



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

**SERVIÇO ESPECIAL DE GENÉTICA MÉDICA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**USO DO MLPA PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM  
ATRASSO NO DESENVOLVIMENTO E/OU DEFICIÊNCIA  
INTELLECTUAL SINDRÔMICOS**

**ORIENTADA: Anisse Marques Chami**

**ORIENTADOR: ProfºDrº Marcos José Burle de Aguiar**

**Belo Horizonte – MG**

**Junho de 2016**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

**SERVIÇO ESPECIAL DE GENÉTICA MÉDICA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**USO DO MLPA PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM  
ATRASO NO DESENVOLVIMENTO E/OU DEFICIÊNCIA  
INTELECTUAL SINDRÔMICOS**

**ORIENTADA: Anisse Marques Chami**

**ORIENTADOR: ProfºDrº Marcos José Burle de Aguiar**

**Belo Horizonte – MG**

**Junho de 2016**



**ANISSE MARQUES CHAMI**

**USO DO MLPA PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM DEFICIÊNCIA  
INTELECTUAL E/OU ATRASO DO DESENVOLVIMENTO SINDRÔMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da  
Criança e Adolescente da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito para obtenção do grau de  
mestre em Pediatria

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Marcos José Burle de Aguiar

Universidade Federal de Minas Gerais

**Belo Horizonte – MG**

**2016**

*Dedico este trabalho à pessoa a quem tenho maior amor e gratidão*

*CONSUELO APARECIDA MARQUES CHAMI*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço principalmente aos pacientes que se disponibilizaram prontamente a participar da pesquisa.*

*Ao meu orientador Dr. Marcos Aguiar, por todo auxílio para que este trabalho fosse concluído e compartilhou grandes ensinamentos de que certamente influenciarão positivamente em minha vida profissional e pessoal.*

*À Dra. Maria Raquel Carvalho e toda sua equipe do laboratório de Genética Médica e Humana do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde os testes foram realizados.*

*Um especial agradecimento pela parceria e acolhimento, à Gabriela Salazar e Shirlene Ferreira com quem trabalhei diretamente nessa pesquisa.*

*Ao Wilton Evangelista que coordena as atividades da pós-graduação e quem, sempre disponível, auxiliou-me de forma tão eficiente durante o mestrado.*

*À Dra. Letícia Leão e Dra. Regina Aguiar, pelas quais tenho grande admiração e colaboraram enormemente com minha formação como geneticista. À todos os colegas geneticistas do serviço Especial de Genética Médica com quem convivi durante e após a residência.*

*À minha família querida, pai (Décio), mãe (Consuelo), irmãos (Érika e Breno), meu amado companheiro Daniel Ferraz e seus familiares, sempre me apoiando e respeitando meus momentos de trabalho.*

*Aos meus amigos que fazem a vida diariamente tão alegre! Um agradecimento especial a Maria Clara de Freitas Coelho (Cacaia), a melhor amiga, pra todas as horas e Fabiana Pappini, minha companheira de aventuras nas trilhas e com quem não pude estar já há tempos.*

*“Se não fosse pelas pedras em seu leito, os rios não teriam canções alguma”.*

*Carl Perkins*

**SUMÁRIO**

|   |             |
|---|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS E FOTOS</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>1) INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1A criança com deficiência intelectual  | 1           |
| 1.1.1 Conceito  | 1           |
| 1.1.2 Epidemiologia e Etiologia   | 2           |
| 1.1.3 O diagnóstico específico para o paciente com deficiência intelectual e/ou atraso global do desenvolvimento          | 6           |
| 1.1.4 O teste genético para pacientes com deficiência intelectual e/ou atraso global do desenvolvimento                   | 8           |
| 1.2 O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) como opção de teste genético para pacientes com DI e/ou AGD | 11          |
| 1.3 A técnica MLPA  | 12          |
| <b>2) A EXPERIÊNCIA DO USO DO MLPA NA UFMG</b>  | <b>16</b>   |
| 2.1 Objetivos   | 16          |
| 2.2 Aprovação pelo Comitê de Ética  | 17          |
| <b>3) MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>18</b>   |
| 3.1 Pacientes   | 18          |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.2 Coleta das Amostras</b>   | <b>18</b> |
| <b>3.3 Análise dos prontuários dos pacientes com resultados anormais</b>   | <b>19</b> |
| <b>3.4 MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</b>   | <b>19</b> |
| <br>   |           |
| <b>4) RESULTADOS</b>   | <b>24</b> |
| <b>4.1) Síndrome Velocardiofacial com apresentações fenotípicas e genotípicas variadas</b>   | <b>28</b> |
| <b>4.1.1) Caso 5608 – Dupla Deleção, 22q11.2 e 1p36. – Relato de Caso</b>  | <b>28</b> |
| <b>4.1.2) Casos 5604, 5725, 5770 – Del 22q11.2 – Síndrome velocardiofacial sem diagnóstico específico suspeito</b>                                 | <b>30</b> |
| <b>4.1.3) Caso 5511, 5729 - Deleção 22q11.2 com suspeita de Síndrome de Velocardiofacial</b>   | <b>32</b> |
| <br>   |           |
| <b>4.2) Caso 5596 – deleção 5q35 e duplicação 11p15 – Sobreposição de fenótipos entre Síndrome de Sotos e de Beckwith-Wiedman - Relato de Caso</b> | <b>33</b> |
| <br>   |           |
| <b>4.3) Caso 5592: Deleção 2q33.1 – Síndrome de Microdeleção 2q33.1: Relato de caso</b>  | <b>35</b> |
| <br>   |           |
| <b>4.4) Caso 5597 – Síndrome de microdeleção 1q44</b>  | <b>35</b> |
| <br>   |           |
| <b>4.5) Caso 5630 – Confirmação de diagnóstico clínico de Prader-Willi</b>   | <b>36</b> |
| <br>   |           |
| <b>4.6) Casos 5583 e 5585: Confirmação diagnóstica de Síndrome de Williams</b>   | <b>37</b> |
| <br>   |           |
| <b>4.7) Duplicação MECP2 – caso 5721</b>   | <b>38</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.8) Caso 5732 – deleção 8p23.3 e exposição ao teratígeno<br/>Carbamazepina</b>   | <b>39</b> |
| <b>4.9) Casos 5574 e 5625 - Deleção 9q34.3 - Síndrome de Kleeftstraem um<br/>paciente com suspeita de síndrome de Angelman e outro com suspeita de<br/>síndrome de Robinow</b> | <b>41</b> |
| <b>4.10) Caso 5761- Deleção 6q27 em paciente sem diagnóstico<br/>definido</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.11) Caso 5780 – Deleção 2q37.2 associada a duplicação 5p15.33</b>   | <b>43</b> |
| <b>4.12) Caso 5569 - Duplicação 8p23.3 em paciente sem suspeita clínica<br/>específica</b>   | <b>45</b> |
| <b>4.13) Caso 5681 – Duplicação 9p24.3 e del 18p11.32 confirmados<br/>por aGCH</b>   | <b>46</b> |
| <b>4.14) Caso 5723 – Síndrome de microdeleção 6p25</b>   | <b>49</b> |
| <b>4.15) Casos 5675 e 5728 - Deleção SYBL1</b>   | <b>50</b> |
| <b>4.16) Casos com alterações em apenas um dos KITS para<br/>microdeleções subteloméricas (P070-B3) sem confirmação pelo Kit P036-<br/>E2</b>                                  | <b>51</b> |
| <b>5) DISCUSSÃO</b>  | <b>55</b> |
| <b>6) CONCLUSÕES</b>   | <b>62</b> |
| <b>7) ARTIGO</b>   | <b>63</b> |
| <b>8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>7</b>  |
| <b>9) ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido</b>   | <b>83</b> |

**LISTA DE FIGURAS E FOTOS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1 -Deleções terminais/subteloméricas e intersticial</b> | <b>5</b>  |
| <b>Figura 2 -Etapas do processo de MLPA</b>                       | <b>15</b> |
| <b>Figura 3 - Descrição do kit SALSA MLPA 070-B3</b>              | <b>20</b> |
| <b>Figura 4 - Descrição do kit SALSA MLPA P036-E2</b>             | <b>21</b> |
| <b>Figura 5 – Descrição do kit SALSA MLPA P245-B1</b>             | <b>22</b> |
| <b>Fotos caso 5608</b>  | <b>29</b> |
| <b>Fotos caso 5596</b>  | <b>34</b> |
| <b>Fotos caso 5681</b>  | <b>48</b> |

**LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1- Regiões cromossômicas e rearranjos mais comuns descritos, determinando aneuploidias, microdeleções/microduplicações 4**

**Quadro 2- Proposta para a abordagem genética da criança com deficiência intelectual ou atraso global do desenvolvimento 6**

**Quadro 3 – Comparação entre as técnicas para estudo molecular de microdeleções mostrando vantagens e desvantagens principais de cada exame 9**

**Quadro 4 – Descrição dos resultados encontrados do total de pacientes selecionados 24**

**Quadro 5 – Resultados alterados e análise da confirmação por outro exame dos MLPA ou a-CGH realizados no período de out/2012 a out/2015**

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDA**

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>aCGH</b>      | Array-Based Comparative Genome Hybridization               |
| <b>AGD</b>       | Atraso Global do desenvolvimento                           |
| <b>CIA e CIV</b> | Comunicação interatrial e comunicação interventricular     |
| <b>CNV</b>       | copynumbervariation  |
| <b>COEP</b>      | Comitê de Ética em Pesquisa                                |
| <b>Del</b>       | Deleção  |
| <b>DI</b>        | Déficiência intelectual                                    |
| <b>DNA</b>       | DeoxiribonucleicAcid                                       |
| <b>DSM-V</b>     | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th |
| <b>Dup</b>       | Duplicação   |
| <b>FISH</b>      | Fluorescent In Situ Hybridization                          |
| <b>MLPA</b>      | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification           |
| <b>OMIM</b>      | Online Mendelian Inheritance in Man                        |
| <b>pb</b>        | Pares de base  |
| <b>PCR</b>       | Polymerase Chain Reaction                                  |
| <b>QI</b>        | Quociente de Inteligência                                  |
| <b>SBW</b>       | Síndrome de Beckwith-Wiedman                               |
| <b>SPW</b>       | Síndrome PraderWilli                                       |
| <b>SVCF</b>      | Síndrome VelocardioFavial                                  |
| <b>UFMG</b>      | Universidade Federal de Minas Gerais                       |

## RESUMO

Atraso global do desenvolvimento (AGD) e deficiência intelectual (DI) acometem 1 a 3% da população. Causas genéticas respondem por aproximadamente 17,4% a 47,1% desses casos e apresentam heterogeneidade. Quando associadas a malformações congênitas e dismorfismos, determinam síndromes genéticas. Dentre essas causas genéticas deleções e duplicações em regiões cromossômicas intersticiais e subteloméricas podem ser diagnosticadas por diferentes métodos. O cariótipo é uma técnica que permite um diagnóstico amplo dessas alterações, mas apresentam limitações para detectar rearranjos menores como microdeleções e microduplicações. O MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) é uma alternativa para estudar essas variações de número de cópias (CNV's) menores. Baseia-se em única análise, por sondas compostas, em kits determinados pelo fabricante (MRC-HOLLAND®), capazes de identificar alterações em regiões específicas do DNA associadas a síndromes genéticas de microdeleções/microduplicações. O presente estudo analisou o resultado de 191 pacientes do Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFMG, no período de outubro de 2012 a outubro de 2015. Todos apresentavam AGD e/ou DI sindrômicos com cariótipos normais. O objetivo principal foi avaliar o auxílio do MLPA no diagnóstico dos pacientes e no aconselhamento genético. A taxa de detecção de alterações foi de 15,9% (29 pacientes). Para validar os resultados, cada caso alterado foi retestado pelo mesmo método, mas com diferentes kits, ou por aCGH (array comparative genomic hybridization). Os casos clínicos alterados foram analisados para avaliar a correlação genótipo-fenótipo e a influência do teste no seguimento do paciente e no aconselhamento genético. Algumas alterações confirmaram suspeitas clínicas de síndromes mais reconhecíveis como velocardiofacial, Williams, Prader-Willi e Sotos. Foram também estabelecidos diagnósticos de síndromes raras, pouco descritas na literatura e de rearranjos complexos cromossômicos (dupla deleções) determinantes para o fenótipo dos pacientes. O MLPA auxiliou no diagnóstico de uma parcela importante de pacientes nesse estudo, embora apresentasse limitações para delinear melhor a etiologia genética em alguns casos.

**Palavras chave:** atraso global do desenvolvimento, deficiência intelectual, síndromes, cariótipo, MLPA, microdeleções, correlação genótipo-fenótipo, diagnóstico, aconselhamento genético.

## ABSTRACT

The prevalence of intellectual disability (ID) in general population is estimated to be between 1% to 3%. It is often associated with global developmental delay (GDD) and others important features as congenital malformations and dysmorphisms. This association characterizes syndromic patients with ID. Genetic causes are heterogeneous and responsible for 17,4% to 47,1% of the syndromic ID and/or GDD etiology. One of the main causes between this group are represented by interstitial and subtelomeric chromosomal deletions and duplications which can be diagnosed with different genomic studies techniques. The G-Banding karyotyping allows a broader approach for these genetic alterations diagnosis. Therefore, it has limitations identifying smaller copy number variations (CNVs) like microdeletions and microduplications. MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) is an alternative molecular test used to detect these smaller CNVs. It uses probe sets commercially available from its manufacture, MRC Holland®, for a very large range of DNA regions associated to genetic microdeletion/duplications disorders. The present study analyzed MLPA test's results from 191 syndromic patients with ID and/or GDD from the Medical Genetic UFMG Clinical Center, between October 2013 and October 2015. All the patients had normal karyotype. The main objective of this research was to improve patient's diagnosis and analyze how MLPA collaborated with this and with genetic counseling. The detections rate for MLPA positive alterations was 15,9% (29/191). To validate the result, each positive case was retested using another MLPA kit and or tested with other molecular technique, like a-CGH (array comparative genome hybridization). They were also investigated singly through the medical records to evaluate the genotype-phenotype correlation and how the test guided the patient diagnosis and management decision. Among the results findings, some clinical suspicions could be confirmed and they represented some of the most common recognizable genetic syndromes: velocardifacial, Williams, Prader-Willi and Sotos syndromes. Also, some rare microdeletion syndromes were identified and some rare chromosomal complex rearrangement (double deletions) that played an expressive role for the patient phenotype. The MLPA improved the clinical genetic assessment for an important portion of patients, although showed a limitations to delineate clearly some genetics findings to some of the patients.

**Key words:** Global developmental delay, intellectual disability, syndromes, karyotype, MLPA, microdeletions/duplications, geotype-phenotype correlations, diagnostic, genetic counseling.



