had  $\Delta KC_t$  results corresponding to hemizygous microdeletion of *SKI* (-0.5479 to -1.5803) and *PRKCZ* (-0.6676 to -1.2644).

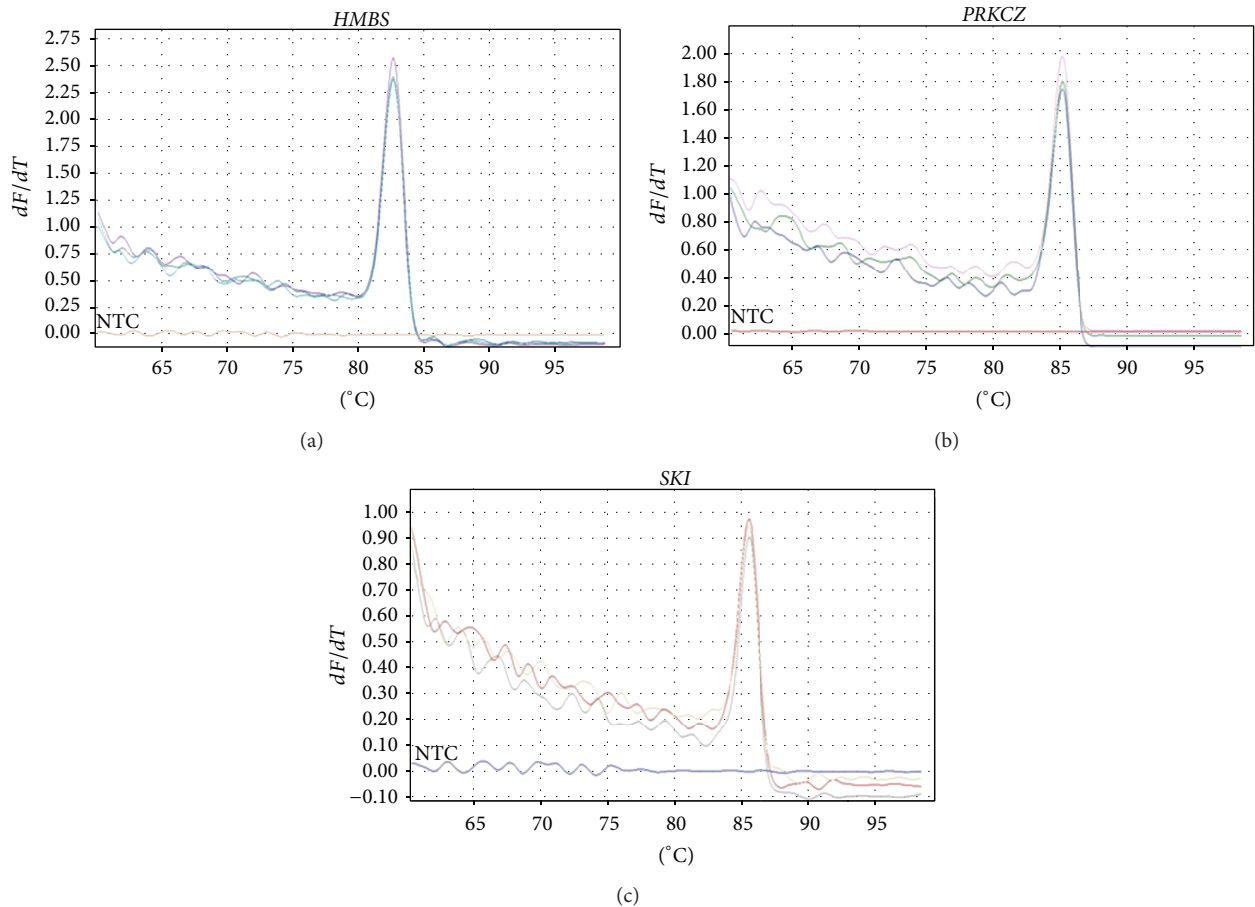


FIGURE 1: Melting curve for the markers: (a) *HMBS*, (b) *PRKCZ*, and (c) *SKI*. All the markers showed the presence of a single dissociation peak and absence of primer dimers. The melting temperature of each amplicon was: *HMBS*:  $T_m = 82.6^\circ\text{C}$ ; *PRKCZ*:  $T_m = 85.2^\circ\text{C}$ ; *SKI*:  $T_m = 85.6^\circ\text{C}$ . NTC: No template control. These results were obtained using the Rotor-Gene Q Series Software, version 1.7 (build 94) (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

The results described above were corroborated by statistical analyzes made using the MedCalc software, version 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). The  $\Delta KC_t$  values for both markers in the group of normal controls presented normal distribution according to D'Agostino-Pearson test (data not shown). The detection performance of the primers was evaluated using ROC curve analyzes.

Using the  $\Delta KC_t$  values of the negative (normal controls) and positive groups (Supplementary Tables 1 and 2) and considering that the qPCR approach of this study is a double-pronged methodology, the simultaneous use of *PRKCZ* and *SKI* markers in qPCR assays produced a ROC curve with AUC equal to 1.000 (95% CI, 0.959–1.000) and corresponding *P* value equal to zero. This confirms that the qPCR technique

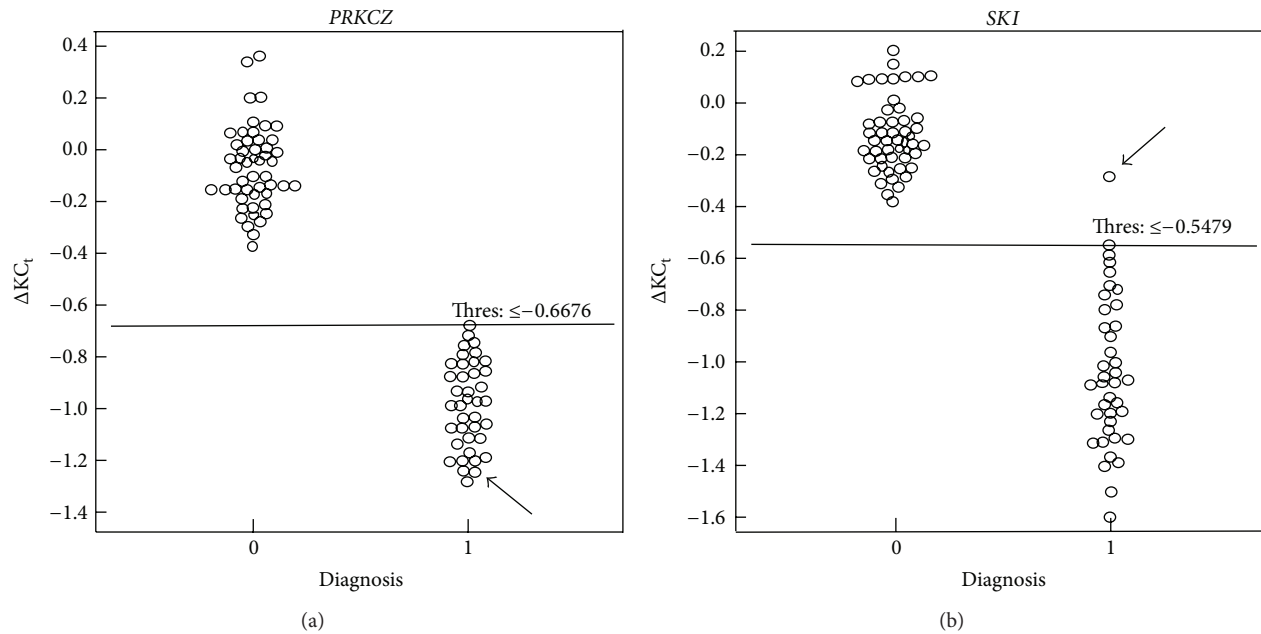


FIGURE 2: Dot plot for the markers which were analyzed in the study of monosomy 1p36: (a) *PRKCZ* and (b) *SKI*.  $\Delta K C_i$  (fold copy number change) values of the 50 normal controls and of the 39 patients with monosomy 1p36 were considered for construction of the dot plot. The threshold value (Thres) is shown inside of each graph. On the horizontal axis (Diagnosis), the number 0 represents the negative group (normal controls) and the number 1 represents the positive group. Each individual is represented by a circle within the graph. The horizontal line within the graph indicates the threshold value, which corresponds to the  $\Delta K C_i$  value chosen as limit of separation between the two groups.  $\Delta K C_i$  result obtained for patient 11 is indicated by a black arrow in both graphs. This patient does not have deletion of *SKI* ( $\Delta K C_i = -0.2876$ ), but he presents hemizygous deletion of *PRKCZ* ( $\Delta K C_i = -1.2278$ ), confirming that he has monosomy 1p36. Equal results were previously obtained by MLPA. The simultaneous use of these two genes in the qPCR assays resulted in a test with 100% sensitivity and 100% specificity. The graphs were obtained using MedCalc software, version 12.2.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

was capable to differentiate between an individual who has a hemizygous microdeletion in 1p36 region and a normal individual. And by using these two genes we achieved a test with 100% sensitivity (95% CI, 91.0–100.0) and 100% specificity (95% CI, 92.9–100.0) (Figure 2). The threshold value for each marker, which was chosen as the limit of separation between the positive and negative groups, is shown in Figure 2.

All results obtained for monosomy 1p36 using the qPCR technique were also previously observed using other methods of analyzes (aCGH, FISH, and MLPA). For the majority of the patients it was possible to determine that both *PRKCZ* and *SKI* genes were deleted using the techniques described above. In the specific case of patient 10 there was a difference in the results obtained for the *SKI* gene specifically. According to previous MLPA data, patient 10 had an unbalanced translocation between subtelomeric regions of 1p and 7q, presenting a 1p36 deletion of ~1.9–2.2 Mb and a 7q duplication, the size of which has not been determined (data not shown). Moreover, the MLPA analysis showed that the deletion breakpoint in this patient occurred somewhere within the 281 kb interval, between the genomic coordinates chr1:1,956,418–2,237,544, according to UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly (GRCh37/hg19; <http://www.genome.ucsc.edu/>). Of note, the MLPA probe specific for the *SKI* gene remained intact in this patient, while the qPCR results showed deletion of both *PRKCZ*

( $\Delta K C_i = -1.1885$ ) and *SKI* ( $\Delta K C_i = -1.0710$ ) genes (Supplementary Table 2). The probable explanation for this divergence is that the MLPA probe and the qPCR primers map to different regions within the *SKI* gene. The *SKI* gene is mapped between genomic coordinates chr1:2,160,134–2,241,652 (UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly); the MLPA probe is mapped between coordinates chr1:2,237,544–2,237,607 (UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly) and the qPCR primers are mapped between coordinates chr1:2,221,777–2,221,861 (UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly). Thus, knowing that this patient presented deletion of ten 1p36 probes distal to the *SKI* probe (data not shown) and that the qPCR primers are also located distal to this probe, it is likely that patient 10 has part of the *SKI* gene deleted (region of location of the qPCR primers) and another part intact (region of location of the MLPA probe).

From our data it is clear that the qPCR technique using the two genes, *PRKCZ* and *SKI*, was efficient and accurate for detection of microdeletions associated with monosomy 1p36.

#### 4. Discussion

About 3% of the world population has intellectual disability, 20% to 50% of which is caused by chromosome abnormalities [23]. One of the most common chromosome abnormalities in humans is monosomy 1p36 (OMIM #607872), and it accounts

for 0.5–0.7% of all cases of idiopathic intellectual disability [24]. The confirmation of clinical suspicion is essential for clinical monitoring of the patient and genetic counseling of the family.

Medical genetics laboratories generally use aCGH for the diagnosis of monosomy 1p36. However, the high cost of this test limits its broad adoption, especially in developing countries [13]. In face of this reality, we found in qPCR technique the requirements of cost-effectiveness and easy execution for targeted diagnosis of monosomy 1p36, easily accessible for low-budget laboratories in developing countries [13–18]. Thus, in this study, we report the development of a qPCR assay for the detection of copy number changes in the 1p36 region using two target genes, *PRKCZ* and *SKI*, which are deleted in the majority of patients with monosomy 1p36.

The haploinsufficiency of *PRKCZ* and *SKI* genes has been proposed to be related to the neurologic phenotype seen in patients with monosomy 1p36, thus contributing to the neurodevelopmental delay [3, 8, 25, 26]. As this feature is observed in all the patients with monosomy 1p36 [5, 10, 27, 28], we can suggest that these two genes will very likely be deleted in a majority of patients.

*PRKCZ* and *SKI* are located ~2.0 Mb (chr1:1,981,909-2,116,834) and ~2.2 Mb (chr1:2,160,134-2,241,652), respectively, from the 1p telomere (UCSC Genome Browser, Human February 2009 Assembly), and previous studies have shown that both genes are within the region where the majority of 1p36 deletions occur.

In one of the first large studies related to monosomy 1p36, Heilstedt et al. [5] evaluated the deletion sizes in 61 affected subjects from 60 families and noticed that, although the deletion sizes ranged widely, 12.5% of breakpoints clustered 4.0–4.5 Mb from the telomere, and 40% of all the breakpoints occurred 3.0–5.0 Mb from the telomere. In a study involving subtelomeric abnormalities, Ballif et al. [7] analyzed 32 positive individuals for monosomy 1p36 and found that 54% of the breakpoints were located within the first 5.0 Mb from the 1p telomere and ~90% were located within the first 10 Mb. D'Angelo et al. [8] detected a large variability in the sizes of deletions (~2.0–10 Mb) when they analyzed nine patients; however, all the patients showed deletion of *PRKCZ* and *SKI*.

In other studies, performed with a smaller number of patients, there was also a change in the number of copies of *PRKCZ* and *SKI* in most of affected individuals, which support our results. Gajecka et al. [29] characterized complex rearrangements in four individuals with deletions, duplications, and/or triplications of 1p36 and they compared the regions of imbalance to two cases published. Results of aCGH and FISH revealed an overlapping region of 1.1 Mb containing *PRKCZ* and *SKI*, which were deleted in four individuals and duplicated/triplicated in two individuals. Vieira et al. [30] used aCGH to evaluate one patient that, despite showing a Smith-Magenis-like phenotype, lacked the 17p11.2 deletion or a mutation in *RAI1*. They detected a deletion of approximately 2.15 Mb in 1p36.32-1p36.33 region containing *PRKCZ* and *SKI*, which resulted in the final diagnosis of monosomy 1p36.

Rosenfeld et al. [3] characterized small interstitial deletions, and they reported five patients with 199–823 kb

overlapping deletions of proximal 1p36.33, three of which included *PRKCZ* and *SKI*. A small interstitial deletion (1.52 Mb) including *PRKCZ* and *SKI* was found by Gajecka et al. [31] during evaluation of two siblings with mild phenotypic features of monosomy 1p36. It is important to emphasize that most of the genes which were contained in the smallest region of deletion (174 kb) characterized by Rosenfeld et al. [3] were not deleted in the patients analyzed by Gajecka et al. [31], with only one of a total of five genes showing partial deletion and the others remaining intact. Indeed the specific critical region for monosomy 1p36 has not been determined yet, greatly making its study difficult. Really, there does not seem to be a single critical region for this syndrome.

The qPCR results showed that both markers were efficient in the identification of patients with 1p36 microdeletions, resulting in a test with 100% sensitivity and 100% specificity. With the exception of the result of patient 10 for *SKI* marker (subject 10 of Supplementary Table 2), all the qPCR results were 100% concordant with results previously determined by aCGH, FISH, and/or MLPA. It is important highlight that rare patients, who have mainly small and atypical interstitial microdeletions, might, occasionally, not be identified by this qPCR assay. However, the qPCR assay presented here enables the identification of the majority of patients with 1p36 monosomy.

We have calculated that detecting a patient suspected of having monosomy 1p36 by qPCR would have a final cost of US\$ 8.13. This calculation was done considering only the necessary reagents for the qPCR reaction. The costs involving the reagents of other steps, such as DNA extraction, and the costs of laboratory materials, equipment, and workforce were not included in this calculation. Moreover, the whole screening process from the genomic DNA extraction to the analysis of the qPCR data could be performed in a short time (about 8 hours).

In summary, the results presented here have proven that qPCR of *PRKCZ* and *SKI* can be a fast, accurate, and cost-effective diagnostic test for monosomy 1p36.

## 5. Conclusions

Here we report the development of a simple, rapid, and inexpensive real-time quantitative PCR (qPCR) assay for targeted diagnosis of monosomy 1p36. We showed that qPCR of *PRKCZ* and *SKI* can be considered an accurate diagnostic test for monosomy 1p36, easily accessible for low-budget laboratories in developing countries.

## Disclosure

Professor Dr. Sérgio Danilo Junho Pena is Clinical Director of GENE-Núcleo de Genética Médica, a biotechnology company that provides clinical genetics services and DNA diagnostics, including the diagnosis of microdeletion syndromes, in Brazil. Jill A. Rosenfeld is an employee of Signature Genomic Laboratories, a subsidiary of PerkinElmer, Inc.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

The authors thank all the patients who participated of this study. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## References