# **USO DO MLPA PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM ATRASO NO DESENVOLVIMENTO E/OU DEFICIÊNCIA INTELECTUAL SINDRÔMICOS**

## **1) INTRODUÇÃO**

### **1.1) A CRIANÇA COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL**

#### **1.1.1) Conceito**

O Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais, 5º edição, (DMS-5) e a Sociedade Americana de Psiquiatria definem o atraso global do desenvolvimento (AGD) e a deficiência intelectual (DI) como um comprometimento importante mental e da capacidade funcional adaptativa. A deficiência intelectual normalmente se apresenta no início da infância e é possível ser diagnosticada em torno de cinco anos de idade, quando as medidas dos padrões para avaliação do desenvolvimento da criança se tornam mais confiáveis (MOESCHLER et al.,2014). A Associação Americana de Deficiência Intelectual e Atraso do Desenvolvimento define deficiência intelectual através do estudo de medidas dos domínios que compreendem o coeficiente de inteligência (QI), o comportamento adaptativo e sistemas de suportes oferecidos para os indivíduos realizarem atividades básicas da vida diária: comer, vestir-se, pentear o cabelo, locomover-se, deitar e levantar da cama, tomar banho, ir ao banheiro (SHALOCK et al., 2007). Para a quantificação da gravidade dos quadros clínicos, é proposto a classificação da deficiência intelectual em leve, moderada, grave e profunda(MAULIK et al.,2011).

O atraso global do desenvolvimento é definido a partir da presença de um atraso significativo em pelo menos dois domínios do desenvolvimento: motor, comunicação, verbal/fala, cognitivo, social e atividades da vida diária

(MOESCHLER et al.,2014). A identificação do AGD é um passo importante, preliminar para avaliação da criança e pode ser determinante em investigações futuras para definir, inclusive, se há ou não deficiência intelectual associada. Esse processo requer auxílio de profissionais especializados e se baseia na documentação dos achados através de medidas de referência específicas para avaliação do desenvolvimento da criança. É importante ressaltar que atrasos leves do desenvolvimento podem ser transitórios e podem não estar associados à deficiência intelectual. Portanto, crianças com deficiência em apenas um domínio, verbal, por exemplo, não devem ser candidatas para estudos da etiologia genética da deficiência intelectual e/ou atraso do desenvolvimento (MOESCHLER et al.,2014).

Várias síndromes genéticas bem conhecidas e descritas na literatura têm a DI como principal manifestação clínica, a qual pode estar associada adismorfismos, transtornos psiquiátricos e malformações congênitas graves (cardiopatias, malformações em sistema nervoso central, anomalias geniturinárias, etc). O conjunto dessas alterações caracteriza um fenótipo, o qual é determinado por um genótipo, ou seja, a alteração bioquímica que determina a manifestação de certas características.

### **1.1.2) Epidemiologia e Etiologia**

A deficiência intelectual (DI) e o atraso global do desenvolvimento (AGD) são situações relativamente comuns em pediatria e a na população global. Sua prevalência é estimada entre 1% a 3% (MOESCHLER et al.,2014; MAULIK et al.,2011). Dentre os indivíduos com DI, as formas leve, moderada, grave e profunda, afetam 85%, 10%, 4% e 2% deles, respectivamente(MAULIK et al.,2011). Considerando investimentos diretos e indiretos oferecidos para dar suporte ao indivíduo com DI, a estimativa de custo nos Estados Unidos pelo *Center for Disease Control and Prevention (2004)*, no ano de 2003, foi de \$ 1

milhão (um milhão de dólares) ao longo da vida por pessoa(MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2004)

As causas da DI estão divididas em dois grupos. As causas exógenas, como exposição aos teratógenos, trauma, infecções, hipoxemia, responsáveis por 18,6% a 44,5% e as causas genéticas, por cerca de 17,4 a 47,1% (MOSCHELR & SHEVELL, 2006). Dentre os casos de etiologia genética, cerca de 15% dos pacientes apresentam outros sinais associados ao AGD ou DI, como dismorfismos e malformações congênitas, sugerindo, portanto, a presença de uma síndrome genética. No entanto, a maioria dos pacientes não apresentam dismorfismos maiores e/ou malformações congênitas. São, então, considerados, como casos não sindrômicos (MICLEA et al.,2015).

A etiologia genética dessas doenças é heterogênea e pode envolver grandes rearranjos no genoma, como as alterações cromossômicas numéricas, responsáveis por 25% dos casos, sendo a Síndrome de Down, trissomia do cromossomo 21, a aneuploidia mais comum dentre elas. Além das aneuploidias, outras alterações cromossômicas já bem descritas têm como causa rearranjos cromossômicos menores. Essas alterações definem síndromes de microdeleções ou microduplicações (QUADRO 1). Entretanto, mesmo nas formas sindrômicas comuns, os achados clínicos nem sempre são tão óbvios o suficiente para permitir um diagnóstico ou mesmo uma suspeita clínica específica.

Alterações que envolvem deleções e duplicações de regiões cromossômicas são conhecidas como CNV's (copy-number variations) ou variações do número de cópias e constituem a maior fonte de variações genéticas entre os indivíduos humanos(HASTINGS et al.,2009). De acordo com estudos sobre os mecanismos de alterações genéticas associadas à CNV's, esses rearranjos são responsáveis, por processos que vão desde a própria evolução humana à etiologia de doenças, como é o caso das desordens mentais e do desenvolvimento (HASTING et al.,2009).Do ponto de vista genético molecular, as CNV's são definidas como um segmento de DNA maior que 1kb que mostra

uma variação de cópia comparada com um genoma referência (STUPPIA et al.,2012).

**QUADRO 1: Regiões cromossômicas e rearranjos mais comuns descritos, determinando aneuploidia, microdeleções/duplicações.**

| <b>ANEUPLOIDIAS</b>    | <b>MICRODELEÇÕES</b>        | <b>MICRODUPLICAÇÕES</b>       |
|------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>Trissomiado 21</b>  | <b>1p36, 2q37, 4p16,</b>    | <b>7q11.2,8p23.1,15q11.2,</b> |
| <b>Monossomia do X</b> | <b>5p15,7q11.2, 8p23.1,</b> | <b>22q11.2</b>                |
| <b>Trissomiado 18</b>  | <b>8q23q24, 9q34.3,</b>     |                               |
| <b>trissomia do 13</b> | <b>11p13, 11p11.2,</b>      |                               |
|                        | <b>15q11.2, 16p13.3,</b>    |                               |
|                        | <b>17p11.2, 17q12,</b>      |                               |
|                        | <b>17q21.3, 18q23,</b>      |                               |
|                        | <b>22q11.2, 22q13.3</b>     |                               |

*Adaptadode Miclea et. al, 2015*

Além dessas síndromes de microdeleções já citadas, outros rearranjos cromossômicos foram descritos e associados a quadros sindrômicos específicos. Graças à evolução das técnicas para estudo molecular, recentemente, muitos desses rearranjos foram classificados como etiologia de novas síndromes de microdeleções e microduplicações (NEVADO et al.,2014).

Tais rearranjos são classificados de acordo com a região em que ocorrem no cromossomo. Deleções/duplicações intersticiais resultam de duas quebras dentro de um mesmo cromossomo envolvendo a região dentro dos pontos de quebras. As deleções subteloméricas (regiões na extremidade dos cromossomos) envolvem um ponto de quebra resultando em perda ou ganho de material cromossômico na região distal a esse ponto (FIGURA1). Essas regiões são ricas em genes e aproximadamente 5-10% dos pacientes com anomalias congênitas e deficiência intelectual, com cariótipo prévio normal, apresentam deleções e/ou duplicações nestas regiões (VISSERS et al.,2003).

Assim como as regiões subteloômicas, as regiões intersticiais cromossômicas podem apresentar deleções ou duplicações submicroscópicas, e, também não são visíveis ao cariótipo (FIGURA 1).

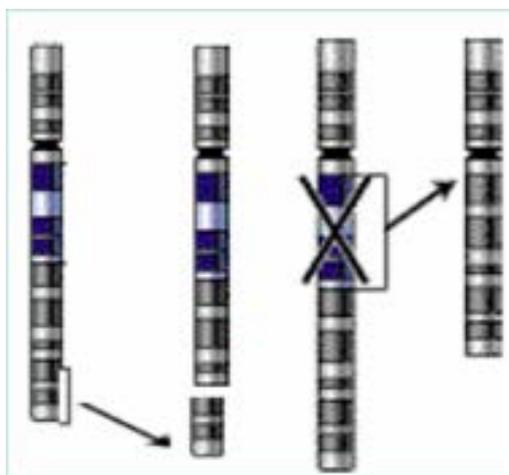


Figura 1: exemplo de deleção cromossômica terminal/subteloômica (primeira seta) e intersticial (segunda seta)

Também as mutações em um único gene ou monogênicas fazem parte da etiologia dessas desordens. Elas representam cerca 10% dos casos de etiologia genética e a síndrome do X-Fragil, é a causa mais comum (5% dos casos) de DI com padrão monogênico (MICLEA et. al, 2015). Vários genes específicos estão associados às síndromes que evoluem com atraso do desenvolvimento e deficiência intelectual ou mesmo a um quadro não sindrômico. Muito desses genes são classificados de acordo com a função neurológica desempenhada pela respectiva proteína no sistema nervoso central. Por exemplo: genes associados às vias metabólicas neuronais, genes que participam da neurogenese, genes que desempenham funções ligadas à migração neuronal ou genes ligados à pré-sinapse e pós sinapse. Portanto, mutações, como CNV's, que compreendem regiões onde se localizam genes desse tipo e comprometam a integridade dos mesmos, podem representar importantes fatores etiológicos da DI ou do AGD.

### **1.1.3) O diagnóstico específico para o paciente com deficiência Intelectual e/ou atraso global do desenvolvimento**

Schaefer e Bodensteiner (1992) afirmaram que o diagnóstico específico é aquele que consegue ser “traduzido em uma informação clínica para a família, que inclua informações sobre o prognóstico, risco de recorrência e medidas de tratamentos disponíveis”. Um achado, por exemplo, de agenesia de corpo caloso é considerado um sinal e não um diagnóstico, enquanto que a definição de Síndrome Acrocalosal Autossômica Recessiva (agenesia de corpo caloso associado apolidactilia) é um diagnóstico clínico. Van Karnebeek et al. (2005) definem diagnóstico etiológico como uma evidência suficientemente reportada na literatura capaz de levar a uma conclusão de causalidade e que ainda se enquadra na definição de Schaefer-Bodensteiner, citada acima. Tendo em vista esses conceitos, estabelecer a etiologia genética é, claramente, uma ferramenta essencial para definição de um diagnóstico como “específico”. (QUADRO 2)

#### **QUADRO 2: Propostas para a abordagem genética da criança com deficiência intelectual ou atraso do global do desenvolvimento.**

- 
- 1- Esclarecimento da etiologia
  - 2- Previsão sobre o prognóstico e curso esperado da doença
  - 3- Discussão sobre mecanismos genéticos da doença e chances de recorrência
  - 4- Definir ou redefinir opções de tratamento
  - 5- Evitar testes diagnósticos desnecessários ou redundantes
  - 6- Informar sobre tratamento, sintomas e manejo de complicações possíveis
  - 7- Promover suporte e condições apropriadas para o suporte familiar
  - 8- Oferecer ou acessar pesquisas ou protocolos de tratamentos voltados para a doença
  - 9- Orientar a família e/ou o paciente no contexto do suporte médico domiciliar que pode ser oferecido pelos serviços de saúde, direitos e deveres sociais voltados para pacientes com deficiência e sua famílias.

---

*Adaptado de Moeschler et al., 2014*

Makelaet a.,2009 avaliaram detalhadamente de forma qualitativa 20 famílias com deficiência intelectual sem um diagnóstico etiológico específico e relatou algumas das principais necessidades e sentimentos sobre o que representaria um diagnóstico genético. Abaixo segue alguma das representações interpretadas pela análise do estudo qualitativo:

- Validação: a confirmação do diagnóstico específico reforça a existência de um problema e a posição dos pais para enfrentar a situação quando melhor esclarecida

- Informação: um diagnóstico é interpretado como um auxílio para guiar expectativas dos familiares e o próprio manejo clínico imediato do paciente, bem como tratamentos ou cura, futuramente.

- Busca: direciona a busca de serviços especializados para auxiliar na assistência como escolas e serviços de saúde especializados.

A abordagem diagnóstica dos pacientes com DI/AGD é familiar aos profissionais que lidam com cuidados pediátricos. A coleta da história médica da criança se baseia em dados pré-natais e do nascimento; história familiar que inclua uma análise com heredograma com, pelo menos, três gerações; exame físico com enfoque no exame morfológico da criança e exame neurológico com percepção também voltada para questões comportamentais. Essa análise, muitas vezes pode sugerir uma síndrome ou um diagnóstico específico.

A exclusão de diagnósticos tratáveis como é o caso de alguns erros inatos do metabolismo é muito importante ainda no início da avaliação ou de sinais e sintomas associados. Desde 2006 a Associação Americana de Pediatria considera o rastreamento metabólico como parte da abordagem das crianças com DI. Estudos mostraram uma estimativa de que 1% a 5% dos casos estudados de pacientes com DI tinham erros inatos do metabolismo como causas identificáveis (VAN KARNEBEEK & STOCKLER , 2011).

O estudo por neuroimagem pode fazer parte da avaliação da criança com AGD e DI. Segundo a Academia Americana de Pediatria. A recomendação se baseia em achados clínicos como: microcefalia, macrocefalia, déficit neurológico motor focal, sinais piramidais ou extrapiramidais, epilepsia. Nesses casos, recomenda-se que o estudo do encéfalo seja realizado por ressonância magnética(MOESCHLER et al., 2014). Para alguns casos a tomografia pode ser útil para diagnóstico de lesões associadas a suspeita de infecções congênitas.

#### **1.1.4) O teste genético para pacientes com DI/AGD**

Por mais de 35 anos a análise citogenética por cariótipo por bandas G, tem sido o método padrão para diagnóstico dos rearranjos genéticos em pacientes com DI. O cariótipo convencional e outras técnicas de estudo citogenético como é o caso do FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) ainda permanecem como ferramentas importantes para o diagnóstico, principalmente quando há uma suspeita clínica de uma síndrome específica de anomalias cromossômicas mais comuns, como síndrome de Down, síndrome de Williams, síndrome velocardiofacial.

Esses métodos, entretanto, apresentam limitações para detectar CNV's menores. Nos últimos anos houve uma evolução das técnicas de estudo moleculares. O a-CGH (*array comparative genome hybridization*), por exemplo, é um método de análise genômica por hibridização comparativa que apresenta uma resolução muito maior que o cariótipo convencional. Isso permite um taxa de diagnóstico, pelo menos, duas vezes maior comparando os dois métodos (VISSERS et al., 2010).