- [1] H. A. Heilstedt, B. C. Ballif, L. A. Howard, C. D. Kashork, and L. G. Shaffer, "Population data suggest that deletions of 1p36 are a relatively common chromosome abnormality," *Clinical Genetics*, vol. 64, no. 4, pp. 310–316, 2003.
- [2] M. Gajecka, K. L. Mackay, and L. G. Shaffer, "Monosomy 1p36 deletion syndrome," *American Journal of Medical Genetics C: Seminars in Medical Genetics*, vol. 145, no. 4, pp. 346–356, 2007.
- [3] J. A. Rosenfeld, J. A. Crolla, S. Tomkins et al., "Refinement of causative genes in monosomy 1p36 through clinical and molecular cytogenetic characterization of small interstitial deletions," *American Journal of Medical Genetics A*, vol. 152, no. 8, pp. 1951–1959, 2010.
- [4] B. C. Ballif, W. Yu, C. A. Shaw, C. D. Kashork, and L. G. Shaffer, "Monosomy 1p36 breakpoint junctions suggest premeiotic breakage-fusion-bridge cycles are involved in generating terminal deletions," *Human Molecular Genetics*, vol. 12, no. 17, pp. 2153–2165, 2003.
- [5] H. A. Heilstedt, B. C. Ballif, L. A. Howard et al., "Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 72, no. 5, pp. 1200–1212, 2003.
- [6] W. Yu, B. C. Ballif, C. D. Kashork et al., "Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions," *Human Molecular Genetics*, vol. 12, no. 17, pp. 2145–2152, 2003.
- [7] B. C. Ballif, S. G. Sulpizio, R. M. Lloyd et al., "The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH," *American Journal of Medical Genetics A*, vol. 143, no. 16, pp. 1850–1857, 2007.
- [8] C. S. D'Angelo, I. Kohl, M. C. Varela et al., "Extending the phenotype of monosomy 1p36 syndrome and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia," *American Journal of Medical Genetics A*, vol. 152, no. 1, pp. 102–110, 2010.
- [9] K. L. Jones, *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation*, WB Saunders, Philadelphia, Pa, USA, 6th edition, 2006.
- [10] A. Battaglia, "Del 1p36 syndrome: a newly emerging clinical entity," *Brain & Development*, vol. 27, no. 5, pp. 358–361, 2005.
- [11] M. Descartes, F. M. Mikhail, J. C. Franklin, T. M. McGrath, and M. Bebin, "Monosomy 1p36.3 and trisomy 19p13.3 in a child with periventricular nodular heterotopia," *Pediatric Neurology*, vol. 45, no. 4, pp. 274–278, 2011.
- [12] K. Giannikou, H. Fryssira, V. Oikonomakis et al., "Further delineation of novel 1p36 rearrangements by array-CGH analysis: narrowing the breakpoints and clarifying the "extended" phenotype," *Gene*, vol. 506, no. 2, pp. 360–368, 2012.
- [13] R. Weksberg, S. Hughes, L. Moldovan, A. S. Bassett, E. W. Chow, and J. A. Squire, "A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR," *BMC Genomics*, vol. 6, article 180, 2005.
- [14] Y.-F. Chen, P.-L. Kou, S.-J. Tsai et al., "Computational analysis and refinement of sequence structure on chromosome 22q11.2 region: application to the development of quantitative real-time PCR assay for clinical diagnosis," *Genomics*, vol. 87, no. 2, pp. 290–297, 2006.
- [15] C. Howald, G. Merla, M. C. Digilio et al., "Two high throughput technologies to detect segmental aneuploidies identify new Williams-Beuren syndrome patients with atypical deletions," *Journal of Medical Genetics*, vol. 43, no. 3, pp. 266–273, 2006.
- [16] C. Schubert and F. Laccone, "Williams-Beuren syndrome: determination of deletion size using quantitative real-time PCR," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 18, no. 5, pp. 799–806, 2006.
- [17] S. Hughes, R. Weksberg, L. Moldovan, and J. A. Squire, "Use of quantitative PCR for the detection of genomic microdeletions or microduplications," in *PCR: Methods Express*, pp. 49–62, Scion Publishing, Bloxham, UK, 1st edition, 2007.
- [18] M. Frigerio, E. Passeri, T. de Filippis et al., "SNPs and real-time quantitative PCR method for constitutional allelic copy number determination, the *VPREB1* marker case," *BMC Medical Genetics*, vol. 12, article 61, 2011.
- [19] B. C. Ballif, A. Theisen, J. Coppinger et al., "Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication," *Molecular Cytogenetics*, vol. 1, article 8, 2008.
- [20] B. C. Ballif, A. Theisen, D. M. McDonald-McGinn et al., "Identification of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16q11.2q12.2," *Clinical Genetics*, vol. 74, no. 5, pp. 469–475, 2008.
- [21] A. L. Duker, B. C. Ballif, E. V. Bawle et al., "Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome," *European Journal of Human Genetics*, vol. 18, no. 11, pp. 1196–1201, 2010.
- [22] P. Saugier-Verber, A. Goldenberg, V. Drouin-Garraud et al., "Simple detection of genomic microdeletions and microduplications using QMPSF in patients with idiopathic mental retardation," *European Journal of Human Genetics*, vol. 14, no. 9, pp. 1009–1017, 2006.
- [23] L. G. Shaffer and B. A. Bejjani, "Using microarray-based molecular cytogenetic methods to identify chromosome abnormalities," *Pediatric Annals*, vol. 38, no. 8, pp. 440–447, 2009.
- [24] F. Giraudeau, L. Taine, V. Biancalana et al., "Use of a set of highly polymorphic minisatellite probes for the identification of cryptic 1p36.3 deletions in a large collection of patients with idiopathic mental retardation," *Journal of Medical Genetics*, vol. 38, no. 2, pp. 121–125, 2001.
- [25] C. Colmenares, H. A. Heilstedt, L. G. Shaffer et al., "Loss of the *SKI* proto-oncogene in individuals affected with 1p36 deletion syndrome is predicted by strain-dependent defects in *Ski*<sup>-/-</sup> mice," *Nature Genetics*, vol. 30, no. 1, pp. 106–109, 2002.
- [26] A. I. Hernandez, N. Blace, J. F. Crary et al., "Protein kinase Mζ synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase Cζ catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 41, pp. 40305–40316, 2003.

- [27] S. K. Shapira, C. McCaskill, H. Northrup et al., "Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 61, no. 3, pp. 642–650, 1997.
- [28] L. G. Shaffer and H. A. Heilstedt, "Terminal deletion of 1p36," *The Lancet*, vol. 358, article S9, 2001.
- [29] M. Gajecka, W. Yu, B. C. Ballif et al., "Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure," *European Journal of Human Genetics*, vol. 13, no. 2, pp. 139–149, 2005.
- [30] G. H. Vieira, J. D. Rodriguez, R. Boy et al., "Differential diagnosis of Smith-Magenis syndrome: 1p36 deletion syndrome," *American Journal of Medical Genetics A*, vol. 155, no. 5, pp. 988–992, 2011.
- [31] M. Gajecka, S. C. Saitta, A. J. Gentles et al., "Recurrent interstitial 1p36 deletions: evidence for germline mosaicism and complex rearrangement breakpoints," *American Journal of Medical Genetics A*, vol. 152, no. 12, pp. 3074–3083, 2010.

CASE REPORT

## A New Case of Keratoconus Associated with Williams-Beuren Syndrome

Melissa Machado Viana<sup>1</sup>, Maria Frasson<sup>2</sup>, Letícia Lima Leão<sup>1</sup>, Martin Stofanko<sup>3</sup>, Higgor Gonçalves-Dornelas<sup>3</sup>, Pricila da Silva Cunha<sup>4</sup>, Marcos José Burle de Aguiar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil,*  
<sup>2</sup>*Serviço de Retina, Hospital São Geraldo, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil,* <sup>3</sup>*Núcleo de Genética Médica (GENE), Minas Gerais, Brazil,* <sup>4</sup>*Departamento 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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup> 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 ( $\Delta\text{KCt}$ ):  $-0.9114$  (*ELN*) and  $-0.7306$  (*LIMK1*). An individual is diagnosed with WBS with 100% diagnostic sensitivity and 100% diagnostic specificity when values of  $\Delta\text{KCt} \leq -0.5943$  (*ELN*) and  $\leq -0.7262$  (*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.

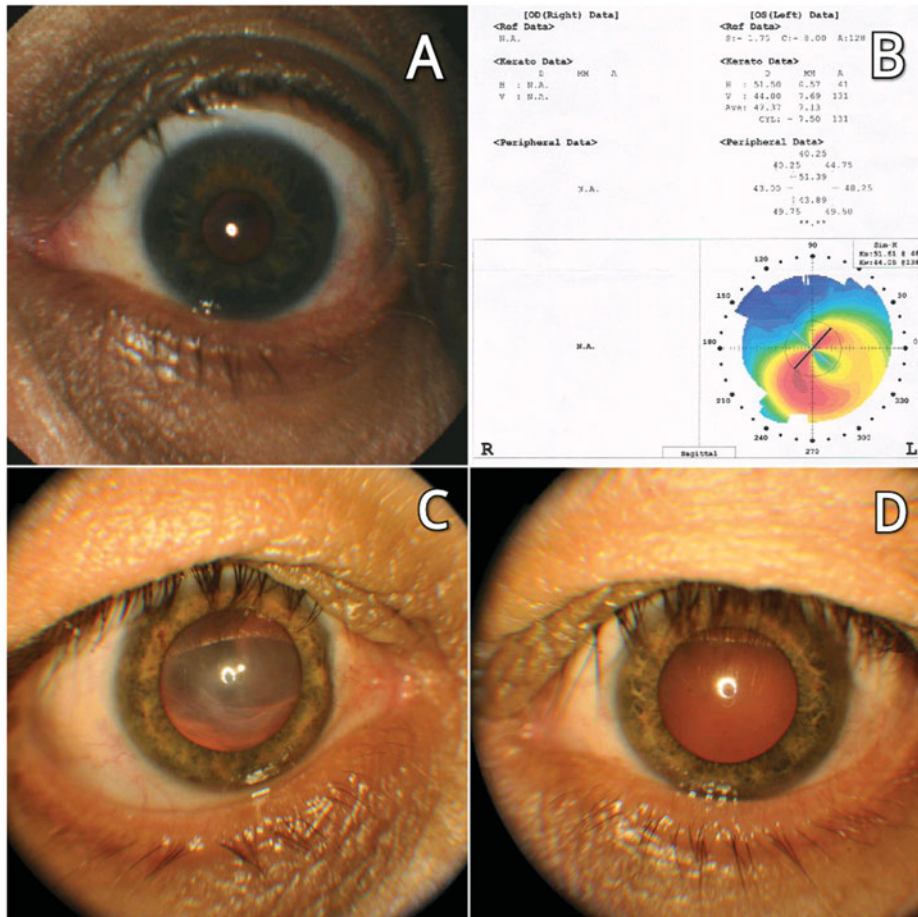


FIGURE 2. (A) Stellate iris pattern of the left eye. (B) Topography of the left eye showing irregular astigmatism and abnormal values of keratometry. (C and D) Anterior segment of both eyes.



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.<sup>4</sup> Environmental factors include contact lens wear, chronic eye rubbing and atopy of the eye.<sup>3</sup>

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.<sup>5,6</sup> 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.<sup>1</sup> 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.<sup>1</sup> 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.<sup>7</sup> Cross-talk between LIMK1 and the Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) receptor superfamily has been demonstrated.<sup>8</sup> TGF $\beta$  is a family of cytokines known to be a key mediator of fibrotic responses<sup>9</sup> and Engler (2011) demonstrated increased TGF $\beta$  pathway markers in severe KTCN cases.<sup>10</sup> Therefore we speculate that the LIMK1 and TGF $\beta$  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.<sup>11</sup> LIMK1 regulates CFL1 and actin cytoskeletal homeostasis.<sup>11</sup> Lee (2009) found that *CFL1*, the gene that encodes CFL1, was differentially expressed in human keratocytes in KTCN.<sup>12</sup> 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, Podkova 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- $\beta$  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- $\beta$  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.

# 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,<sup>1\*</sup> Martin Stofanko,<sup>2</sup> Higor Gonçalves-Dornelas,<sup>2</sup> Pricila da Silva Cunha,<sup>3</sup> and Marcos José Burle de Aguiar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Serviço Especial de Genética Médica, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Núcleo de Genética Médica (GENE), Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Departamento 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* 9999:1–2.

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): 00 Month 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.

# Simple, Rapid and Inexpensive Quantitative Fluorescent PCR Method for Detection of Microdeletion and Microduplication Syndromes

Martin Stofanko<sup>1</sup>, Higgor Gonçalves-Dornelas<sup>1</sup>, Pricila Silva Cunha<sup>2</sup>, Heloísa B. Pena<sup>1</sup>, Angela M. Vianna-Morgante<sup>3</sup>, Sérgio Danilo Junho Pena<sup>1,2\*</sup>

**1** GENE - Núcleo de Genética Médica, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

## Abstract

Because of economic limitations, the cost-effective diagnosis of patients affected with rare microdeletion or microduplication syndromes is a challenge in developing countries. Here we report a sensitive, rapid, and affordable detection method that we have called Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR (MQF-PCR). Our procedure is based on the finding of genomic regions with high homology to segments of the critical microdeletion/microduplication region. PCR amplification of both using the same primer pair, establishes competitive kinetics and relative quantification of amplicons, as happens in microsatellite-based Quantitative Fluorescence PCR. We used patients with two common microdeletion syndromes, the Williams-Beuren syndrome (7q11.23 microdeletion) and the 22q11.2 microdeletion syndromes and discovered that MQF-PCR could detect both with 100% sensitivity and 100% specificity. Additionally, we demonstrated that the same principle could be reliably used for detection of microduplication syndromes, by using patients with the Lubs (*MECP2* duplication) syndrome and the 17q11.2 microduplication involving the *NF1* gene. We propose that MQF-PCR is a useful procedure for laboratory confirmation of the clinical diagnosis of microdeletion/microduplication syndromes, ideally suited for use in developing countries, but having general applicability as well.

**Citation:** Stofanko M, Gonçalves-Dornelas H, Cunha PS, Pena HB, Vianna-Morgante AM, et al. (2013) Simple, Rapid and Inexpensive Quantitative Fluorescent PCR Method for Detection of Microdeletion and Microduplication Syndromes. PLoS ONE 8(4): e61328. doi:10.1371/journal.pone.0061328

**Editor:** Osman El-Maarri, University of Bonn, Institut of Experimental Hematology and Transfusion Medicine, Germany

**Received:** November 9, 2012; **Accepted:** March 8, 2013; **Published:** April 19, 2013

**Copyright:** © 2013 Stofanko et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico of Brazil (CNPq) for its support of this Project 401983/2010-2. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors hereby declare that they have submitted to the Brazilian Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) the patent application no. BR102012021281-1 entitled "Método e kit para identificação de microdeleções cromossômicas humanas pela quantificação fluorescente de PCR (MQF-PCR)" [Method and kit for the identification of human chromosomal microdeletions using fluorescent quantification by PCR (MQF-PCR)]. Dr. Lisa G. Shaffer and Dr. Jill Mokry from Signature Genomics Laboratories, Spokane, WA, USA provided samples of DNA. The authors also declare that this application does not alter their adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors (<http://www.PLOSone.org/static/editorial.action#competing>.) On the contrary, the authors are quite willing to share information.

\* E-mail: [spena@gene.com.br](mailto:spena@gene.com.br)

## Introduction

Microdeletion and microduplication syndromes comprise a large group of human diseases that arise from imbalance in the transcription of genes due to partial loss or gain of genetic material of, typically, less than 5 Mb [1]. Symptoms range widely, but frequently encompass mental retardation, autism, physical dysmorphism and/or organ malformations.

Many microdeletion or microduplication syndromes can be diagnosed on the basis of phenotype alone, but molecular confirmation is essential for correct and reliable clinical and genetic prognoses. For that, a variety of techniques can be used, ranging from microscopic methods, such as Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH), to molecular methods involving PCR and genome-wide microarrays [2,3].

In a broad sense, laboratory diagnostic strategies can be classified as non-targeted or targeted. The most important non-targeted approaches are Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) arrays.

The former has become the method of choice for diagnosis of microdeletions and microduplications in the US and Europe, while the latter provide a higher sensitivity to detect mosaic aneuploidies and is also capable of simultaneously diagnosing uniparental disomies and consanguinity [4–6]. Unfortunately, the very high cost of these analyses makes these methods inappropriate for the public healthcare system in developing countries.

Well-known targeted diagnostic approaches include FISH, Real-Time PCR and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) [2,3,7]. FISH is a complex and time-consuming method that needs special equipment, has limited resolution and is not appropriate for diagnosis of some microduplications [8,9]. Quantitative Real-Time PCR discriminates between normal and affected individuals by differential amplification of target sequence due to different amounts of starting template DNA between control and deleted region. It offers fast turnaround time and technical feasibility, but it has limited multiplexing capabilities and suffers from reproducibility issues [10,11]. In MLPA, a combination of probe hybridization and

PCR followed by capillary electrophoresis and fluorescence quantification is used [12]. Its main drawback is dependence on sample DNA of high quality and lengthy and labor-intensive protocols [12,13]. We here describe a simple, rapid and inexpensive quantitative fluorescent PCR method for targeted diagnosis of microdeletion/microduplication syndromes easily accessible for low-budget laboratories in developing countries.

All diagnostic methods based on quantitative comparison between amplification of target and control fragments using two different primer sets share a common constraint, the inherently unreliable amplification of distinct PCR fragments. This happens because PCR amplification is a complex exponential phenomenon and small differences in initial conditions may have a profound impact on the amounts of product obtained. To overcome this limitation, in 1991, Mutter and Pomponio reported on a simple PCR-based molecular technique that reliably permitted the diagnosis of dosage alterations of the human X and Y chromosomes [14]. They made use of differences in the sequences of the *ZFY* gene on the Y chromosome and its homolog *ZFX* on the X chromosome to design a single primer pair that led to the amplification of both genes. They showed that under these internal genomic competitive conditions it was possible to diagnose reliably individuals with 47,XXY or 47,XYY since the relative amounts of *ZFX* and *ZFY* products (differentiated by restriction analysis) were in 2:1 and 1:2 ratios, respectively, in contrast with a 1:1 ratio for normal controls. This internally controlled means of establishing gene dosage in diagnosing human trisomy was further explored by Mansfield [15] who first utilized human polymorphic microsatellites in quantitative fluorescent PCR (QF-PCR), a method that has become widely used for the prenatal diagnosis of several human aneuploidies [16], and later by Lee et al. [17] who pioneered the use of simultaneous amplification of homologous genes in a method that they called HGQ-PCR. Both methods could reliably quantify amplicons of different sizes and thus determine chromosome dosage. Later, the attractive rationale of the HGQ-PCR method was explored, with technical variations, by Deutsch et al. [18] and Armour et al. [19] in detection of aneuploidy and genes with high copy number variation, respectively.

We show that the principle of the HGQ-PCR method of Lee et al. [17] can be used as a simple, rapid, DNA quality independent and internally controlled PCR-based detection test for sub-microscopic genome rearrangements that we have called Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR (MQF-PCR). We used two very common microdeletion syndromes, the Williams-Beuren syndrome (WBS); (OMIM #194050) and the 22q11.2 microdeletion syndromes [Velocardiofacial syndrome (VCF); (OMIM #192430) and Di George syndrome (OMIM #188400)] to demonstrate the reliability and cost-efficiency of MQF-PCR. Additionally, we demonstrate that the same principle can be reliably used for detection of two microduplication syndromes, by using as examples the Lubs syndrome, involving the *MECP2* gene on Xq28 chromosome (OMIM #300260) and the 17q11.2 microduplication, involving the *NEUROFIBROMIN 1 (NF1)* gene (OMIM #613113). We propose that MQF-PCR is a very useful procedure for laboratory confirmation of the clinical diagnosis of microdeletion/microduplication syndromes.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

For the purpose of the assay development we used human subjects previously diagnosed with known microdeletion syn-

dromes at GENE - Núcleo de Genética Médica, Belo Horizonte, MG, Brazil. The participants did not provide written or verbal consent and no other formal documented measures were taken. Since no new samples were needed, we chose to avoid the need to contact patients by using anonymization. Thus, DNA samples previously used for diagnosis and stored in our clinic were anonymized and used in testing the new diagnostic procedure. Since the new tests uniformly confirmed the previous diagnoses, they had value by adding reliability to them. This study was approved by the Ethics Committee of Santa Casa de Misericórdia in Belo Horizonte.

### Patients

Genomic DNA from normal male and female control individuals, and individuals previously diagnosed with specific microdeletion or microduplication syndromes (Table 1) was isolated from buccal swabs using a salting-out protocol [20].

We studied initially 14 patients with the Williams-Beuren syndrome who had confirmation of their clinical diagnoses by studies of loss of heterozygosity of four microsatellites located in

**Table 1.** MQF-PCR results for patients with microdeletion and microduplication syndromes.

Syndrome	Patient	Z (PZ)-statistics score [34]
Williams-Beuren	194	-4.57
	385	-5.04
	603	-5.33
	604	-5.29
	3105	-5.10
	4183	-4.68
	4282	-5.13
	7350	-3.11
	8184	-5.47
	9234	-5.38
	10498	-4.76
	11275	-4.78
	11469	-5.05
	12681	-5.55
Velocardiofacial	8432	(-2.87)
	8441	(-3.93)
	9146	(-1.37)
	10097	(-2.45)
	10127	(-1.93)
	10332	(-2.17)
Lubs ( <i>MECP2</i> duplication)	10460	(-3.03)
	11153	(-3.03)
	15982A [27,29]	6.56
	15982B [27,29]	4.12
17q11.2 microduplication [30]	17863A [28]	9.40
	17863B [28]	7.65
17q11.2 microduplication [30]	NF1dup1	11.51
	NF1dup2	11.27
	NF1dup3	10.89

doi:10.1371/journal.pone.0061328.t001

the critical region of the 7q11.23 microdeletion syndrome (a CCTT tetranucleotide polymorphism in the *ELN* gene [21] and three CA repeat polymorphisms, in the *ELN* gene [22], in the *LIMK1* gene [23] and in *D7S1870* [24], respectively). The diagnosis of these patients was further confirmed by Real-Time PCR using a 122 bp amplicon for the *ELN* gene chr7:73,474,747–73,474,868 and a 149 bp amplicon in the *LIMK1* gene (chr7:73,530,004–73,530,152). One patient had the diagnosis confirmed by aCGH.