Para o pediatra, seria importante ressaltar que o trabalho multidisciplinar e a proximidade com o médico geneticista é importante, porque este tem mais familiaridade para interpretar e lidar com resultados de testes genéticos. Em países desenvolvidos, exames como o a-CGH são testes genéticos cada vez

mais comuns como parte da rotina para estudo de pacientes com DI e/ou AGD sindrômicos e pode fazer parte da recomendação para diagnóstico genético nesses pacientes. No Brasil o acesso a testes genéticos como esse ainda é limitado para a população de uma forma geral, principalmente pelos seus custos e familiaridades dos médicos com os mesmos.

Os resultados destes testes podem indicar uma variante benigna, de significado incerto ou, ainda, uma variante possivelmente patogênica. Muitas vezes, a correlação entre o achado do teste (genótipo) e a apresentação clínica do paciente (fenótipo) pode ser desafiadora e interferir diretamente no aconselhamento genético. Parte do aconselhamento genético tem como objetivo principal definir uma chance de recorrência da doença em questão para futuras gerações e isso está diretamente associado aos resultados destes testes. Embora pela Sociedade Americana de Pediatria o a-CGH seja o teste de escolha para a avaliação diagnóstica inicial em pacientes com DI/AGD sem diagnóstico definido, esta não é única opção, especialmente em países com poucos recursos.

Existem muitas técnicas de estudo moleculares que possibilitam o diagnóstico desses rearranjos, os quais apresentam vantagens e desvantagem a serem consideradas para escolha de um deles para o diagnóstico clínico (QUADRO 3).

**QUADRO 3: Comparação entre as técnicas para estudo molecular de microdeleções mostrando vantagens e desvantagens principais de cada exame**

| Método | Vantagens   | Desvantagens  |
|--------|---|---|
| MLPA   | -Detecta pequenos rearranjos<br>-Possível estudo de regiões com mais de 40 sondas regiões | -Não detecta perda de heterozigose.<br>-Limitações para detecção de mosaicismo, estudo da |

|                  |   |  |
|------------------|---|--|
|                  | <p>específica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Alta capacidade de transferência de dados</li> <li>-Baixo custo</li> </ul>  | <p>heterogeneidade tumoral ou contaminação por células</p>   |
| FISH             | <ul style="list-style-type: none"> <li>-detecta rearranjos balanceados, mosaicismo, heterogeneidade tumoral</li> <li>- permite quantificar múltiplas cópias</li> </ul>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- não detecta perda de heterozigose- não detecta rearranjos menores (deleções &lt;100kb ou duplicações &gt;500kb)</li> <li>-limitação quanto ao número de sondas específicas</li> </ul>                 |
| PCR-quantitativo | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Detecta pequenos rearranjo e eventualmente mutações pontuais</li> <li>-pode quantificar número de cópias</li> <li>-baixo custo</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- A otimização e eficácia do teste é uma preocupação</li> <li>- número limitado de sondas</li> <li>- limitação para estudo de mosaicismo, heterogeneidade tumoral e contaminação por células</li> </ul> |
| Southern Blot    | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Detecta pequenos rearranjos</li> <li>-Detecta mosaicismo</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não detecta perda de heterozigose</li> <li>- não quantitativo</li> <li>- alto custo</li> <li>- pouca capacidade para armazenamento de dados</li> </ul>  |
| CGH- array       | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Detecta rearranjos muito pequenos</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- limitação para estudo de perda de</li> </ul>  |

|           |   |   |
|-----------|---|---|
|           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- alta capacidade para sondas em todo genoma</li> <li>-baixo custo por dados</li> </ul>  | <p>heterozigosidade</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- equipamentos de alto custo</li> <li>Não detecta mosaicismos</li> <li>Exige equipe com alta “expertise”.</li> </ul> |
| SNP array | <ul style="list-style-type: none"> <li>- sem limitação para estudo de perda de heterozigosidade</li> <li>- alta capacidade para sondas em todo genoma</li> <li>- baixo custo</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não detecta pequenos rearranjos (&lt; 100kb)</li> <li>- baixa capacidade para armazenamento de dados.</li> </ul>                           |

Fonte: Stuppia L, et al 2012

### **1.2) O MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) como opção de teste genético para pacientes com DI e/ou AGD**

Interesse importante tem se voltado para o MLPA nos últimos anos pela sua capacidade de detectar deleções e duplicações no DNA e mesmo pela utilidade como teste confirmatório para validação de outras técnicas como o próprio a-CGH (STUPIA et al., 2012). Essa técnica permite a análise de mais de 50 regiões do DNA sonda-específicas em uma única reação por PCR-*multiplex*. Atualmente, é uma técnica amplamente utilizada em laboratórios ao redor do mundo e disponível comercialmente pelo fabricante MRC-Holland® (AHN et al, 2007; STUPPIA et al., 2012). Muitos “kits” foram desenvolvidos para diagnóstico de inúmeras doenças genéticas: doenças neuromusculares, distrofia musculares análise de genes específicos, diagnóstico pré-natal, estudo

de metilação, estudo de mutações somáticas e germinativas para câncer (MRC-HOLLAND®;STUPPIA et al.,2012).

Uma pesquisa no *Pubmed* utilizando a palavra “MLPA” lista 13115 publicações correlacionadas à essa técnica. Nos últimos cinco anos, 5523 foram listadas e 9368, nos últimos 10 anos. Ainda, do total de publicações, 9633 são artigos voltados para estudos em humanos.

Jeheeat al., 2011 promoveu na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo um estudo com o objetivo de analisar o MLPA como ferramenta diagnóstica em pacientes com deficiência intelectual e anomalias congênitas. Foram rastreados 261 pacientes com kits específicos de MLPA para regiões subteloméricas e intersticiais além da utilização da técnica de estudo genômico por “microarray”, neste caso, o SNP-array. O estudo comparou a taxa de detecção a partir da combinação de diferentes métodos: cariótipo isolado; cariótipo mais estudo por MLPA; cariótipo mais estudo por “microarray”. Os resultados mostraram uma taxa de detecção total de alterações patogênicas de 21,8% para alterações consideradas patogênicas. A taxa de detecção de anormalidades também identificadas em cariótipo convencional representou 6,9%, a taxa de detecção do cariótipo com MLPA foi de 19,4%, enquanto que a taxa de detecção com a associação com SNP-array chegou a 25,9% (incluindo mutações consideradas não causais). O estudo apontou o MLPA como um teste de valor importante para países ou serviços onde os recursos técnicos e financeiros são escassos e aumentaria consideravelmente a taxa de diagnóstico molecular.

### **1.3) A técnica de MLPA**

Os princípios da técnica se baseiam em um ensaio de PCR-*multiplex* com múltiplas sondas para regiões específicas do DNA, geralmente exons de genes de interesse, para avaliar o número de cópias relativa a cada sequência de DNA. Cada sonda é composta de duas “meia-sondas” (uma 5´ e uma 3´) que consistem de uma sequência alvo ou específica e uma sequência homologa a um par de *primers* universal, o que permite a amplificação simultânea de todas as sondas em uma reação PCR *multiplex* (STUPIA L et al.,2012). Além disso,

cada “meia-sonda” contém uma sequência específica que permite diferenciar o produto em tamanhos diferentes o suficiente para o processo de separação dos produtos amplificados durante a fase de eletroforese. A reação do MLPA, portanto, pode ser dividida em cinco passos: (FIGURA 2)

1º) desnaturação do DNA seguido de hibridização pelas sondas

2º) Reação de ligação

3º) Amplificação por PCR

4º) separação dos produtos por eletroforese

5º) análise de dados

No primeiro passo o DNA é desnaturado e colocado para reagir com o “mix” das sondas do KIT de MLPA. As duas “meia-sondas” são capazes de reconhecer a sequência DNA específica. Apenas na presença de uma combinação perfeita entre a sonda e o DNA, sem lacunas, é possível dar início ao processo de hibridização e amplificação. Em seguida as “meia-sondas” são ligadas pela enzima ligase, formando um único fragmento. A amplificação por PCR é realizada utilizando pares de “primers” e um deles é marcado por fluorescência. Tendo em vista que apenas as sondas ligadas são amplificadas durante a reação de PCR, o número de produtos dessas sondas ligadas é representado, portanto, pelo número de sequências alvo na amostra. O próximo passo é a separação dos produtos da PCR pelos diferentes tamanhos dos mesmos por eletroforese capilar.

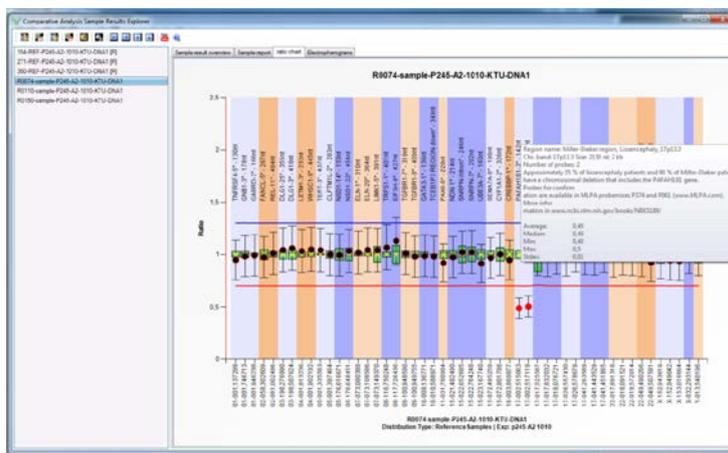
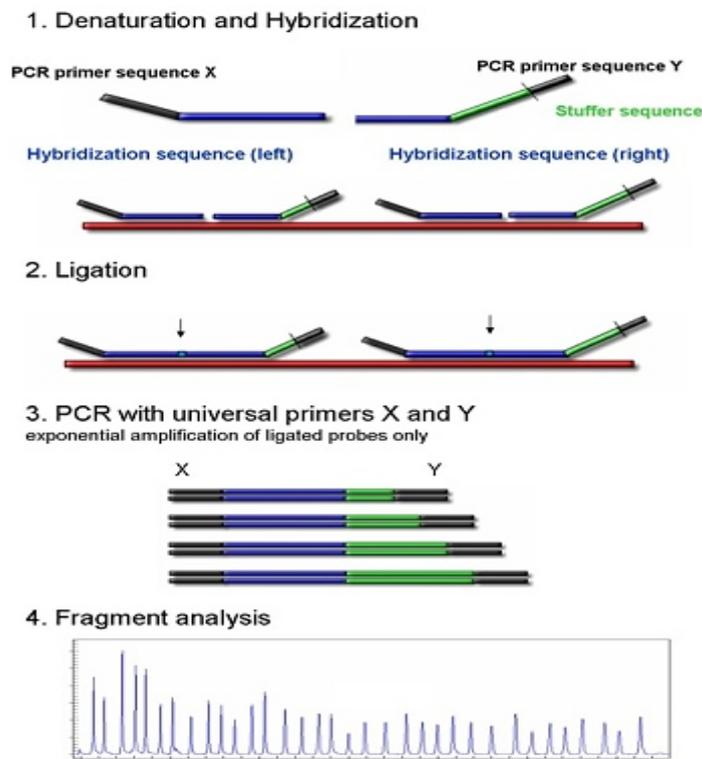
Já a análise dos dados é feita através da interpretação da captação da fluorescência baseado no estudo da altura dos picos ou áreas que a fluorescência dos produtos de PCR forma comparadas a um DNA controle. Isso permite uma análise comparativa em relação ao controle. De uma forma simplificada, interpreta-se quanto de DNA da sequência alvo existe a mais ou a menos em relação ao controle.

Como a qualidade da reação é um fator importante pra garantir dados confiáveis para análise, o controle do processo é realizado e garantido pela

presença de picos que devem ser gerados na análise de dados durante a reação e funcionam como controles. Eles fornecem informações sobre a eficiência da amplificação e se a quantidade de DNA foi utilizada corretamente para permitir uma reação de forma adequada. Um ponto crucial no MLPA é que a reação não ocorre pela sequência de DNA alvo em si amplificada, mas sim pela sondas que foram ligadas.

Outro ponto importante para uso do MLPA como teste genético para diagnóstico de microdeleções/microduplicações é a interpretação dos resultados. Uma deleção em homozigose pode ser, claramente, evidenciada pela ausência de picos específicos para o respectivo gene alvo, em presença de amplificação normal de sondas controle. Por outro lado, deleções em heterozigose, duplicações ou outros tipos de CNV's produzem uma altura diferente e/ou uma área relativa a esses picos, se comparado aquelas produzidas por alterações em homozigose. Essas variações podem alterar entre sondas para um mesmo gene ou entre amostras diferentes para um mesmo teste. Em virtude disso, os programas para análise de dados devem ser desenvolvidos e reformulados para aprimorar a interpretação desses resultados. Dentre eles o mais utilizado é o Coffalyser, um programa baseado em análise de dados por Excel. Atualmente, existem outros programas além deste para análise de dados do MLPA (STUPPIA et al.,2012).

## FIGURA 2: Etapas do processo de MLPA



**FIGURA 2** - Legenda: 1) Desnaturação do DNA e hibridização pelas sondas do MLPA 2) reação de ligação 3) reação por PCR 4) separação dos produtos de amplificação por eletroforese e 5) análise de dados. Fonte: MRC-Holland® - [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)

## **2) A EXPERIÊNCIA DO USO DO MLPA NA UFMG**

O laboratório de Neuropsicologia do Desenvolvimento, do Departamento de Psicologia, da Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas (FAFICH) da UFMG em conjunto com o Laboratório de Genética Humana e Médica, do Departamento de Biologia Geral, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG desenvolveu a Pesquisa intitulada “Avaliação de estratégia de diagnóstico neuropsicológico e genético-molecular dos transtornos de desenvolvimento cognitivo”. O objetivo dessa pesquisa é desenvolver e avaliar ferramentas para o diagnóstico de paciente em diferentes idades com transtorno cognitivo, investigando, inclusive, causas genéticas. Os pesquisadores responsáveis são: Prof Dr. Vitor Gerald Haase e Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho (ANEXO 1)

Em colaboração com a pesquisa acima citada foi elaborado o estudo que deu origem a esta dissertação.

### **2.1 ) Objetivos**

#### **Objetivo Principal**

Avaliar o impacto do uso do MLPA no Serviço Especial de Genética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC UFMG) e no aconselhamento genético dos pacientes atendidos

#### **Objetivos secundários:**

- Avaliar a correspondência clínico-laboratorial dos casos POSITIVOS
- Contribuir para o conhecimento dos fenótipos de microdeleções intersticiais e subteloméricas
- Identificar novos casos de microdeleções e duplicações cromossômicas, ainda não diagnosticados pelo Serviço Especial de Genética do HC UFMG

- Promover o aconselhamento genético mais direcionado e voltado para um diagnóstico específico, quando possível.

## **2.2) Aprovação pelo Comitê de Ética**

Este projeto é parte do projeto de pesquisa: “Avaliação de Estratégia de Diagnóstico Neuropsicológico e Genético – Molecular dos Transtornos do Desenvolvimento Cognitivo (Retardo Mental)” e foi aprovada pelo COEP, comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer número ETIC 0091.0.203.000-10).

### **3) MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1) Pacientes**

Tratou-se de um estudo prospectivo que incluiu pacientes avaliados pelos médicos geneticistas do Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da UFMG no período de outubro de 2012 a outubro de 2015.