We studied next eight patients clinically diagnosed as having the VCF syndrome. Laboratory confirmation of the clinical diagnoses were obtained by loss of heterozygosity studies of three microsatellites located in the critical region of the 22q11.2 microdeletion syndrome (the three CA repeat polymorphisms *D22S264* [25] and *D22S941* and *D22S944* [26], respectively). Further molecular confirmation was obtained by Real-Time PCR using four different amplicons as described by Weksberg et al. [10]: a 101 bp amplicon for the *CAT4* gene (chr22:21,384,130–21,384,230), 101 bp amplicon in the *PRODH* gene (chr22:18,918,663–18,918,763), a 101 bp amplicon in the *PIK4CA* gene (chr22:21,105,251–21,105,351), and a 100 bp amplicon in the *COMT* gene (chr22:19,956,086–19,956,185).

DNA samples from four patients (two pairs of affected brothers) with Lubs syndrome (microduplication of *MECP2*) were used [27–29]. DNAs from three patients with 17q11.2 microduplication, involving the Neurofibromatosis type 1 deletion syndrome critical region (OMIM #162200) diagnosed by aCGH and FISH, were a kind gift of Dr. Lisa G. Shaffer and Dr. Jill Mokry from the Signature Genomics Laboratories, Spokane, WA, USA [30]. To account for individual copy number variations, a reference DNA sample was created by pooling DNA from 100 male normal Brazilian individuals and used statistically to normalize results.

### MQF-PCR Assay Development

Minimal critical regions of each of the microdeletion syndromes (Table 1, GRCh37 human genome assembly) were used as queries for BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) to identify regions with high sequence similarity that varied by 1–10 bp in length. In order to obtain maximum number of unique homologous regions, query sequences were split into 100–200 kb portions. Candidate pairs of highly homologous sequences were screened for 15–20 bp nucleotide stretches of absolute or highly conserved match representing potential detection primers. These were used as input for UCSC *In-Silico* PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) to confirm amplification of the two potentially diagnostic sequences. Both coding and non-coding sequences were considered. Candidate pairs of gene regions and their corresponding homologous sequences were then screened for presence of known copy number variations in Database of Genomic Variants and SNPdb (<http://projects.tcag.ca/variation>; <http://www.scandb.org>). PCR primers (Table 2) were evaluated in Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) for optimal GC content, annealing temperature, and mispriming. Forward and reverse primers were tailed at the 5' end using the M13-40 sequence to allow fluorescent labeling of amplicons with a NED-labeled M13-40 primer [31]. In order to ensure optimal fragment separation and reliable fluorescence signal detection, reverse primers were extended at 5' end using a PIG-tail [32], which facilitates adenylation of the 3' end of the forward strand. Degenerate primers were designed when necessary. For each syndrome studied a single pair of primers was selected to minimize cost.

### MQF-PCR Assay

PCR amplicons were labeled using a NED-labeled M13-40 universal fluorescent primer in a nested PCR to allow cost-efficient detection by fluorescent capillary electrophoresis [31]. PCR was carried out in total volume of 13  $\mu$ l containing 7.9  $\mu$ l 1x PCR buffer (30 mM TrisHCl pH 8.4, 75 mM KCl 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs), 0.3  $\mu$ l fluorescently labeled M13-40-NED primer, 1  $\mu$ l primer mix (0.1  $\mu$ M forward primer, 1  $\mu$ M reverse primer), 0.15  $\mu$ l (0.75 U) Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen), 3  $\mu$ l water and 0.5  $\mu$ l template DNA (5–300 ng/ $\mu$ l), using a stepdown PCR program: 95°C for 5 min, 95°C for 45 s, 60°C for 45 s, 72°C for 45 s, followed by 1°C stepdown for 9 cycles; then 50°C for 45 s, 72°C for 45 s for a total of 28 cycles and terminated with final 5 min extension at 72°C. Amplicons were separated and fluorescence intensities recorded by electrophoresis on an ABI 3130 Genetic Analyzer in total volume of 10  $\mu$ l (8.8  $\mu$ l highly deionized Hi-Di<sup>TM</sup> formamide with 0.2  $\mu$ l GeneScan 500 LIZ size standard (ABI) and 1  $\mu$ l PCR at 1:10 dilution). Real-Time PCR verification was performed following the methods of Weksberg et al. [10], using the primers shown in Table S1. The *LIMK1* primer, targeting an exon of *LIMK1* was designed using Primer3 and verified for amplification of single fragment by agarose gel electrophoresis. Loss of heterozygosity in WBS and VCF was assessed using polymorphic microsatellites (Table S1) as described in detail elsewhere [21–26].

### Data Analysis

Electrophoretic data were analyzed using GeneMapper 4.0 (ABI) and the test amplicon/control amplicon area ratio was calculated. In the polymerase chain reaction it is common for fragments of different sizes and/or in different genomic environments to present uneven amplification efficiencies. To correct for this, we used a normalization step, by dividing by the ratio of test amplicon/control amplicon area ratio by the analogous ratio of the reference pool of DNA, which was also processed in parallel.

The distribution of the normalized ratios was evaluated and tested for goodness of fit to a Gaussian distribution using the D'Agostino-Pearson test for normal distribution [33] in MedCalc v12 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). If the ratios were symmetrical and conformed to a Gaussian distribution, they were converted to standard deviation Z scores. If the Gaussian distribution was rejected because of asymmetry, pseudo-Z (PZ) scores were calculated as described by Lanzante [34]. The overall performance of the MQF-PCR primer pairs for the detection of the microdeletion or microduplication syndrome was assessed using Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis [35,36] of the Z or PZ score statistics using MedCalc. Box-and-Whisker plot were also constructed [37] using MedCalc. Probability estimates of true positives, false positives, true negatives and false negatives [38,39] were calculated using the Clinical Calculator 1 from the VassarStats website for statistical computation (<http://vassarstats.net/clin1.html>).

## Results

### Studies on the Williams–Beuren Syndrome (OMIM #194050)

To evaluate the facility of design and efficiency of our proposed MQF-PCR procedure, we first studied 14 cases of the Williams–Beuren syndrome, all previously diagnosed clinically in our clinical genetics service. Figure 1 shows an overview of the MQF-PCR strategy used for detection of the Williams–Beuren syndrome microdeletion. The WBS critical region, located at 7q11.23 (Figure 1A) contains several genes which, when in single copy,

**Table 2.** MQF-PCR primers used in detection of microdeletion and microduplication syndromes.

Syndrome	Primer name	Sequences (5'→3')	Fragment sizes	Genomic locations (GRCh37)
Williams-Beuren	WBS-MQF-F	TGGGAGGGCCATTTTGTAC <sup>a</sup>	chr.7: 218 bp	chr7: 73,536,635–73,536,831
	WBS-MQF-R	TTATTGTTCTGCRCTGGG <sup>b</sup>	chr.18: 214 bp	chr18: 675,837–676,031
Velocardiofacial	VCF-MQF-F	GTATTTGGAAGWGTTCGTATAGA <sup>a</sup>	chr.22: 99 bp	chr22: 19,618,131–19,618,209
	VCF-MQF-R	GAGAACTGGGTTTACCTGAC <sup>b</sup>	chr.3: 104 bp	chr3: 88,205,817–88,205,900
Lubs ( <i>MECP2</i> duplication)	LUBS-MQF-F	TGAAACCTGACTTGCTTCT <sup>a</sup>	chr.X: 197 bp	chrX: 153,276,119–153,276,295
	LUBS-MQF-R	GCACTGATTGTGGCAGAG <sup>b</sup>	chr.5: 198 bp	chr5: 32,649,017–32,649,192
17q11.2 microduplication	NF1-MQF-F	TGTACCTGGTGTCTAGAGC <sup>a</sup>	chr.17: 159 bp	chr17: 29,468,898–29,469,033
	NF1-MQF-R	GCCCCTTAGACCATAATG <sup>b</sup>	chr.13: 153 bp	chr13: 19,673,801–19,673,931

<sup>a</sup>Universal M13-40 extension (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') was added to the 5' end of the primer to allow for cost-efficient fluorescent labelling of amplicons [31].

<sup>b</sup>A PIG-tail extension (5'-GTTTCTT-3') was added to the 5' end of the primer to promote full adenylation of the 3' end of the forward strand [32].

doi:10.1371/journal.pone.0061328.t002

contribute to the phenotype of the syndrome [40]. We screened as a candidate the *LMK1* gene, which is deleted in all WBS patients including atypical cases [41]. One segment (chr7:73,536,635–73,536,831) showed homology to a region on chromosome 18p11.32 (chr18:675,837–676,031). Both *LMK1* and its homologous region on chromosome 18 could be amplified using the *LMK1*-MQF primer pair (Table 2). On PCR, two amplicons were observed, one with a size of 214 bp (originating from the chromosome 18 homologue) and another, 4 bp longer, originating from the WBS critical region. Since WBS deletion patients were hemizygous, having only half of the starting amount of template DNA in comparison with the control region in chromosome 18, we expected a corresponding 50% reduction in PCR amplification compared with a normal individual. Figure 2A–B shows an electropherogram depicting change of peak area between a region on chromosome 7q11.23 (shown in black) and its control chromosome (white) in normal (Figure 2A) and the patient 11469 (Figure 2B). Indeed, the peak area ratio between the control and the WBS patient is reduced by about 50%. We then evaluated the detection performance of the MQF primers for the Williams-Beuren microdeletion using ROC curve analysis (Figure 2E). Using the Z-score values [34] the diagnostic primer achieved 100% sensitivity and 100% specificity. The Z-scores for all diagnosed patients are summarized in Table 1. The probabilities of a true positive result (positive predictive value) were estimated at 100% (95% confidence interval = 72–100%), a false positive result at 0% (95% confidence interval = 0–28%), a true negative result (negative predictive value) at 100% (95% confidence interval = 95–100%), and a false negative result at 0% (95% confidence interval = 0–5%).

### Studies on the Velocardiofacial Syndrome (OMIM #192430)

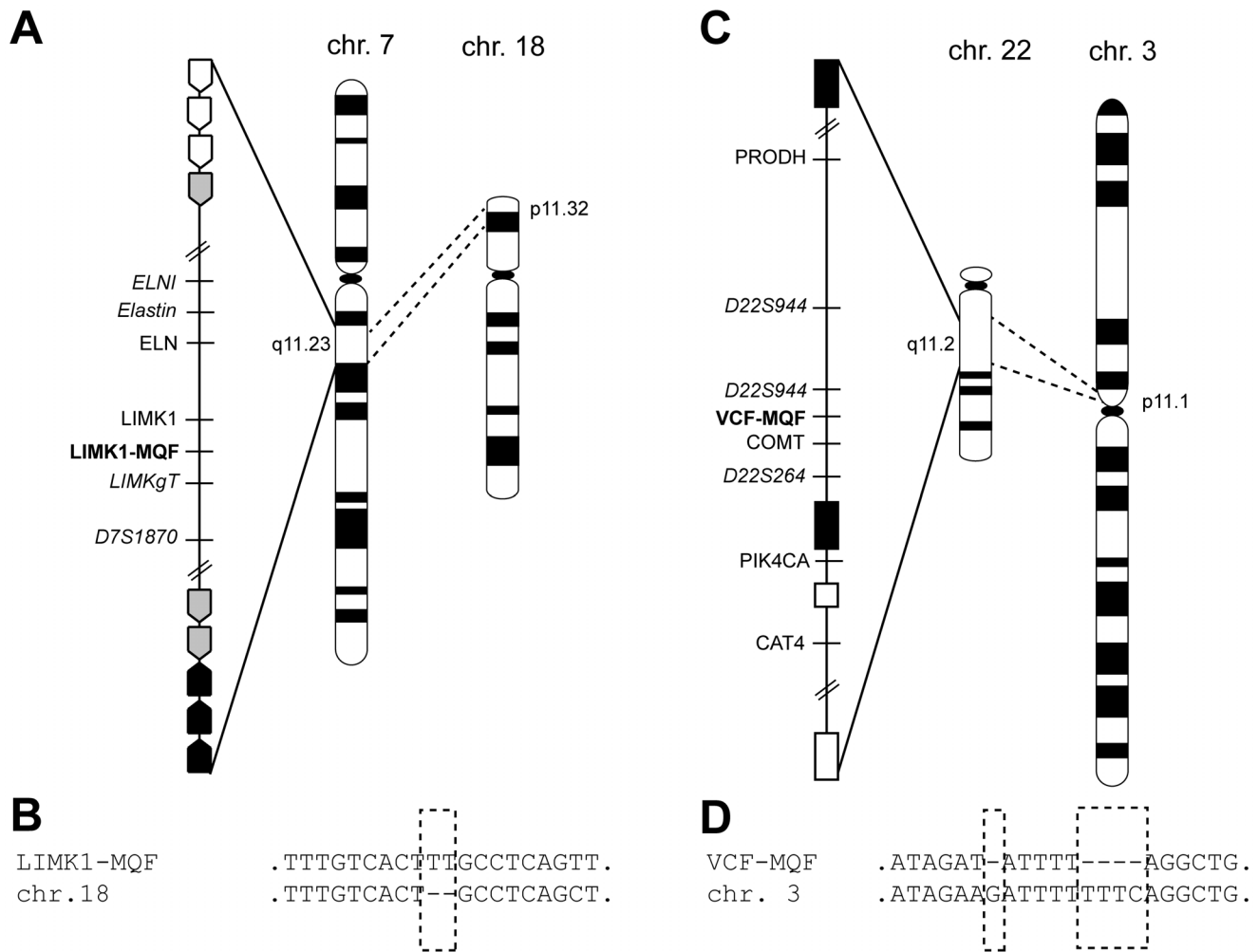
Having had excellent results with the Williams-Beuren syndrome, we then moved on to additionally study the very common microdeletion syndrome, Velocardiofacial syndrome, that results from hemizyosity for 22q11 [42]. We studied eight patients clinically diagnosed as having the VCF syndrome. The VCF critical region (Figure 2B) at position 22q11.2 is delimited by blocks of low copy repeats (LCRs). The vast majority of observed typical deletions share a common deleted region flanked by two LCRs most proximal to centromere (black boxes in Figure 1B), referred to by Shaikh et al. [42] as Block A and Block B. Within this region, a candidate sequence (chr22:19,618,131–19,618,209) about 120 kb upstream of *TBX1* showed significant similarity to a

homologous region at 3p11.1 (chr3:88,205,817–88,205,900). Amplification of these two regions using the VCF-MQF primer that we designed (Table 2) resulted in two amplicons with size 99 bp (originating in chromosome 22) and 104 bp (originating in chromosome 3), differing by 5 bp in size. As an example, the change of peak area ratios between a region on chromosome 22q11.2 (shown in black) and its control chromosome (white) in a VCF patient and a normal individual is shown in Figure 2C–D. Similarly to the case with the Williams-Beuren microdeletion, the peak area ratio between the control (Figure 2C) and the VCF patient (Figure 2D) is reduced by about 50%. The detection performance of the primers for the 22q11.2 microdeletion was evaluated using ROC curve analysis. The normalized ratios in controls did not conform to Gaussian distribution, and thus the pseudo-Z score was calculated [34]. Using the PZ-score values the diagnostic primer achieved 100% sensitivity and 100% specificity (Figure 2F). The PZ-scores for all diagnosed patients are summarized in Table 1. The probabilities of a true positive result (positive predictive value) were estimated at 100% (95% confidence interval = 60–100%), a false positive result at 0% (95% confidence interval = 0–40%), a true negative result (negative predictive value) at 100% (95% confidence interval = 92–100%), and a false negative result at 0% (95% confidence interval = 0–8%). These results further confirm that MQF-PCR presents a reliable method for the detection of human microdeletion syndromes.

### Studies on Microduplication Syndromes

To test the efficiency of MQF-PCR in the detection of microduplication events, we studied the X-linked microduplication syndrome at Xq28 (Lubs syndrome; OMIM#300260) and an autosomal duplication involving the gene *NFI*. For the former, we scanned the *MECP2* duplication critical region [43] and identified a sequence (chrX:153,276,119–153,276,295) that shared high homology with a sequence on chromosome 5p13.3 (chr5:32,649,017–32,649,192). PCR amplification using the same primer pair (Table 2) yielded two fragments that differed by 1 bp in size. Two patients, previously described [29–31] were studied, and one affected brother of each was also analyzed. Figure 3A–B shows an electropherogram illustrating changes in peak area ratio between control (Figure 3A) and a patient known to have the *MECP2* microduplication (Figure 3B). The area of the peak corresponding to chromosome Xp28 (black) had approximately doubled compared to the control peak area (white). Similar results were obtained for the other 3 patients known to have the *MECP2*