Para participação na pesquisa foram utilizados critérios clínicos ao longo da rotina de avaliação de pacientes do ambulatório que apresentavam DI e/ou AGD com distúrbios:

- pacientes com distúrbios múltiplos com cariótipo normal sem diagnóstico definido.
- pacientes com fenótipos sugestivos de apresentar uma síndrome genética, mas sem uma suspeita diagnóstica específica.
- pacientes com suspeita de uma síndrome específica cujo teste oferecia cobertura para diagnóstico da síndrome suspeitada

#### **3.2) Coleta das amostras**

Os pacientes que preenchiam os critérios clínicos foram agendados para comparecer ao serviço em um dia específico no qual foi realizado esclarecimento sobre a pesquisa, foi lido e explicado o termo de consentimento livre e esclarecido e, em seguida, aqueles que concordaram e assinaram o TCLE foram acompanhados ao laboratório Central do Hospital das Clínicas onde foi colhido sangue periférico por profissionais treinados do próprio laboratório. O sangue foi armazenado em tubo próprio com EDTA e transportados para o Laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG onde os testes foram realizados.

### **3.3) Análise dos prontuários dos pacientes com resultados anormais.**

Para estudo dos casos, os dados clínicos dos pacientes foram coletados através da revisão dos prontuários do Serviço Especial de Genética Médica do HC/UFMG.

### **3.4) MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification**

O principal teste genético utilizado para a pesquisa foi o MLPA. O teste foi validado, padronizado e realizado pelo Laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os kits utilizados foram selecionados para o estudo das principais regiões de microrrearranjos intersticiais e subteloméricas do genoma humano associadas às síndromes genéticas mais comuns descritas nessas regiões.

Três diferentes Kits de MLPA foram utilizados e são identificados de acordo com a seguinte nomenclatura do fabricante:

- SALSA MLPA P070-B3 e SALSA MLPA P036-E2: para as principais regiões cromossômicas subteloméricas . (FIGURAS 2 e 3)

Para confirmar os resultados positivos utilizando o KIT P070-B3, o KIT de MLPASALSA MLPA P036-E2 foi utilizado.

- SALSA MLPA P245 B1– para as síndromes mais comuns de microdeleções intersticiais; síndrome de Prader-Willi/Angelman, Williams, Velocardiofacial/Di George, Cri du Chat, Sotos, Smith Magenis e outras. Esse teste foi realizado em todos os pacientes com ou sem suspeita das síndromes associadas às regiões de cobertura. (FIGURA 4)

As figuras 3,4 e 5 mostram as regiões e os genes de cobertura dos testes para os KITS utilizados durante a pesquisa.

**Table 1. SALSA MLPA P070-B3 Subtelomeres Mix 2B probemix**

| Length (nt) | Chromosomal position  | Gene detected | SALSA MLPA probe | MapView build 36 position |
|-------------|---|---------------|------------------|---------------------------|
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA                      |               |                  |                           |
| 88-92-96    | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation (autosomal) |               |                  |                           |
| 100         | X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene ; X-111.95)                              |               |                  |                           |
| 105         | Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene ; Y-013.98)                               |               |                  |                           |
| 121 *       | Y-fragment: Specific for the Y chromosome (ZFY gene ; Y-002.89)                               |               |                  |                           |
| 132         | 1q  | SH3BP5L       | 04084-L03605     | 01-247.08                 |
| 139         | 2q  | ATG4B         | 02781-L03168     | 02-242.25                 |
| 145         | 3q  | KIAA0226      | 02690-L02842     | 03-198.88                 |
| 152         | 4q  | FRG1          | 02691-L02843     | 04-191.10                 |
| 160         | 5q  | GNB2L1        | 02790-L02232     | 05-180.60                 |
| 166         | 6q  | TBP           | 02694-L02844     | 06-170.71                 |
| 172         | 7q  | VIPR2         | 02793-L03167     | 07-158.63                 |
| 179 ±       | 8q  | RECQL4        | 02695-L00610     | 08-145.71                 |
| 186         | 9q  | EHMT1         | 02792-L02846     | 09-139.78                 |
| 193         | 10q   | ECHS1         | 02696-L02847     | 10-135.03                 |
| 202         | 11q   | IGSF9B        | 02697-L02848     | 11-133.29                 |
| 211         | 12q   | ZNF10         | 02686-L02849     | 12-132.24                 |
| 218         | 13q   | CDC16         | 02698-L00753     | 13-114.03                 |
| 226         | 14q   | MTA1          | 02699-L02850     | 14-104.99                 |
| 233 ¥       | 15q   | TM2D3         | 18224-L23503     | 15-100.01                 |
| 241         | 16q   | GAS8          | 02702-L00734     | 16-088.64                 |
| 250         | 17q   | SECTM1        | 02703-L03169     | 17-077.87                 |
| 258         | 18q   | CTDP1         | 02704-L03607     | 18-075.58                 |
| 265 ±       | 19q   | CHMP2A        | 02705-L02853     | 19-063.76                 |
| 274         | 20q   | UCKL1         | 02706-L00642     | 20-062.05                 |
| 281         | 21q   | S100B         | 02587-L02854     | 21-046.85                 |
| 290 ±       | 22q   | ARSA          | 02707-L00661     | 22-049.41                 |
| 298         | X/Yq (PAR2)   | VAMP7         | 02708-L02855     | X-154.83 + Y-057.68 (PAR  |
| 306         | 1p  | TNFRSF18      | 02270-L01762     | 01-001.13                 |
| 315         | 2p  | ACP1          | 02709-L02856     | 02-000.27                 |
| 323         | 3p  | CHL1          | 02896-L02363     | 03-000.34                 |
| 329         | 4p  | PIGG          | 14440-L16146     | 04-000.51                 |
| 337         | 5p  | CCDC127       | 02791-L02233     | 05-000.26                 |
| 346         | 6p  | IRF4          | 04077-L03462     | 06-000.34                 |
| 355         | 7p  | SUN1          | 02780-L02857     | 07-000.84                 |
| 362         | 8p  | FBXO25        | 02715-L00973     | 08-000.40                 |
| 370         | 9p  | DOCK8         | 02716-L00688     | 09-000.38                 |
| 379         | 10p   | ZMYND11       | 05180-L16343     | 10-000.22                 |
| 387         | 11p   | BET1L         | 02784-L02226     | 11-000.20                 |
| 393         | 12p   | KDM5A         | 02787-L02229     | 12-000.29                 |
| 402 + ± ¥   | "13p"   | PSPC1         | 02717-L27468     | 13-019.25 (Acrocentric)   |
| 409 + ¥     | "14p"   | PARP2         | 02718-L27469     | 14-019.90 (Acrocentric)   |
| 418 + ±     | "15p"   | NDN           | 04026-L01542     | 15-021.48 (Acrocentric)   |
| 427         | 16p   | DECR2         | 02720-L00648     | 16-000.40                 |
| 436         | 17p   | RPH3AL        | 04081-L03465     | 17-000.18                 |
| 444         | 18p   | THOC1         | 02789-L02231     | 18-000.20                 |
| 451 ¥       | 19p   | PPAP2C        | 03501-L23504     | 19-000.23                 |
| 459         | 20p   | ZCCHC3        | 02723-L00641     | 20-000.23                 |
| 466 +       | "21p"   | HSPA13        | 02724-L00334     | 21-014.68 (Acrocentric)   |
| 479 +       | "22p"   | IL17RA        | 02725-L16344     | 22-015.96 (Acrocentric)   |
| 490 ¥       | X/Yp (PAR1)   | SHOX          | 03714-L27631     | X/Y-000.52 (PAR region)   |

\* New in version B3 (from lot B3-0714 onwards).

¥ Changed in version B3 (lot B3-0714 onwards). Small change in length, no change in sequence detected.

+ The 13, 14, 15, 21 & 22 "p" probes in fact target the q arm, as these chromosomes are acrocentric.

± This probe is located within, or close to, a CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to the presence of salt in the sample DNA or due to the presence of the CpG island.

Fonte: [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)

**Figura 3:** Tabela com descrição do produto do kit SALSA MLPA 070-B3 utilizado como teste para estudo das regiões subteloiméricas. A descrição nas três primeiras colunas, da esquerda para a direita, demonstra o tamanho da região, a posição no cromossomo, seus respectivos genes alvo para detecção de microdeleções/duplicações.

**Table 1. SALSA MLPA P036-E2 Subtelomeres Mix 1 probemix**

| Length (nt) | Chromosomal position  | Gene detected      | SALSA MLPA probe | MapView build 36 position             |
|-------------|---|--------------------|------------------|---------------------------------------|
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity: only visible with less than 100 ng sample DNA          |                    |                  |                                       |
| 88-92-96    | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation |                    |                  |                                       |
| 100         | X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene)                             |                    |                  |                                       |
| 105         | Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene)                              |                    |                  |                                       |
| 118         | Y-fragment: Specific for the Y chromosome (ZFY gene)                              |                    |                  |                                       |
| 130 «       | 1p  | TNFRSF4            | 02269-L01761     | 01-001.14                             |
| 136         | 2p  | ACP1               | 02274-L08758     | 02-000.25                             |
| 142         | 3p  | CHL1               | 01721-L01329     | 03-000.34                             |
| 151         | 4p  | PIGG (FLJ20265)    | 02005-L02047     | 04-000.50                             |
| 158         | 5p  | PDCD6              | 01723-L01327     | 05-000.37                             |
| 166         | 6p  | IRF4               | 01724-L02048     | 06-000.34                             |
| 172         | 7p  | ADAP1 (CENTA1)     | 02275-L02049     | 07-000.93                             |
| 179         | 8p  | FBXO25             | 02397-L01845     | 08-000.40                             |
| 186         | 9p  | DMRT1              | 01727-L02050     | 09-000.84                             |
| 193         | 10p   | DIP2C (KIAA0934)   | 02277-L01768     | 10-000.48                             |
| 202         | 11p   | RIC8A (RIC-8)      | 03315-L02733     | 11-000.20                             |
| 208 «       | 12p   | SLC6A12            | 02276-L01767     | 12-000.17                             |
| 219 + «     | 13q-cen   | PSPC1              | 02399-L01847     | 13-019.24 (Acrocentric chromosome)    |
| 227 +       | 14q-cen   | CCNB1IP1 (HEI10)   | 01732-L01318     | 14-019.86 (Acrocentric chromosome)    |
| 235 +       | 15q-cen   | MKRN3              | 07291-L08858     | 15-021.36 (Acrocentric chromosome)    |
| 242         | 16p   | POLR3K             | 01734-L01316     | 16-000.04                             |
| 250         | 17p   | RPH3AL             | 01735-L01315     | 17-000.17                             |
| 258         | 18p   | USP14              | 01736-L02051     | 18-000.19                             |
| 265 «       | 19p   | CDC34              | 01737-L01313     | 19-000.49                             |
| 274         | 20p   | SOX12              | 02396-L01844     | 20-000.26                             |
| 283 ¥ +     | 21q-cen   | RBM11              | 18223-L23852     | 21-014.51 (Acrocentric chromosome)    |
| 289 +       | 22q-cen   | BID                | 01740-L01310     | 22-016.61 (Acrocentric chromosome)    |
| 298         | Xp/Yp (PAR1)  | SHOX               | 01148-L01331     | X/Y-000.52 (PAR1 region)              |
| 307         | 1q  | SH3BP5L (KIAA1720) | 02392-L02149     | 01-247.08 (0.2 Mb from telomere)      |
| 313         | 2q  | CAPN10             | 01742-L01308     | 02-241.18 (1.6 Mb from telomere)      |
| 322         | 3q  | BDH1               | 02013-L02052     | 03-198.76 (0.7 Mb from telomere)      |
| 330         | 4q  | TRIML2             | 12050-L11446     | 04-189.26 (2.0 Mb from telomere)      |
| 337         | 5q  | GNB2L1             | 03319-L02737     | 05-180.60 (0.2 Mb from telomere)      |
| 346         | 6q  | PSMB1              | 01746-L01304     | 06-170.69 (0.5 Mb from telomere)      |
| 355         | 7q  | VIPR2              | 01747-L01303     | 07-158.60 (0.3 Mb from telomere)      |
| 361         | 8q  | ZC3H3 (KIAA0150)   | 01748-L01302     | 08-144.69 (1.6 Mb from telomere)      |
| 372         | 9q  | EHMT1              | 08205-L08170     | 09-139.83 (0.2 Mb from telomere)      |
| 379         | 10q   | PAOX (PAO)         | 09142-L09953     | 10-135.05 (0.2 Mb from telomere)      |
| 386         | 11q   | NCAPD3 (KIAA0056)  | 01751-L01299     | 11-133.60 (1.2 Mb from telomere)      |
| 395         | 12q   | ZNF10              | 02687-L02154     | 12-132.24 (0.2 Mb from telomere)      |
| 402         | 13q   | F7                 | 01753-L01297     | 13-112.82 (1.3 Mb from telomere)      |
| 411 «       | 14q   | MTA1               | 02778-L02201     | 14-105.00 (1.3 Mb from telomere)      |
| 418 «       | 15q   | ALDH1A3            | 01755-L01295     | 15-099.26 (1.0 Mb from telomere)      |
| 426         | 16q   | GAS8 (GAS11)       | 03201-L02669     | 16-088.63 (0.2 Mb from telomere)      |
| 434         | 17q   | TBCD               | 01757-L01293     | 17-078.45 (0.5 Mb from telomere)      |
| 441         | 18q   | RBFA (C18orf22)    | 01758-L01292     | 18-075.90 (0.2 Mb from telomere)      |
| 450 «       | 19q   | CHMP2A (BC-2)      | 09143-L10626     | 19-063.75 (0.9 Mb from telomere)      |
| 458 «       | 20q   | OPRL1              | 02688-L02884     | 20-062.19 (0.2 Mb from telomere)      |
| 466         | 21q   | PRMT2 (HMT1)       | 02586-L02059     | 21-046.89 (0.1 Mb from telomere)      |
| 475         | 22q   | RABL2B             | 01762-L08761     | 22-049.55 (0.1 Mb from telomere)      |
| 483         | Xq/Yq (PAR2)  | VAMP7 (SYBL1)      | 01763-L02150     | X/Y-154.78 (PAR2; 0.1 Mb from telom.) |

¥ Small change in length in version E2. No change in sequence detected.

+ The 13, 14, 15, 21 & 22 q-cen probes target the q arm close to the centromer (acrocentric chromosomes).

« This probe is located within, or close to, a very strong CpG island. A low signal of this probe can be due to incomplete sample DNA denaturation, e.g. due to presence of salt in the sample DNA.

Complete probe sequences are available on request: [info@mlpa.com](mailto:info@mlpa.com).

Fonte: [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)

**Figura 4:** tabela com descrição do produto do kit SALSA MLPA 036-E2 utilizado como teste para estudo das regiões subteloéricas. A descrição demonstra nas três primeiras colunas, da esquerda para direita, o tamanho da região, a posição no cromossomo, seus respectivos genes alvo para detecção de microdeleções/duplicações.