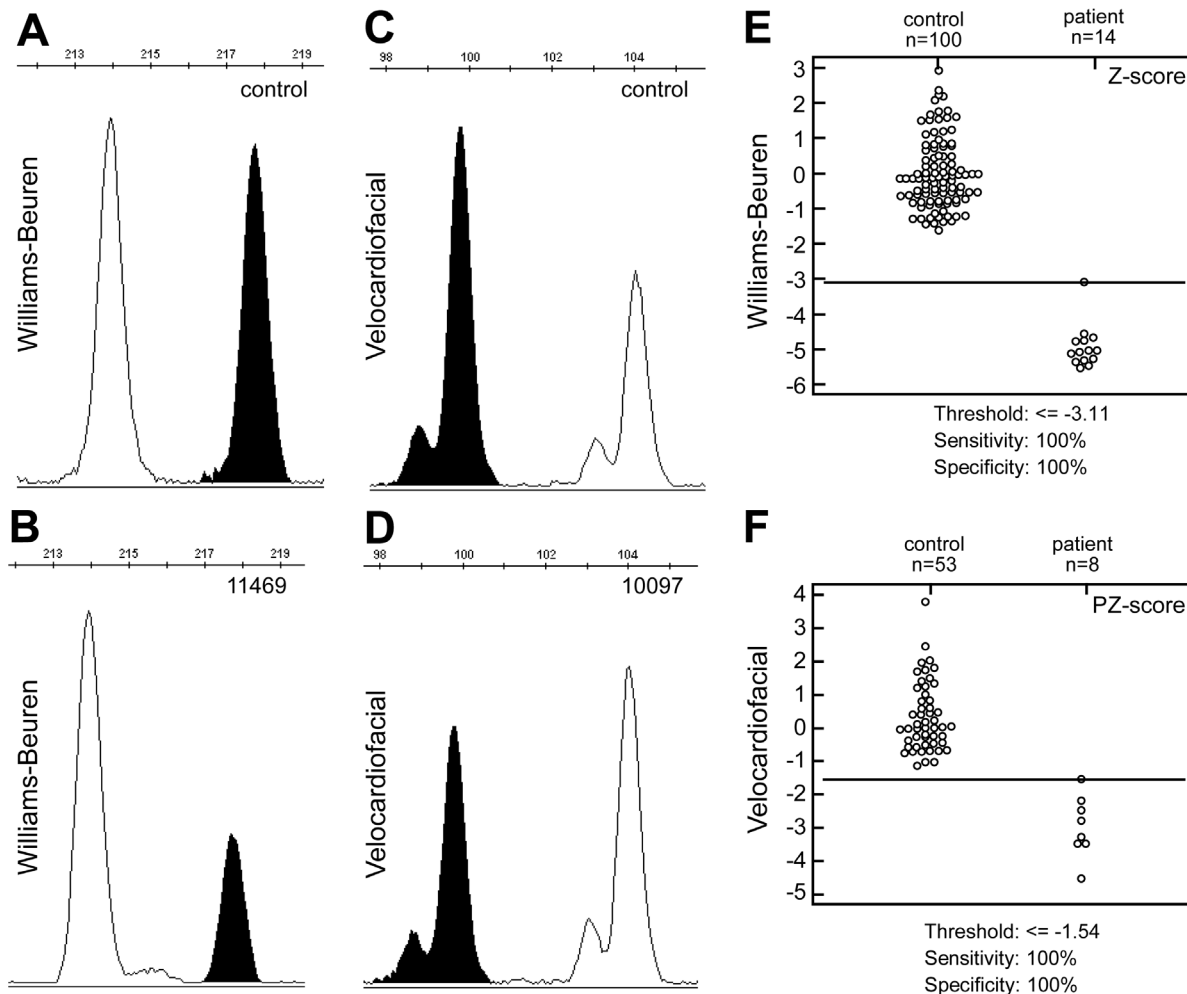


**Figure 1. Schematic overview of MQF-PCR primer selection for Williams-Beuren and Velocardiofacial syndromes critical regions (not drawn to scale).** A) Williams-Beuren critical region at 7q11.23 contains centromeric (white arrow), middle (grey arrow), and telomeric (black arrow) blocks of low copy repeats. The minimal critical region in this study represents the region that is flanked by the inner block of low copy repeats. Sequence similarity search identified a region that can be amplified using the LIMK1-MQF primers (bold) and has significant similarity to homologous region at 18p11.32. B) Multiple sequence alignment of the LIMK1-MQF region with its homologous region on chromosome 18. A deletion of 2 bp (dashed box) differentiates the two fragments amplified using the same primer pair. C) Velocardiofacial critical region at 22q11.2 is delimited by 4 blocks of low copy repeats. The minimal critical region in this study represents the region that is flanked by two blocks of low copy repeats most proximal to the centromere (black boxes). Sequence similarity search identified a region within the critical region that can be amplified using the VCF-MQF primers (bold) with significant similarity to a homologous region at 3p11.1. D) Multiple sequence alignment of the VCF-MQF region with its homologous region on chromosome 3. A deletion of 5 bp (dashed box) differentiates the two fragments amplified using the same primer pair. Microsatellite markers (italicized) and Real-Time PCR primers used in molecular diagnosis of patients are shown in both panels.  
doi:10.1371/journal.pone.0061328.g001

microduplication syndrome. The detection performance of the primers for the Lubs syndrome was evaluated using ROC curve analysis. Using the Z-score values [34] summarized in Table 1, the diagnostic primer achieved 100% sensitivity and 100% specificity (Figure 3E). The probabilities of a true positive result (positive predictive value) were estimated at 100% (95% confidence interval = 40–100%), a false positive result at 0% (95% confidence interval = 0–60%), a true negative result (negative predictive value) at 100% (95% confidence interval = 91–100%), and a false negative result at 0% (95% confidence interval = 0–9%).

For the autosomal duplication involving the gene *NFI* we designed a diagnostic primer in the critical region at 17q11.2 (chr17:29,468,898–29,469,033) that shared high homology with a sequence on chromosome 13q12.11 (chr13:19,673,801–19,673,931). PCR amplification using the same primer pair

(Table 2) yielded two fragments that differed by 6 bp in size. We studied three patients previously diagnosed by FISH and aCGH with microduplication of *NFI* (OMIM #613113) [30]. Figure 3C–D shows an electropherogram illustrating changes in peak area ratio between control (Figure 3C) and a patient known to have the 17q11.2 microduplication (Figure 3D). The area of the peak corresponding to chromosome 17q11.2 (black) had increased by about 30% compared to the control peak area (white). We observed similar results with the other two patients. The detection performance of the primers for the 17q11.2 microduplication was evaluated using ROC curve analysis. Using the Z-score values [34] summarized in Table 1, the diagnostic primer achieved 100% sensitivity and 100% specificity (Figure 3F). The probabilities of a true positive result (positive predictive value) were estimated at 100% (95% confidence interval = 31–100%), a false positive result



**Figure 2. Evaluation of MQF-PCR in detection of Williams-Beuren and Velocardiofacial syndromes.** A–D) Representative electropherograms showing the peak areas corresponding to the syndrome-related chromosomes (black) that are reduced by about 50% in comparison with the peaks representing the control chromosomes (white) between controls and affected individuals. Electropherogram depicting change in peak area between chromosome 7 and its control chromosome in normal (A) and individual with WBS syndrome (B). Electropherogram depicting change of the peak area between chromosome 22 and its control chromosome in normal (C) and individual with VCF syndrome (D). E–F) Interactive dot diagrams of ROC curve analysis of Z scores in WBS (E), and PZ scores in VCF syndrome (F). Both diagnostic primers achieved 100% diagnostic sensitivity and 100% diagnostic specificity. The number of cases analyzed and the detection threshold values for both syndromes are given.

doi:10.1371/journal.pone.0061328.g002

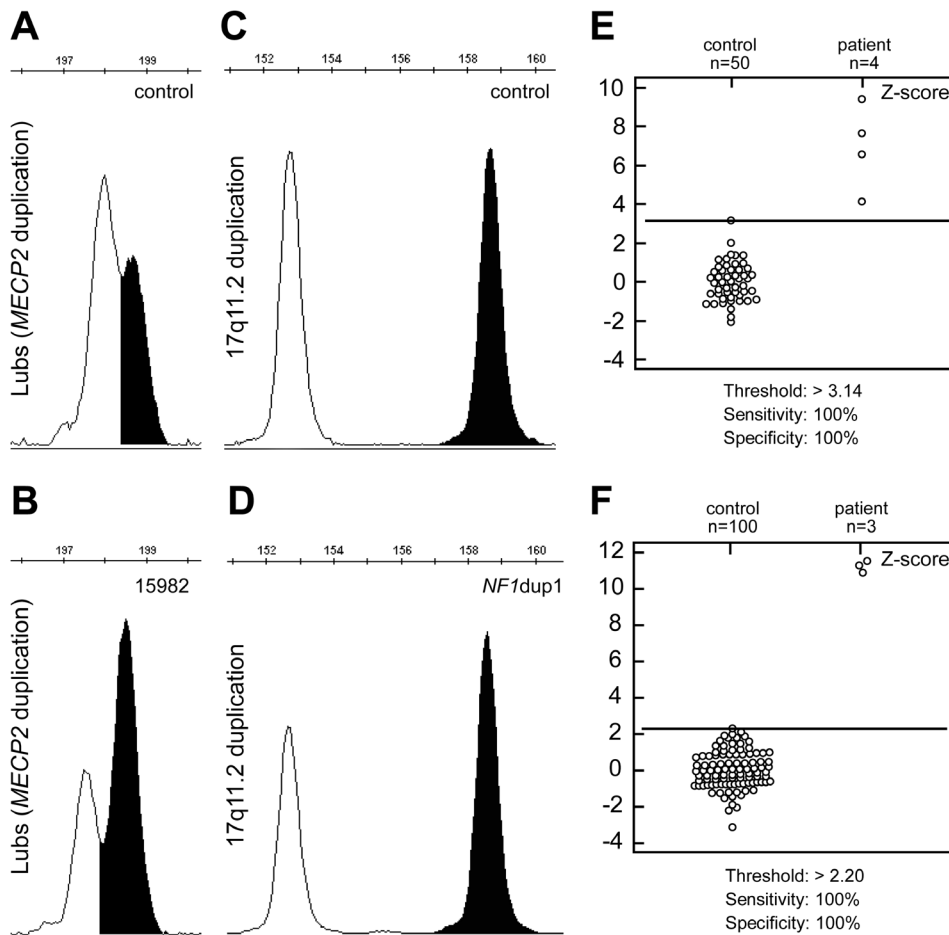
at 0% (95% confidence interval = 0–69%), a true negative result (negative predictive value) at 100% (95% confidence interval = 95–100%), and a false negative result at 0% (95% confidence interval = 0–5%). The results from detection of the Lubs syndrome and the 17q11.2 microduplication further confirm that MQF-PCR also presents a reliable method for the detection of human microduplication syndromes.

## Discussion

In the past few years, dozens of clinically relevant chromosomal microdeletions and microduplications have been described in humans, often associated with mental deficiency, autism and/or physical malformations [1]. Since these small genomic arrangements are generally below the detection limit of optical microscopy, it is essential to use molecular diagnostic procedures to furnish an explanation for the observed symptoms and signs and to provide clinical and genetic prognoses for the patients and their

families. In developed countries, pangenomic microarray-based molecular tests, particularly aCGH, have become the gold standard for such laboratory diagnosis [44]. However, these tests are very costly and depend on availability of expensive equipment that needs to be frequently upgraded. As a result of these high costs, patients in developing countries do not have access to the tests and are frequently left undiagnosed, with great prejudice for their families.