**Table 1. SALSA MLPA P245-B1 Microdeletion-1 probemix**

| Length (nt) | SALSA MLPA probe  | Chromosomal position | Syndrome                               |
|-------------|---|----------------------|--|
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA          |                      |  |
| 88-92-96    | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation |                      |  |
| 100         | X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)             |                      |  |
| 105         | Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)             |                      |  |
| 118 *       | Y-fragment S0135-L16766: Specific for the Y chromosome                            |                      |  |
| 130 ±       | <b>TNFRSF4</b> probe 02269-L01761   | 1p36.33              | 1p36 deletion syndrome                 |
| 136         | <b>GATA3</b> probe 07632-L07317   | 10p14                | DiGeorge region 2 (10p)                |
| 142         | <b>PAFAH1B1</b> probe 04120-L03532  | 17p13.3              | Miller-Dieker syndrome                 |
| 148 †       | <b>MECP2</b> probe 09310-L13824   | <b>Xq28</b>          | RETT syndrome / Xq28 duplication       |
| 154 †       | <b>NSD1</b> probe 02595-L23366  | 5q35.3               | Sotos syndrome                         |
| 160 ± †     | <b>GABRD</b> probe 04690-L04068   | 1p36.33              | 1p36 deletion syndrome                 |
| 166 *       | <b>UBE3A</b> probe 10877-L11547   | 15q11.2              | Prader-Willi-Angelman syndrome         |
| 172 ±       | <b>CREBBP</b> probe 03087-L02487  | 16p13.3              | Rubinstein-Taybi gene                  |
| 178 †       | <b>GNB1</b> probe 02890-L02511  | 1p36.33              | 1p36 deletion syndrome                 |
| 184 *       | <b>MECP2</b> probe 15319-L17592   | <b>Xq28</b>          | RETT syndrome, Xq28 duplication        |
| 190 *       | <b>SEMA7A</b> probe 18316-L23369  | 15q24                | 15q24 microdeletion syndrome           |
| 196         | <b>CLDN5</b> probe 01218-L06270   | 22q11.21             | DiGeorge syndrome                      |
| 202 ± †     | <b>MECP2</b> probe 03409-L16570   | <b>Xq28</b>          | RETT syndrome, Xq28 duplication        |
| 208 ± †     | <b>GP1BB</b> probe 05464-L15184   | 22q11.21             | DiGeorge syndrome                      |
| 214 *       | <b>MBD5</b> probe 15311-L17110  | 2q23.1               | 2q23.1 microdeletion syndrome          |
| 220 *       | <b>PPIL2</b> probe 07530-L22697   | 22q11.21             | Distal 22q11 syndrome                  |
| 226 *       | <b>REL</b> probe 17474-L22693   | 2p16.1               | 2p16.1 microdeletion syndrome          |
| 232 ±       | <b>LETM1</b> probe 04190-L05920   | 4p16.3               | Wolf-Hirschhorn syndrome               |
| 238         | <b>PAFAH1B1</b> probe 16348-L22830  | 17p13.3              | Miller-Dieker syndrome / Lissencephaly |
| 244 *       | <b>SNRPN</b> probe 12178-L13826   | 15q11.2              | Prader-Willi-Angelman syndrome         |
| 252 *±      | <b>SHANK3</b> probe 12031-L13828  | 22q13.33             | Phelan-McDermid syndrome               |
| 260 *       | <b>NF1</b> probe 11732-L13830   | 17q11.2              | NF1 microdeletion syndrome             |
| 265 *±      | <b>RTDR1</b> probe 08484-L22698   | 22q11.22             | Distal 22q11 syndrome                  |
| 272 *       | <b>MAPT</b> probe 08365-L22699  | 17q21.31             | 17q21.31 microdeletion syndrome        |
| 278 †       | <b>LRRC48</b> probe 01452-L20745  | 17p11.2              | Smith-Magenis syndrome                 |
| 283 *       | <b>SEMA5A</b> probe 14265-L22700  | 5p15.31              | Cri du Chat syndrome                   |
| 292 *       | <b>DMD</b> probe 01411-L23371   | <b>Xp21.1</b>        | X chromosome copy number               |
| 300 †       | <b>SNRPN</b> probe 01318-L23196   | 15q11.2              | Prader-Willi-Angelman syndrome         |
| 307 ± †     | <b>LLGL1</b> probe 01453-L22689   | 17p11.2              | Smith-Magenis syndrome                 |
| 315 *       | <b>ELN</b> probe 16349-L22813   | 7q11.23              | Williams-Beuren syndrome               |
| 323 *       | <b>PTCH1</b> probe 03702-L22814   | 9q22.32              | 9q22.3 microdeletion syndrome          |
| 331 †       | <b>CYP1A1</b> probe 06811-L22815  | 15q24.1              | 15q24 microdeletion syndrome           |
| 339 *       | <b>NF1</b> probe 02507-L22694   | 17q11.2              | NF1 microdeletion syndrome             |
| 346 *       | <b>KANSL1</b> probe 18172-L22729  | 17q21.31             | 17q21.31 microdeletion syndrome        |
| 355         | <b>DLG1</b> probe 08395-L08249  | 3q29                 | 3q29 microdeletion syndrome            |
| 364         | <b>ELN</b> probe 01336-L00878   | 7q11.23              | Williams-Beuren syndrome               |
| 373 *       | <b>SNAP29</b> probe 16748-L19368  | 22q11.21             | DiGeorge syndrome                      |
| 382 *       | <b>RABL2B</b> probe 06734-L05558  | 22q13.33             | Phelan-McDermid syndrome               |
| 391 *       | <b>SATB2</b> probe 15315-L17114   | 2q33.1               | 2q33.1 microdeletion syndrome          |
| 401 ±       | <b>TRPS1</b> probe 03081-L07411   | 8q23.3               | Langer-Giedion syndrome                |
| 411 *       | <b>MBD5</b> probe 15313-L22691  | 2q23.1               | 2q23.1 microdeletion syndrome          |
| 422 ± †     | <b>DLG1</b> probe 08401-L15187  | 3q29                 | 3q29 microdeletion syndrome            |
| 429 *       | <b>EXT1</b> probe 15322-L17698  | 8q24.11              | Langer-Giedion syndrome                |
| 436 *       | <b>FANCC</b> probe 04460-L22816   | 9q22.32              | 9q22.3 microdeletion syndrome          |
| 445 †       | <b>TERT</b> probe 03761-L22817  | 5p15.33              | Cri du Chat syndrome                   |
| 454 *       | <b>WHSC1</b> probe 10633-L14379   | 4p16.3               | Wolf-Hirschhorn syndrome               |
| 462 †       | <b>NSD1</b> probe 02600-L15191  | 5q35.3               | Sotos syndrome                         |
| 471 *       | <b>RAI1</b> probe 11730-L15192  | 17p11.2              | Smith-Magenis syndrome                 |

| Length (nt) | SALSA MLPA probe                | Chromosomal position | Syndrome                      |
|-------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| 485 *±      | <b>SATB2</b> probe 15318-L19750 | 2q33.1               | 2q33.1 microdeletion syndrome |
| 499 *       | <b>PEX13</b> probe 09870-L15194 | 2p16.1               | 2p16.1 microdeletion syndrome |

**Fonte:** [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com)

**Figura 5:** tabela com descrição do produto do kit SALSA MLPA P245-B1 utilizado como teste para estudo das regiões intersticiais. A descrição demonstra nas colunas da esquerda para direita o tamanho da região, o gene correspondente à sonda, posição no cromossomo, e a correspondência com a síndrome genética de microdeleção ou duplicação.

Durante a pesquisa cinco testes utilizando a metodologia de a-CGH foram disponibilizados para o serviço através de uma parceria com o laboratório do Instituto Oswaldo Cruz pelo ICB/UFGM. Alguns pacientes foram selecionados para realização deste teste. Um dos critérios de escolha dos pacientes foi a confirmação dos achados do MLPA e aprimoramento do diagnóstico molecular para estudo do caso.

#### 4) RESULTADOS

No período de outubro de 2012 e outubro de 2015, um total de 325 amostras foram coletadas. Destas, 196 (60,3%) amostras eram de indivíduos do sexo masculino, 129 (39,7%), do sexo feminino. Esta dissertação se refere aos primeiros 199 (61,2%) pacientes estudados pelos kits de MLPA específicos para pesquisa de microdeleções subteloméricas e intersticiais. Quatro pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem anomalias cromossômicas no cariótipo pós-natal. Portanto 195 indivíduos participaram deste estudo, correspondendo a 60% da amostra total.

Dentre os 195 pacientes estudados em quatro não foi possível realizar um teste conclusivo. Três porque tiveram um padrão de gráfico inadequado para análise do resultado (controle da qualidade ruim) e em uma das amostras, o material extraído foi insuficiente. Dos 191 restantes o teste do MLPA revelou 29 exames positivo para microdeleções (15,2%). (QUADRO 4)

#### QUADRO 4: Descrição dos resultados encontrados do total de pacientes selecionados

| Descrição dos resultados dos pacientes selecionados | Número |
|---|--------|
| Resultados negativo                                 | 162    |
| Resultados alterados                                | 29     |
| Amostra inadequada                                  | 1      |
| Teste inconclusivo para resultado                   | 3      |
| Total de pacientes                                  | 195    |

Dentre as alterações encontradas, a deleção 22q11.2, região correspondente à síndrome Velocardiofacial foi a mais frequente e presente em seis (20,7%) dos casos alterados.

A deleção no gene SYBL1 foi a segunda mais frequente, e detectada pelo kit MLPA P070-B3 em três indivíduos (10,3% dos casos alterados). Em dois deles

foi possível confirmar o resultado por outro kit, o P036-E2. Em uma das amostras não foi possível confirmar o resultado por outros kits (QUADRO 5).

A deleção na região correspondente à síndrome de Williams, região 7q11.23, foi detectada em dois pacientes (6,9% dos casos alterados). Também a deleção subtelomérica 9q34.3 foi detectada em dois pacientes (6,9% dos casos alterados). Essa alteração é reconhecida como etiologia da reconhecida Síndrome de Klinefelter.

Já a deleção da região 15q11, associada às síndromes de Prader-Willi (SPW) e Angelman, foi detectada em uma amostra (3,4% dos casos alterados). Este paciente foi estudado já com a suspeita clínica de SPW.

Em outros dois pacientes (6,9%) foram encontradas duas alterações simultâneas: um paciente apresentou a deleção 5q35, na região do gene NSD1 associado à síndrome de Sotos. Ao ser realizada a confirmação do achado por aCGH foi detectada uma segunda alteração a qual não foi identificada no MLPA, uma duplicação em 11p15, região associada à síndrome de Beckwith-Wiedemann. Já outro paciente apresentava deleção 2q37.2 associada à duplicação 5p15.33.

**Quadro 5 – Resultados alterados e análise da confirmação por outro exame dos MLPAs ou a-CGH realizados no período de out/2012 a out/2015**

| <b>Nº da amostra</b> | <b>Sexo do paciente</b> | <b>MLPAkitP245-B1 (intersticial)</b> | <b>MLPA kitp070-B3 (subtelomérica)</b> | <b>Confirmado por outro exame</b> |
|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| 5508                 | M                       | -                                    | delSYBL1                               | Não*                              |
| 5511                 | M                       | 22q11.2                              | -                                      | Não*                              |
| 5569                 | M                       | -                                    | Dup8p23.3                              | Sim – MLPA kit P036-E2            |
| 5574                 | M                       | -                                    | Del9q34.3                              | Sim –MLPA kit P036-E2             |
| 5583                 | M                       | Del7q11.23                           |  | Não                               |
| 5585                 | M                       | Del7q11.23                           |  | Não                               |
| 5592                 | F                       | Del2q33.1                            |  | Sim – acgh                        |
| 5596                 | F                       | Del5q35.3                            | Del5q35                                | Sim – acgh<br>Del5q35 e 11p15     |
| 5597                 | F                       | -                                    | Del1q44                                | Sim<br>MLPA kit P036-E2           |
| 5599                 | M                       | -                                    | Del4q35                                | Não                               |
| 5604                 | M                       | Del22q11.2                           | -                                      | Não*                              |
| 5608                 | M                       | Del22q11.2<br>Del1p36.33             | -                                      | MLPA kit P064**                   |
| 5612                 | M                       | -                                    | Dup9p24.3                              | Não                               |
| 5613                 | M                       | -                                    | dup9p24.3                              | Não                               |
| 5625                 | F                       | -                                    | Del9q34.3                              | Sim<br>MLPAkit P036-E2            |
| 5630                 | F                       | Del15q11                             | Del15q11                               | Sim<br>MLPA kit P036-E2           |
| 5658                 | M                       | -                                    | dupSHOX                                | Sim<br>MLPA kit P036-E2           |
| 5675                 | M                       | -                                    | delSYBL1                               | Sim<br>MLPA P036-E2               |
| 5681                 | M                       | -                                    | Dup9p24.3<br>Del18p11.32               | Sim<br>MLPA kit P036-E2<br>acgh   |
| 5721                 | M                       | dupIMECP2/Xq28                       | -                                      | Não*                              |
| 5725                 | M                       | Del22q11.2                           | -                                      | Não*                              |

|      |   |            |                         |                         |
|------|---|------------|-------------------------|-------------------------|
| 5723 | F | -          | Del6p25-p23             | Sim<br>MLPA kit P036-E2 |
| 5728 | M | -          | delSYBL1                | Sim<br>MLPA kit P036-E2 |
| 5729 | M | Del22q11.2 | -                       | Não*                    |
| 5732 | F | -          | Del8p23.3               | Sim<br>MLPA kit P036-E2 |
| 5761 | F | -          | Del6q27                 | Sim<br>MLPA kit P036-E2 |
| 5766 | F | -          | Dup16q24.3              | Não                     |
| 5770 | M | Del22q11.2 | -                       | Não                     |
| 5780 | F | Dup5p15.33 | Dup5p15.33<br>Del2q37.2 | Sim<br>MLPA kit P036-E2 |

\* Os resultados positivos para o KIT P245-B1 que apresentavam correspondência para alguma região de algum dos kits P070-B3ou P036-E2, também foram testados por estes.

\*\*Para apenas este caso foi utilizado outro KIT (P064-MR1) para confirmação casos especificamente paradesse achados. Esse kit tem cobertura para a região 22q11.2.

## RELATO COMENTADO DOS CASOS

### 4.1) Síndrome Velocardiofacial com apresentações fenotípicas e genotípicas variadas

#### 4.1.1) Caso 5608 – Dupla Deleção, 22q11.2 e 1p36. – Relato de Caso

Caso apresentado no XXVI Congresso Brasileiro de Genética Médica em junho de 2014 no pôster: **Relato de caso: Paciente com síndrome velocardiofacial apresentado dupla deleção 22q11.2 e 1p36.**”(SALAZAR et al.,2013)

A paciente apresentava manifestações clínicas frequentes na Síndrome Velocardiofacial (SVCF) atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e evoluiu com deficiência intelectual importante e alterações comportamentais. Aos treze anos ainda era dependente para atividade da vida diária, como higiene pessoal. Ao exame morfológico, observou-se; assimetria facial, fronte curta, sobrancelhas esparsas em terço dista, orelhas pequenas, nariz proeminente com ponte elevada, base e columela alargadas, filtro nasolabial curto, lábios grosso, prognatismo leve, voz anasalada, restrição de extensão de cotovelos, tremor ao realizar movimentos finos de mãos. Aos seis meses de vida foi submetida à correção cirúrgica de comunicação entre câmaras cardíacas (CIA e CIV) e de canal arterial pérvio. Era filha adotiva e em histórico de familiares biológicos havia dados relevantes para alterações neurológicas, embora essas não fossem especificadas. (FOTO ABAIXO)



Fotos da paciente (caso 5608) aos 14 anos, apresentando assimetria facial, orelhas pequenas, nariz grande, lábios grossos, retrognatia.

Em função da suspeita de SVCF, foi realizada MLPA, com o kit SALSA MLPA p245-B1 (Fig. 3). O resultado confirmou a suspeita através das sondas deletadas CLDN5, GP1BB e SNAP29, localizadas entre LCR22-A e LCR22-C (Fig. 1). Além disto, foi observada a deleção da sonda GABRD localizada na região da Síndrome da deleção 1p36 (SD1p36) (Figura MLPA)

As síndromes velocardiofacial e de deleção 1p36 são duas entidades clínicas distintas, bem descritas na literatura. Neste caso, o fenótipo sugeria a síndrome velocardiofacial, o que levou ao estudo por MLPA, para confirmar o diagnóstico clínico. Foi um achado ocasional ter encontrado as duas deleções.

A observação da sonda deletada em 1p36.6 foi considerada e a paciente passou por mais uma avaliação clínica a fim de averiguar as manifestações típicas da SD1p36.6. Não observamos manifestações clínicas típicas da SD1p36. Entretanto, isto poderia ser explicado pela sobreposição fenotípica entre a SVCF e a SD1p36. Como a lista de manifestações clínicas da SVCF inclui mais de 180 achados, é comum encontrar superposições de sinais e sintomas com outras doenças. Assim, a presença das duas deleções simultaneamente não resultou em um terceiro fenótipo, distinto, sendo a SVCF o fenótipo predominante observado. .

#### **4.1.2) Casos 5604, 5725, 5770 – Del 22q11.2 – Síndrome velocardiofacial sem diagnóstico específico suspeito**

O exame molecular dos três casos seguintes revelou deleção na região 22q11.2. Entretanto, o fenótipo dos pacientes eram distintos e não típicos da síndrome velocardiofacial e assim, permaneciam sem uma suspeita diagnóstica específica.

Isto fortalece a concepção de que a síndrome velocardiofacial apresenta um fenótipo muito variável, o que nem sempre permite a suspeita clínica (ROBIN et al.,2005; HASSING et al.,2011).

Embora apresentem uma variabilidade clínica grande, a síndrome velocardiofacial apresenta um conjunto de sinais e sintomas mais frequentes que são pistas para o seu diagnóstico: cardiopatia congênita (74%), anormalidades de palato (69%), dimorfismos faciais, dificuldade de aprendizado (70 a 90%) e baixa imunidade (77%). A deleção 22q11.2 é a única causa genética associada à síndrome e a penetrância é de 100%. Isso que dizer que todos os indivíduos com a deleção manifestam a doença. Entretanto, sua variabilidade fenotípica é marcante (McDONALD-McGINNet al.,2013).

Nestes casos, os pacientes não apresentavam achados morfológicos que claramente direcionassem o diagnóstico sindrômico e, portanto, o resultado do teste teve um papel elucidativo para os médicos assistentes trabalharem a definição do fenótipo e a correlação genótipo-fenótipo. É importante salientar que nenhum dos pacientes apresentava cardiopatia congênita um dos sinais mais importantes para esta suspeita diagnóstica.

**Caso 5604** – Criança do sexo masculino que iniciou o acompanhamento no serviço aos 10 anos de idade, com quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, hipotonia, dificuldade escolar, obesidade, hipomímia facial e dimorfismos: fronte curta com baixa implantação de cabelos, sobrancelhas finas, prega epicantal bilateral, telecanto, ponte e dorso nasal alargados, filtro nasolabial curto e pouco marcado, lábio superior fino, orelhas hiperdobradas, pregas palmares transversais, genitália típica masculina sem alterações. Não

havia dados familiares relevantes, nem histórico de cardiopatia ou outras alterações clínicas relevantes. Por causa da hipomímia facial descrita, foi aventada a hipótese de Sequência de Moebius. Entretanto, após discussão e estudo do caso, o paciente permanecia sem um diagnóstico estabelecido.

**Caso 5725** – Também uma criança do sexo masculino, com 10 anos de idade, em primeira consulta no serviço de genética médica. Apresentava um quadro de baixa estatura, obesidade, hipotonia, dificuldade de aprendizado e dismorfismos: diminuição de distância bitemporal, olhos profundos, ponte e dorso nasal elevados, ponta nasal voltada para baixo (tipo adunco), incisivos centrais proeminentes, orelhas de implantação baixa, obesidade truncal, escroto em xale, criptorquidia direita, genu valgo, dedos das mãos com pontas afiladas, braquidactilia. Sem descrição de alteração cardíaca e sem dados familiares relevantes. Não havia diagnóstico sindrômico específico suspeitado.

**Caso 5770** - Criança do sexo masculino, iniciou acompanhamento no serviço de genética médica aos três anos de idade devido a atraso do DNPM associado a dismorfismos faciais, prematuridade e atraso do crescimento. Sem histórico familiar relevante para doenças genéticas. Ao exame morfológico apresentava, baixo peso, baixa estatura, microcefalia, turricefalia, implantação alta de cabelo na fronte, fendas palpebrais inclinadas para cima e curtas, ponte nasal alta, ponta do nariz deprimida, aletas nasais hipoplásicas, filtro nasolabial curto, lábios em “arco de cupido”, orelhas em abano, clinodactilia de quinto dedos das mãos, bolsa escrotal hipoplásica com testículos presentes e hérnia inguinal esquerda.

Com um ano de idade foi submetido a uma cirurgia para retirada de uma lesão cística que obstruía 80% da epiglote.

Ecocardiograma mostrou regurgitação tricúspide mínima sem outros achados relevantes, ultrassonografia de rins e vias urinárias normais e tomografia e ressonância de encéfalo com discreta hidrocefalia. Apresentava um quadro de plaquetopenia e seguia em acompanhamento hematológico. Avaliação oftalmológica com relato de estrabismo sem alterações em fundoscopia. Avaliação auditiva normal. Aos nove anos de idade, não havia um diagnóstico sindrômico específico.

#### **4.1.3) Caso 5511, 5729 - Deleção 22q11.2 com suspeita de Síndrome de Velocardiofacial**

Nestes dois casos, os pacientes apresentavam uma suspeita diagnóstica que foi confirmada pelo teste.

**Caso 5511** – Criança do sexo masculino que iniciou acompanhamento no serviço de genética médica aos dois anos e seis meses. Apresentou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, evoluiu com deficiência intelectual, tinha cardiopatia estrutural congênita (arco aórtico à direita), hipoacusia e dismorfismos: dolicolcefalia, estreitamento bitemporal, sutura metópica saliente, orelhas em abano, pregas epicantais, nariz pequeno com base alargada, filtro nasolabial longo e pouco marcado, palato alto e estreito. Aos três anos de idade foi solicitado pesquisa para a síndrome velocardiofacial (SVCF) pelo método FISH para exclusão diagnóstica. Entretanto, o teste foi negativo e, por isso, o paciente permaneceu sem diagnóstico até seis anos, quando o MLPA foi realizado e evidenciou-se a alteração. O teste mostrou as três sondas deletadas na região 22q11.2 com bom padrão das sondas controles. Esses resultados foram decisivos para o diagnóstico de SVCF.

**Caso 5729** - Tratava-se de criança do sexo masculino que iniciou o acompanhamento no serviço de genética com um ano e cinco meses devido a quadro de cardiopatia congênita, tetralogia de Falot, corrigida com 11 dias de vida. Também sem histórico familiar relevante, exceto por um abortamento espontâneo materno. Além da cardiopatia, apresentava fenda palatina e outros dismorfismos: microssomia, fronte ampla, fendas palpebrais inclinadas para cima, cianose de extremidades, fronte ampla, raiz nasal alta, ponta nasal voltada para baixo, columela curta, lábio da boca em arco de cupido, fenda palatina mediana, peito escavado, clinodactilia de quintos dedos e criptorquidia. Com um ano e sete meses apresentava leve atraso do DNPM.

Os achados são típicos e compatíveis com a síndrome de deleção 22q11.2. O diagnóstico foi suspeitado desde a primeira consulta e o teste confirmou a suspeita.

#### **4.2) Caso 5596– deleção 5q35 e duplicação 11p15 – Sobreposição de fenótipos entre Síndrome de Sotos e de Beckwith-Wiedman - Relato de Caso**

Relato de caso apresentado no XXVII Congresso Brasileiro de Genética Médica em junho de 2015 no pôster: “**Relato de caso: Sobreposição das síndromes de Beckwith-Wiedemann e Sotos em paciente com microdeleção em 5q35.3 e microduplicação em 11p15.5**” (VIANA et al.,2015)

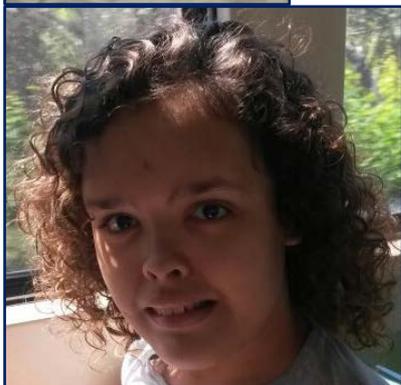
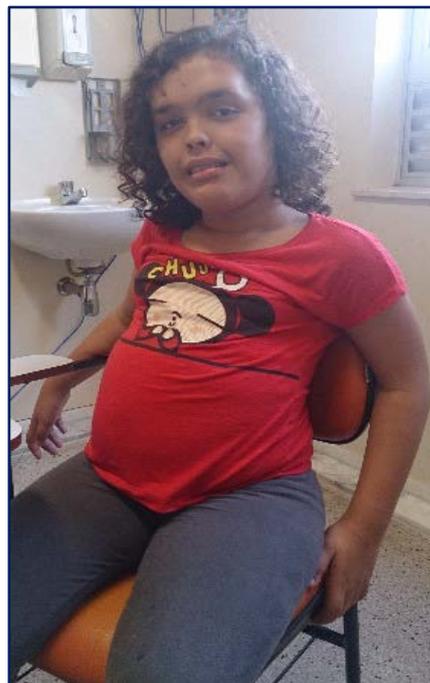
Paciente do sexo feminino, 10 anos e 5 meses. Genitores jovens, saudáveis, não consanguíneos. História familiar irrelevante. Relato de crescimento intra-uterino restrito. Nasceu de parto cesáreo, com 37 semanas de gestação, pesando 2450g (Percentil 10), medindo 47cm (P10-P50). Atraso grave no desenvolvimento, déficit intelectual, agitação e agressividade. Foram diagnosticadas comunicação interatrial e persistência do canal arterial e submetida à cirurgia corretiva. Exames complementares evidenciaram leucomalácia, hipoacusia de condução à direita e hepatomegalia discreta. Ao exame físico, foi possível observar: obesidade truncal (peso>P97), altura P3-P15, macrocrania e dismorfismos faciais (Fotos).

MLPA intersticial mostrou deleção na região 5q35.3, mais especificamente no gene *NSD1*. Já o kit subtelomérico mostrou deleção da sonda no gene *GNB2L*. O caso foi levado então para confirmação pelo método a-CGH que identificou uma deleção de cerca de 3,9 Mb na região 5q35.3 e duplicação de 559 kb em 11p15.5. As alterações observadas envolvem cerca de 56 e 28 genes, respectivamente.

A região 5q35.3 está relacionada à síndrome de Sotos, em que há haploinsuficiência do gene *NSD1* como resultado de vários mecanismos distintos. Já a região 11p15.5, considerada crítica da síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW), possui inúmeros genes reguladores do crescimento. A paciente apresenta algumas características correspondentes ao fenótipo de cada uma das síndromes (como visceromegalia, presente em BWS, e dismorfismos faciais semelhantes aos encontrados na Síndrome de

Sotos)(fotos). Entretanto, outras características não são explicadas por tais diagnósticos. A análise de outros genes presentes nas regiões alteradas pode ajudar a explicar as manifestações clínicas observadas.

O desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis tem levado a detecção de um número inesperadamente grande de rearranjos complexos. Nestes casos, a correlação clínico-molecular torna-se mais difícil. Por outro lado, a detecção de rearranjos complexos altera a investigação da família. Neste caso, o cariótipo normal da criança dispensaria o cariótipo dos pais. Na presença de um rearranjo complexo, a hipótese de translocação balanceada em um dos genitores deve ser cogitada e os cariótipos devem ser feitos.



Fotos : paciente aos 10 anos – corpo inteiro, mão e pés grandes e face semelhante à descrita na síndrome de Sotos.

#### **4.3) Caso 5592: Deleção 2q33.1 – Síndrome de Microdeleção 2q33.1: Relato de caso**

Trata-se de uma paciente acompanhada no serviço desde os primeiros anos de vida, atualmente com sete anos, sem diagnóstico específico e com importante atraso no DNPM e deficiência intelectual. A Síndrome de Microdeleção 2q33.1 é um síndrome rara com poucos casos descritos na literatura e os achados, além de comuns a algumas outras síndromes, assemelham-se ao fenótipo de displasia ectodérmica. Foram estudados os aspectos dentários desta síndrome por meio de avaliação odontológica. Este caso é descrito em detalhes no Artigo a ser submetido ao American Journal of Medical Genetics.: “Ectodermal dysplasia-like phenotype and 2q33.1 MICRODELETION SYNDROME: case report and literature review”, que segue anexo a este trabalho.

#### **4.4) Caso 5597 – Síndrome de microdeleção 1q44**

Trata-se de paciente do sexo feminino, sem história familiar de doenças genéticas ou malformações congênitas. Avaliada com um ano e três meses devido a atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e dismorfismos. Dentre estes, microcefalia com trigonocefalia e plagiocéfalia, pregas epicantais, cantos da boca inclinados para baixo, filtro longo e bem marcado, discreta retrognatia, fenda palatina associada à sequência de Pierre Robin, braquidactilia em dedos dos pés. A ressonância magnética de encéfalo mostrou discreta ventriculomegalia, sem significado patológico e a tomografia de crânio mostrou sinostose de sutura metópica e plagiocéfalia occipital. Sem outros achados dignos de nota.