Although some microdeletion/microduplication syndromes have ill-defined phenotypes, many of them, indeed the most common ones, can be reliably diagnosed on clinical grounds. This propitiates laboratory confirmation to be made using simpler targeted molecular tests. In this article we describe the use of an inexpensive quantitative fluorescent PCR method for targeted identification of patients bearing microdeletion and microduplication syndromes that we proposed to call MQF-PCR (Microdeletion/Microduplication Quantitative Fluorescent PCR). The MQF-PCR method achieved 100% sensitivity and 100% speci-



**Figure 3. Detection of the Lubs (*MECP2* duplication) and 17q11.2 microduplication syndromes.** Representative electropherograms showing changes in the peak area ratios between a control sample (A) and a patient (B) in diagnosis of the Lubs syndrome. The peak area corresponding to the duplicated region on chromosome Xq28 (black) has significantly increased in size compared to its control region on chromosome 5p13.3 (white). Electropherogram depicting change of the peak area between chromosome 17 and its control chromosome in normal (C) and individual with microduplication of 17q11.2 (D). The peak area corresponding to the duplicated region on chromosome 17 (black) has significantly increased in size compared to its control region on chromosome 13q12.11 (white). E–F Interactive dot diagrams of ROC curve analysis of Z scores in Lubs (E), and 17q11.2 microduplication syndrome (F). Both diagnostic primers achieved 100% diagnostic sensitivity and 100% diagnostic specificity. The number of cases analyzed and the detection threshold values for both syndromes are given. doi:10.1371/journal.pone.0061328.g003

ficity in the detection of patients with the Williams-Beuren syndrome, Velocardiofacial syndrome, Lubs syndrome (*MECP2* duplication) and the 17q11.2 microduplication involving the gene *NFI*. We believe that our method can be expanded to any syndrome originating from loss or gain of genomic material. We developed highly promising primer pairs for several other rarer syndromes where comprehensive validation is pending the collection of additional patients.

The MQF-PCR test is very rapid, allowing results to be reached in a just a few hours. Since the method uses a very cost-efficient fluorescent labeling utilizing a single universal fluorescent primer [31] coupled with signal detection provided using equipment readily available in paternity and forensic laboratories in developing countries, the price of the necessary materials is low. In fact, it is possible to perform complete analyses at less than US\$8.00 per sample, significantly less than a comparable targeted test using MLPA, which costs US\$100.00 per sample in Brazil. Unlike Real-Time PCR, our method employs a single primer that allows robust internal control of amplification throughout the PCR reaction. Any deviations between amplification efficiency of the

test and control amplicons are therefore tightly controlled and result in excellent reproducibility. Consequently, only one diagnostic primer pair was necessary to accurately identify affected individuals, which also contributes to reduced cost compared to Real-Time PCR and MLPA where multiple primer pairs are used in order to gain confidence in results. Our results were reliable and indeed we found no advantage of performing experiments in replicates. This probably was a consequence of normalization of our results with those of a DNA pool of one hundred normal individuals amplified and analyzed in parallel with the test sample. Furthermore, by the fact that it makes use of ideally matched internal controls, it delivers satisfactory results using a range of template DNA concentrations and is not limited to high quality DNA. The overall template quality does not seem to affect the performance of our method. Indeed, samples stored for 10 years at 4°C have provided satisfactory results. MQF-PCR has shown to be applicable to clinical material embedded in paraffin.

In summary, MQF-PCR has been developed as a rapid, reliable and cost-effective method for screening and detection of several human microdeletion and microduplication syndromes. Its ease

and low cost make it accessible to any clinical diagnostic laboratory. It is thus ideally suited for diagnostic use in developing countries, but has general applicability as well. However, its validation as a conclusive diagnostic procedure is still pending the collection of additional patients.

## Supporting Information

**Table S1 Summary of primers used in molecular diagnosis confirmation of Williams-Beuren and Velo-cardiofacial syndromes using polymorphic microsatellites and Real-Time PCR.**

## References

- Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, et al. (2012) Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem* 60: 346–358.
- Gijsbers AC, Ruivenkamp CA (2011) Molecular karyotyping: from microscope to SNP arrays. *Horm Res Paediatr* 76: 208–213.
- Crotwell PL, Hoyme HE (2012) Advances in whole-genome genetic testing: from chromosomes to microarrays. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 42: 47–73.
- Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL (2011) Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 12: 25–51.
- Carr IM, Diggle CP, Khan K, Inglehearn C, McKibbin M, et al. (2012) Rapid visualisation of microarray copy number data for the detection of structural variations linked to a disease phenotype. *PLoS One* 7: e43466.
- Carr IM, Markham SA, Pena SDJ (2011) Estimating the degree of identity by descent in consanguineous couples. *Hum Mutat* 32: 1350–1358.
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, et al. (2007) 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* 145C: 335–345.
- Tonk V, Schneider NR, Delgado MR, Mao J, Schultz RA (1996) Identification and molecular confirmation of a small chromosome 10q duplication [dir dup(10)(q24.2→q24.3)] inherited from a mother mosaic for the abnormality. *Am J Med Genet* 61: 16–20.
- Magenis RE, Maslen CL, Smith L, Allen L, Sakai LY (1991) Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. *Genomics* 11: 346–351.
- Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EW, et al. (2005) A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics* 6: 180.
- Truong HT, Solaymani-Kohal S, Baker KR, Girirajan S, Williams SR, et al. (2008) Diagnosing Smith-Magenis syndrome and duplication 17p11.2 syndrome by RAI1 gene copy number variation using quantitative real-time PCR. *Genet Test* 12: 67–73.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijjer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, et al. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30: e57.
- White SJ, Vink GR, Kriek M, Wuyts W, Schouten J, et al. (2004) Two-color multiplex ligation-dependent probe amplification: detecting genomic rearrangements in hereditary multiple exostoses. *Hum Mutat* 24: 86–92.
- Mutter GL, Pomponio RJ (1991) Molecular diagnosis of sex chromosome aneuploidy using quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 19: 4203–4207.
- Mansfield ES (1993) Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 2: 43–50.
- Mann K, Ogilvie CM (2012) QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenat Diagn* 32: 309–314.
- Lec HH, Chang JG, Lin SP, Chao HT, Yang ML, et al. (1997) Rapid detection of trisomy 21 by homologous gene quantitative PCR (HGQ-PCR). *Hum Genet* 99: 364–367.
- Deusch S, Choudhury U, Merla G, Howald C, Sylvan A, et al. (2004) Detection of aneuploidies by paralogous sequence quantification. *J Med Genet* 41: 908–915.
- Armour JA, Palla R, Zeeuwen PL, den Heijer M, Schalkwijk J, et al. (2007) Accurate, high-throughput typing of copy number variation using paralogue ratios from dispersed repeats. *Nucleic Acids Res* 35: e19.
- Laitinen J, Samarut J, Holtta E (1994) A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques* 17: 316, 318, 320–312.
- Urban ZC, Csiszár K, Fekete G, Boyd CD (1997) Short report on DNA marker at candidate locus. *Clinical Genetics* 51: 133–134.
- Foster K, Ferrell R, King-Underwood L, Povey S, Attwood J, et al. (1993) 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* 57: 87–96.
- Mari A, Amati F, Conti E, Bengala M, Novelli G, et al. (1998) A highly polymorphic CA/GT repeat (LIMK1GT) within the Williams syndrome critical region. *Clin Genet* 53: 226–227.
- Gilbert-Dussardier B, Bonneau D, Gigarel N, Le Merrer M, Bonnet D, et al. (1995) A novel microsatellite DNA marker at locus D7S1870 detects hemizygoty in 75% of patients with Williams syndrome. *Am J Hum Genet* 56: 542–544.
- Marineau C, Aubry M, Julien JP, Rouleau GA (1992) Dinucleotide repeat polymorphism at the D22S264 locus. *Nucleic Acids Res* 20: 1430.
- Morrow B, Goldberg R, Carlson C, Das Gupta R, Sirotkin H, et al. (1995) Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 56: 1391–1403.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, et al. (2006) Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 43: 180–186.
- Carvalho CM, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, et al. (2009) Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching. *Hum Mol Genet* 18: 2188–2203.
- Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, et al. (2008) Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res* 18: 847–858.
- Moles KJ, Gowans GC, Gedela S, Beversdorf D, Yu A, et al. (2012) NF1 microduplications: identification of seven nonrelated individuals provides further characterization of the phenotype. *Genet Med* 14: 508–514.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233–234.
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* 20: 1004–1006, 1008–1010.
- Sheskin DJ (2011) Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Boca Raton: Chapman & Hall. 1016 p.
- Lanzante JR (1996) Resistant, robust and nonparametric techniques for the analysis of climate data: Theory and examples, including applications to historical radiosonde station data. *Int J Climatol* 16: 1197–1226.
- Zweig MH, Campbell G (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39: 561–577.
- Metz CE (1978) Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 8: 283–298.
- Tukey JV (1977) Exploratory data analysis. Reading, Mass: Addison-Wesley Publishing Company. 688 p.
- Wilson EB (1927) Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association* 22: 209–212.
- Newcombe RG (1998) Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Stat Med* 17: 857–872.
- Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA (2003) Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 73: 131–151.
- Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Fusco C (2010) Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet* 128: 3–26.
- Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, et al. (2000) Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 9: 489–501.
- Lugtenberg D, Kleefstra T, Oudakker AR, Nillesen WM, Yntema HG, et al. (2009) Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 17: 444–453.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, et al. (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86: 749–764.

(DOCX)

## Acknowledgments

We thank Dr. Lisa G. Shaffer and Dr. Jill Mokry from Signature Genomics Laboratories, Spokane, WA, USA for providing samples of DNA.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SDJP MS. Performed the experiments: MS HGD HBP PSC. Analyzed the data: MS HGD HBP PSC. Contributed reagents/materials/analysis tools: AMVM. Wrote the paper: MS SDJP.