O estudo por MLPA revelou alterações concordantes em dois Kits diferentes para regiões subtelomérica (kit SALSA MLPA P070-B3 e P036-E2), uma deleção correspondente à região 1q44.

Existem poucos casos de deleção terminal no braço longo do cromossomo 1 descritos na literatura (HYUN CHO et al.,2014).. Os pacientes com esta síndrome costumam apresentar microcefalia, face arredondada, fenda palpebral inclinada para baixo, pregas epicantais, orelhas de implantação baixa, lábios proeminentes e em “arco de cupido”, micrognatia, braquidactilia, cardiopatia congênita e anomalias genitais (variáveis e não presente em todos os pacientes descritos), deficiência intelectual moderada a grave e atraso do crescimento. Vinte e dois casos de pacientes com deleções envolvendo essa região cromossômica são descritos na literatura (HYUN CHO et al.,2014). Entretanto, os fenótipos descritos são variáveis, assim como o tamanho das deleções em cada caso. Mas os achados clínicos descritos no paciente apresentam semelhança e correspondência com os casos descritos na literatura.

Para abordagem clínica do caso, foi sugerido, avaliar a realização do aCGH para auxílio na confirmação do resultado. Este exame, no momento não é disponível no serviço e a criança segue em acompanhamento com hipótese diagnóstica de Síndrome demicrodeleção 1q44.

#### **4.5) Caso 5630 – Confirmação de diagnóstico clínico de Prader-Willi**

Neste caso, a criança do sexo feminino, era acompanhada pelo serviço desde os três anos de idade por atraso do DNPM e distúrbios. Por volta de sete anos foi levantada a hipótese de Síndrome de Prader-Willi e o resultado do teste possibilitou a confirmação por deleção 15q11 a qual foi confirmada por três kits de MLPA diferentes (SALSA P245-B1, P070-B3 e P036-E2).

Apresentava ao nascimento quadro de hipoatividade, hipotonia, episódios de hipoglicemia. Evoluiu com refluxo gastroesofágico, sucção débil, necessidade de gastrostomia. Manteve hipotonia quando criança e evoluiu com atraso do DNPM, dificuldade escolar, peso e altura dentro dos padrões da normalidade

mas com elevado índice de massa corpórea, alterações comportamentais como auto e heteroagressão e transtorno alimentar com hiperfagia. É acompanhada multidisciplinarmente por neurologista, nutricionista, fonoaudiólogo, terapeuta ocupacional, endocrinologista e fisioterapeuta. Sem dados familiares relevantes.

O quadro clínico é típico de síndrome de Prader-Willi e o teste confirmou a suspeita diagnóstica.

#### **4.6) Casos 5583 e 5585: Confirmação diagnóstica de Síndrome de Williams**

Em dois casos, os pacientes tinham suspeita diagnóstica de síndrome de Williams e o MLPA foi utilizado para confirmar este diagnóstico.

**Caso 5583** - a criança era do sexo masculino, iniciou o acompanhamento no serviço de genética aos dois anos e apresentava quadro de atraso importante do DNPM que evoluiu para DI. Frequentava escola especializada e desde os primeiros meses de vida foi necessário acompanhamento multidisciplinar para estímulo precoce (fonoaudiologia, fisioterapia, terapia ocupacional). Havia relato de um bebê agitado, com choro de difícil controle, sensível a barulho. Os dismorfismos descritos foram: voz rouca, perímetro cefálico normal, sobrancelhas esparsas, prega epicantal, ponte nasal deprimida, ponta do nariz arredondada, filtro pouco delimitado, lábios grossos, boca ampla, escápula alada, clinodactilia de quintos dedos. Não apresentava cardiopatia ou outras malformações maiores. A suspeita clínica foi levantada já na primeira consulta.

**Caso 5585** - tratava-se de uma criança que iniciou o acompanhamento no serviço de genética médica com um ano e um mês de idade e continuava sem suspeita diagnóstica até os quatro anos de idade. Apresentava um quadro de atraso do DNPM, déficit ponderal, doença do refluxo gastroesofágico, bossa frontal, olhos de implantação profunda, pregas epicantais, ponta nasal bulbosa, hipodesenvolvimento de narinas, microrretrognatia, dedos das mãos afilados, clinodactilia de 5º dedos. Apresentava também perda auditiva. Não havia relato de alterações cardiovasculares. Aos quatro anos e dois meses foi descrito um

comportamento amigável e após a reavaliação e rediscussão do caso, foi pensado em síndrome de Williams como hipótese diagnóstica. O teste de MLPA confirmou a deleção na região 7q11.23.

#### **4.7) Duplicação MECP2 – caso 5721**

Trata-se de criança, do sexo masculino, que iniciou a avaliação no serviço aos três anos de idade. Apresentava quadro de atraso grave do DNPM. Aos três anos apenas balbuciava e com cinco anos ainda não falava. Apresentava trigonocefalia, leve ptose palpebral, orelhas rodadas posteriormente, ponte nasal deprimida, narinas antevertidas, filtro nasolabial curto, lábio superior fino, clinodactilia de 5º dedos, poucas manchas café-com-leite em estereotipias. A ressonância magnética realizada com dois anos e dois meses mostrou pequenas imagens milimétricas de aspecto cístico na substância branca subcortical e peritrigonal bilateralmente. Eletroencefalograma mostrava-se alterado com desorganização das atividades de base.

O paciente evoluiu com grave deficiência intelectual sem diagnóstico sindrômico. Sua mãe era jovem, desejava saber riscos para filhos futuros e não fazia uso de métodos anticoncepcionais. Havia dados sugestivos de cardiopatia congênita em meia-irmã falecida em idade precoce, sem diagnóstico sindrômico. Os dados descritos no prontuário do serviço de genética sobre o óbito da meia irmã relatavam “choque cardiogênico e drenagem anômala de veias pulmonares”. Havia também história “sugestiva de deficiência intelectual” em mãe e avó materna, de acordo com heredograma e outros registros em prontuário.

O teste por MLPA evidenciou a duplicação (de três sondas) na região Xq28 correspondente ao gene MECP2. O teste não foi confirmado por outro KIT por MLPA, pois nos demais Kits disponíveis, não há cobertura para a região do gene MECP2.

A síndrome mais associada às alterações nessa região é a Síndrome de RETT. Entretanto, essa não é a única condição patológica relacionada à mutações em MECP2. Uma gama maior de fenótipos neurológicos estão associados a alterações neurológicas, o que fez agrupá-los em desordens associadas ao MECP2 (VAN ESCH,2011).As manifestações da duplicação em MECP2 são amplamente variáveis e incluem mulheres assintomáticas, homens com mutação e que manifestam um fenótipo semelhante ao da síndrome de RETT e outros tipos de desordens do neurodesenvolvimento (SIGNORINI et al.,2016).

A identificação causal da duplicação envolvendo o gene MECP2 com deficiência intelectual grave sindrômica em homens, foi descrita primeiramente por Van Esch (2011). O próprio Van Esch descreve a síndrome de duplicação MECP2 como um quadro associado à hipotonia precoce, atraso no DNPM resultando em uma DI de grave a profunda, com importante limitação da fala, alteração da marcha, epilepsia e espasticidade. Nesse estudo há descrição de pacientes que apresentam dismorfismos faciais, como baixa implantação de cabelo na frente, orelhas grandes, sinófris, fenda palpebral inclinada para baixo, estrabismo, úvula bífida. Também foram descritas,alterações estruturais no SNC como atrofia ventricular, atraso da mielinização, gliose difusa, ventrículomegalia.

O achado do teste e o quadro clínico do paciente sugere uma associação causal possível. Isso determinou um aconselhamento genético cauteloso, devido à variabilidade de manifestação fenotípica entre os indivíduos com a mutação, da história de possível DI familiar de origem materna e de tratar-se de uma mãe jovem sem contracepção.

#### **4.8) Caso 5732 – deleção 8p23.3 e exposição ao teratogênio Carbamazepina**

Paciente do sexo feminino que iniciou acompanhamento no serviço de genética aos três anos e dez meses de idade com quadro de atraso importante do DNPM; na ocasião, ainda não sentava e apenas balbuciava. Apresentava

dismorfismos, como cabelos esparsos com implantação alta, fendas palpebrais inclinadas para cima, corectopia, filtro nasolabial curto, orelhas rodadas posteriormente, dentes displásicos, pescoço curto, pregas siemiescas, sindactilia entre segundo e terceiro artelhos. Tinha cardiopatia congênita caracterizada por atresia de tricúspide, hipoplasia de ventrículo direito, comunicação interatrial e interventricular. Apresentava também agenesia de corpo caloso e de septo pelúcido. Na história familiar a mãe apresentava epilepsia e fez uso de 200mg/dia de carbamazepina durante toda a gestação (fator D de risco).

A deleção 8p algumas vezes visível ao microscópio, está associada com atraso no DNPM, dismorfismos faciais leves, defeitos cardíacos e alterações comportamentais (WU, B.L. et al, 1996). A microdeleção subtelomérica 8p23.3 é rara e com poucos casos descritos na literatura (DE VRIES et al., 2001). Wu, Y. et al., 2010 descreveu uma paciente com uma deleção de 2.06 Mb em 8p23.3. A paciente, de um ano de idade, apresentava atraso no desenvolvimento, microcefalia e dismorfismos faciais leves. Não havia relato de malformações congênicas maiores. O autor considera a região subtelomérica 8p23.3 como sendo a região crítica associada à AGD e DI. Essa região contém 28 genes e 12 são conhecidos por apresentarem expressão no cérebro humano.

A deleção 8p23.3 identificada no paciente (caso 5732) foi confirmada por dois KITS diferentes com cobertura para a mesma região.

Outro fator importante a ser considerado neste caso foi a associação do anticonvulsivante carbamazepina, classificada como fator de risco D para anomalias congênicas (existem evidências positivas para risco fetal humano, mas os benefícios do uso na mulher grávida pode ser aceitável, apesar dos riscos, se a droga for necessária em uma situação que ameace a vida ou em caso de doença grave para as quais drogas mais seguras não possa ser usadas ou não sejam efetivas). Esta droga se associa a diversas malformações maiores e menores, incluindo defeitos de fechamento do tubo neural, anomalias cardiovasculares, do trato urinário e fenda palatina. Há sugestão de uma síndrome associada a carbamazepina consistindo de defeitos craniofaciais

menores, hipoplasia de unhas e atraso no desenvolvimento. No entanto este último é controverso (EWIS et al.,2001; KINI et al.,2006; HOLMES et al, 2001).

Neste caso pode ter havido uma interação de fatores etiológicos determinantes para o fenótipo complexo da paciente, a microdeleção e a exposição ao teratígeno. No aconselhamento genético deve ser levado em conta os dois fatores.

#### **4.9) Casos 5574 e 5625 - Deleção 9q34.3 - Síndrome de Kleefstra em um paciente com suspeita de síndrome de Angelman e outro com suspeita de síndrome de Robinow**

**Caso 5574** - Paciente do sexo masculino, iniciou acompanhamento com um ano e dez meses. Apresentava um quadro de atraso do DNPM que evoluiu para deficiência intelectual, hipotonia e marcha com base alargada. O exame morfológico mostrava braquimicrocefalia, bossa frontal, estrabismo, orelhas em abano, sulco naso-labial pouco pronunciado, prognatismo bilateral, clinodactilia de quintos dedos, unhas de implantação profunda, hérnia umbilical, criptorquidismo. Apresentava cardiopatia congênita (defeito de septo interventricular) e alteração comportamental. A ressonância magnética do encéfalo revelou alteração da substância branca. O diagnóstico inicial foi de síndrome de Alge-man. Foi realizado teste para essa síndrome pela técnica MQF-PCR (Quantificação fluorescente de microdeleções pela PCR) o qual foi negativo para a síndrome de Angelman. Sem histórico familiar relevante..

**Caso 5625** – Paciente do sexo feminino acompanhada no serviço de genética desde dois anos e seis meses, com quadro de atraso no DNMP, cardiopatia (regurgitação pulmonar, CIA tipo *ostiumsecundum* dilatação de átrio direito), alterações comportamentais, dismorfismos que incluem implantação alta de cabelo na frente, fendas palpebrais inclinadas para cima, ponte nasal deprimida, filtro nasolabial pouco marcado, narinas antevertidas, orelhas com hélices hiperdobradas, protrusão de incisivos superiores, tórax escavado, hérnia umbilical.

O MLPA mostrou deleção em 9q34.3 em ambos os casos, confirmada por dois KITs diferentes (P036-E2 e P070 B3). A deleção dessa região é a principal

causa da síndrome de reconhecida com Síndrome de Kleefstra. Ela é encontrada em mais 85% dos casos desta síndrome (ORPHANET, 2016) Trata-se uma síndrome bem descrita na literatura, inicialmente relatada em 2002, mas completamente descrita em 2004 por Kleefstra e colaboradores (KLEEFSTRA et al 2015). Embora os dismorfismos faciais nestes pacientes apresentem particularidades, os fenótipos são compatíveis com os descritos na síndrome, cujas principais características são microbraquicefalia, hipoplasia de face média, sobrancelhas anômalas, sinofris, lábios superiores em arco de cupido, lábios inferiores evertidos, língua protusa, prognatismo, hipotonia, atraso no desenvolvimento.

A cardiopatia está presente em 31% a 44% dos pacientes descritos. Alterações da substância branca e outros defeitos do SNC estão presentes em 50 a 61%. Também criptorquidia, hérnia inguinal e alterações comportamentais fazem parte do quadro clínico. A performance intelectual dos pacientes é variável, de leve a grave (ORPHANET, 2016).

A haploinsuficiência do gene o EHMT1 (euchromatinhistonemethyltransferase1) são causadas por deleções na região 9q34.3. Entretanto, há casos descritos da síndrome em paciente com mutações pontuais nesse gene que manifestaram o fenótipo da deleção (ORPHANET, 2016). Este é o gene correspondente à sonda do Kit MLPA P070 B3 e P036-E2 para deleções subteloméricas utilizado neste estudo.

Mesmo como parte das síndromes com fenótipos reconhecíveis, a Síndrome de Kleefstra, ainda é difícil de diagnosticar, pois além de rara e descrita recentemente, apresenta sobreposições de fenótipo com outras síndromes mais comuns, reconhecíveis. Nestes dois casos, o resultado do MLPA foi importante para direcionar o diagnóstico e o aconselhamento genético.

#### **4.10) Caso 5761- Deleção 6q27 em paciente sem diagnóstico definido**

Este paciente iniciou acompanhamento com um ano e nove meses devido ao atraso global do desenvolvimento associado a importante hipotonia e estrabismo convergente. Apresentava microssomia proporcional e

dismorfismos, como implantação alta de cabelo na frente, pregas epicantais, estrabismo convergente, ponta nasal rebaixada, narinas antevertidas, ponta nasal bulbosa, filtro nasolabial curto, lábio superior em tenda, afastamento entre dentes incisivos. A tomografia de crânio e encéfalo mostrou exuberância do espaço subaracnóide de fossa posterior sugerindo mega cisterna magna Sem dados relevantes em história familiar.

O resultado do MLPA mostrou uma deleção subtelomérica 6p27 confirmada por dois Kits distintos.

A deleção terminal envolvendo o braço longo do cromossomo 6 (6q), apresenta-se com um fenótipo amplamente variável. Deficiência intelectual, hipotonia, epilepsia, malformações cardíacas, anormalidade de retina, deformidades de orelhas, dismorfismos faciais, malformações em sistema nervoso central, medula espinhal e vértebras, hidrocefalia, agenesia de corpo caloso, polimicrogiria, anomalias cerebelares foram observadas em pacientes com essa deleção. Estudos recentes com pacientes que apresentavam a deleção 6q27 avaliam delinear uma região crítica responsável pelas malformações cerebrais (PEDDBIPHOTLA et al., 2015).

A comparação entre o paciente e casos descritos na literatura permitiria avaliar a deleção encontrada como causal e uma associação genótipo-fenótipo concordante para um diagnóstico específico.

#### **4.11) Caso 5780 – Deleção 2q37.2 associada a duplicação 5p15.33**

Criança do sexo feminino que iniciou acompanhamento com um ano e nove meses devido a um atraso global do desenvolvimento com microcefalia, epilepsia e dismorfismos: bossa frontal, orelhas rodadas posteriormente, sobrelhas arqueadas, filtro nasolabial pouco marcado, lábios finos, assimetria observável entre os ombros (não há registro de radiografias), quarto e quinto metatarsos do pé direito curtos, hérnia umbilical pequena, hipotonia muscular, pele frouxa, mancha café com leite em ombro esquerdo, hiperextensibilidade articular. Evoluiu com deficiência intelectual e alteração

comportamental compatível com transtorno do espectro autista. Sem dados relevantes em histórico familiar.

O estudo molecular por MLPA identificou duas alterações: deleção 2q37.2 e duplicação 5p15.33 (intersticial), confirmadas pelo kit para microdeleções subtelo méricas P036-E2.

Sobre a deleção 2q37.2 é importante enfatizar que há uma síndrome genética bem descrita associada à deleção nessa região: a síndrome de microdeleção 2q37, que pode abranger esta região cromossômica. É uma síndrome caracterizada por AGD, e DI, braquimetáfalangia, principalmente do terceiro e quarto dedos (em 50% dos casos), mas pode ser apenas do quarto dedo, baixa estatura, hipotonia, dismorfismos faciais, comportamento autista hiperfrouidão ligamentar e escoliose. Outros achados relacionados são epilepsia, anomalias em SNC, hérnia umbilical, traqueomalácia, anomalias renais, alterações gastrointestinais e tumor de Wilms (reportado em dois pacientes) (DOHERTY,2007).

Cerca de 80 a 85% dos indivíduos apresentam deleções detectáveis pelo cariótipo convencional. Em 15-20% dos casos os indivíduos apresentam pequenas deleções detectáveis apenas por estudo de microdeleções por técnicas específicas como MLPA e a-CGH. Em alguns indivíduos, a microdeleção 2q37 é resultado de um rearranjo cromossômico envolvendo o cromossomo 2 e um outro cromossomo(DOHERTY.2007)..

Já a microduplicação 5p13.55 não foi detectada pelo MLPA utilizado os Kits P070-B3 e P036-E2. Foi detectada utilizando o a-CGH. Esta microduplicação foi descrita de forma isolada em um paciente sindrômico por Izzo et. al, (2013). Naquela publicação foram descritos, AGD, fenda palatina, defeito de septo cardíaco, braquidactilia, hiperatividade e dismorfismos faciais: fendas palpebrais inclinadas para baixo, orelhas de implantação baixa, ponte nasal proeminente e larga, braquidactilia, criptorquia e micropenis. Foi o primeiro caso descrito de fenda palatina associando a um gene candidato para esse fenótipo na região (gene CPLMT1L).

No paciente aqui estudado a presença de uma deleção e uma duplicação, sugere a ocorrência de um rearranjo cromossômico que não pode ser esclarecido pelo teste MLPA. Apenas o a-CGH poderia auxiliar no diagnóstico molecular. Deve-se, no entanto, considerar que os achados morfológicos do paciente sugerem uma superposição principalmente com o fenótipo da síndrome de deleção 2q37. Os poucos dados da literatura (apenas um caso descrito) sobre amicroduplicação no cromossomo 5p, não permitem uma conclusão definitiva.

#### **4.12) Caso 5569 - Duplicação 8p23.3 em paciente sem suspeita clínica específica**

Este caso se refere a uma criança do sexo masculino que iniciou acompanhamento no serviço de genética aos três anos de idade devido a atraso do DNPM, dismorfismos e alterações comportamentais sugestivas de transtorno do espectro autista.

Ao exame morfológico observava-se: microssomia, sutura metópica proeminente, região orbital rasa, fendas palpebrais inclinadas para cima, cílios longos, hipoplasia malar, hipertrofia de gengiva, pescoço curto, peito escavado, mãos e pés pequenos.

O paciente fazia acompanhamento em serviço de cardiologia pediátrica devido a um histórico de arritmia cardíaca, sem dados associados a alterações cardíacas estruturais ou malformações cardíacas maiores. Sem outros dados relevantes quanto ao histórico familiar ou exames complementares. Não havia uma suspeita clínica de síndrome específica e por isso foi submetido ao estudo por MLPA.

De acordo com estudos na literatura, há limitação de dados sobre duplicação isolada na região 8p23.3. Entretanto, há vários casos já descritos envolvendo rearranjos no braço curto do cromossomo 8 (FISCH et al.,2011). Por causa de regiões no cromossomo denominada “lowcopyrepeats” (LCRs) e inversões polimórficas comuns, o cromossomo 8 humano está sujeito a rearranjos recorrentes(AKTAS et al.,2009)

A duplicação na região 8p23.1, por exemplo, pode ser considerada uma CNV patogênica e caracteriza a síndrome de duplicação 8p23.1. Essa síndrome está associada ao AGD e DI, alterações comportamentais, dismorfismos e doença cardíaca congênita (WEBER et al., 2014). Outro exemplo de rearranjo descrito em 8p é uma inversão-duplicação cromossômica. Inúmeros pacientes com inversão-duplicação do cromossomo 8p já foram identificados através de análise citogenética e diferentes pontos de quebra foram reportados, predominantemente em 8p23 (AKTAS, 2009). A inversão duplicação 8p está associada a deficiência intelectual, dismorfismos faciais, agenesia do corpo calos e hipotonia. Outros achados descritos são: malformações cardíacas, escoliose e crises convulsivas (Aktaset al (2009).), descreveram um paciente com uma inversão-duplicação causando uma trissomia parcial 8p23.3 a 8p12. A criança, de um ano e três meses apresentava atraso do DNPM e dismorfismos: braquicefalia, fronte proeminente, ponte nasal alta, orelhas grandes e rodadas posteriormente, aletas nasais amplas, boca ampla com lábio superior fino. Neste caso, o cariótipo convencional identificou a alteração e levou ao estudo do cariótipo dos pais o qual confirmou um rearranjo materno envolvendo a região 8p23.3.

Em nosso caso, o MLPA permitiu identificar uma duplicação 8p23.3 confirmada pelos dois kits para regiões subteloméricas. Apenas uma sonda compreende essa região, mas é a mesma sonda para os dois Kits. Há, portanto, limitações para determinar com clareza um rearranjo cromossômico ou mesmo sugerir um tamanho para a duplicação nessa região. Embora o resultado fosse sugestivo de uma associação genótipo-fenótipo causal, outras técnicas de estudos moleculares poderiam auxiliar na determinação da alteração molecular precisa.

#### **4.13) Caso 5681 – Duplicação 9p24.3 e del 18p11.32 confirmados por a-GCH**

Acompanhado desde os sete anos de idade devido a grave atraso no DNPM, com história de crescimento intra-uterino restrito, complicações perinatais mal definidas com necessidade de reanimação logo após o nascimento e convulsões. Ao exame: microssomia, hipertelorismo, fendas palpebrais

inclinadas para baixo com ptose palpebral, ponta nasal alta, dorso nasal alargado, comissura labial inclinada para baixo, braquidactilia de primeiro, quarto e quinto dedos, clinodactilia de 5º dedo, micropênis, escoliose, hérnia inguinal bilateral, perda auditiva neurosensorial (Fotos abaixo). A ressonância magnética de encéfalo (aos oito meses) mostrou área de gliose e encefalomalácia occipital direita, provável sequela de insultra isquêmica, hidrocefalia supra-tentorial, sinais de atraso na mielinização. Sem dados familiares relevantes.

O MLPA detectou duas CNVs, dup9p24.3 até 9p21.3, correspondendo a uma região de 24Mbp e del18p11.32 até 18p11.2, região de 14Mbp, que foram confirmadas por a-CGH. Este último teste foi realizado em laboratório privado, o qual, após evidenciar a alteração, solicitou amostra de sangue dos pais para avaliar possibilidade de rearranjos parentais. FISH identificou uma translocação balanceada entre o braço curto dos cromossomos 9 e 18 no pai representada pelo resultado: 46,XY,ish t(9p24,18p11)x1. Este achado explicou a dupla anormalidade e indica um risco aumentado para futuros filhos afetados não apenas com esse problema, mas também por outras alterações estruturais envolvendo os cromossomos 9 e 18.

Guilherme et al,2014 publicaram dois casos de pacientes, irmãos, um do sexo feminino e outro do sexo masculino, com duplicação 9p concomitante a uma deleção 18p decorrente de uma translocação balanceada materna. O resultado do aCGH neste estudo foi semelhante ao encontrado no paciente deste caso: arr 9p24.3q13(203,861-68,139,972) × 3, 18p11.32p11.31(136,226-6,426,936) × 1. Os pacientes do estudo apresentavam atraso global do desenvolvimento com importante atraso na fala e deficiência intelectual moderada. Foram descritos os seguintes dismorfismos comuns aos dois indivíduos: fronte ampla, orelhas baixo implantadas, face grosseira, hipertelorismo, miopia, fenda palpebral inclinada para baixo, pregas epicantais, ponte nasal proeminente, ptose palpebral, lábios grossos, comissura labial inclinada para baixo, filtro nasolabial curto, cifo escoliose, braquidactilia, clinodactilia de quinto dedo. O paciente do gênero masculino apresentava criptorquidismo e hérnia umbilical. Rearranjos cromossômicos envolvendo a trissomia do cromossomo 9 são comuns (Guilherme et al,2014). No entanto, foi possível encontrar apenas uma

descrição de dois irmãos com genótipo semelhante ao apresentado pelo paciente e com características fenotípicas comuns. Nesse estudo de caso, o MLPA pode delinear um diagnóstico específico para o paciente, que foi detalhado melhor por outras técnicas de estudo citogenético (FISH) e molecular (a-CGH). O estudo dos pais foi essencial para determinar a etiologia da alteração, associada a uma translocação balanceada de origem paterna. Isso é determinante para o aconselhamento do casal e confere uma chance aumentada para futuros filhos com anomalias congênitas. Além disso, a concordância entre os resultados do MLPA com a-CGH contribuem para aumentar a confiabilidade da técnica de MLPA, já que são dois métodos moleculares diferentes, que mostraram o mesmo achado e realizados em laboratórios diferentes.



Fotos: Paciente aos 10 anos de idade. Acima a esquerda: grave atraso do DNPM (não anda sem apoio). Acima a direita e abaixo a esquerda: face grosseira, com dorso nasal alto, ponta

elevada, columela curta, comissura labial inclinada para baixo e boca ampla. Abaixo a direita: encurtamento de segundo dedo e clinodactilia de quintos dedos.

#### **4.14) Caso 5723 – Síndrome de microdeleção 6p25**

Paciente iniciou o acompanhamento no serviço de Genética Médica aos oito anos de idade devido a AGD e DI grave. Apresentava dismorfismos como: macrocrania, implantação alta de cabelo na fronte, hipertelorismo, coloboma de íris bilateralmente, fendas palpebrais inclinadas para baixo, ponte e dorso nasal altos, orelhas rodadas posteriormente, manchas hipercrômicas na pele. Sem dados relevantes para outras malformações e histórico familiar.

A monossomia distal do cromossomo 6p é responsável por um quadro sindrômico caracterizado por déficit intelectual variável, anormalidade oculares, perda auditiva e dismorfismos faciais. As anomalias oculares são principalmente localizadas na câmara anterior ocular e os dismorfismos mais característicos são: hipertelorismo, fronte ampla, fendas palpebrais inclinadas para baixo, hipoplasia de face média, orelhas de implantação baixa e micrognatia. A região do ponto de quebra é a região subtelomérica 6p24-pter (GOULD et al., 2004). Há vários casos descritos na literatura envolvendo deleções subteloméricas nessa região.

Gould et al, 2004 descrevem e estabeleceram uma correlação entre o fenótipo e o genótipo molecular de sete pacientes com deleção 6p25. Neste estudo, além dos achados clínicos descritos acima, malformações maiores como cardiovasculares, em SNC, renais e esqueléticas também foram encontradas.

No paciente aqui estudado o resultado do MLPA mostrou uma deleção na região 6p25 confirmada pelos dois KITS para regiões subteloméricas. A alteração oftalmológica em câmara anterior, hipertelorismo e outros dismorfismos associados à deficiência intelectual descrita na síndrome de deleção 6p25 sugeririam, portanto, uma associação genótipo-fenótipo concordante para essa paciente.

#### **4.15) Casos 5675 e 5728 - Deleção SYBL1 (gene VAMP7 – OMIM 300053)**

Os dois pacientes que apresentaram essa deleção são indivíduos do mesmo sexo com fenótipos aparentemente muito variados entre si e que iniciaram acompanhamento no serviço de genética aos seis (5728) e sete anos (5675) de idade devido a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, deficiência intelectual e dismorfismos. Em um deles (5728) há relato de obesidade, alterações comportamentais (agressividade, interesse sexual exagerado), importante dificuldade de concentração em atividades escolares e história familiar de alterações comportamentais não detalhadas. Segue em acompanhamento psiquiátrico. Já no outro caso (5675) não há dados relevantes considerando alterações comportamentais e histórico familiar.

Em ambos os casos o kit P036-E2 confirmou a deleção do gene SYBL1 encontrada pelo do kit P070-B3.

O gene SYBL1 (OMIM #300035) é um gene localizado na região pseudoautosômica do cromossomo X (Xq28), sujeito ao processo de inativação ou silenciamento por fatores epigenéticos. De acordo com dados do OMIM, não há uma correlação entre o genótipo de microdeleção dessa região e a deficiência intelectual síndrome. Sendo assim, no momento, não seria possível determinar uma correlação clínica e laboratorial que determinasse a etiologia genética para os pacientes.

Saito et al.,2000 analisou o genótipo da haploinsuficiência do gene SYBL1 em 110 pacientes com transtorno bipolar e 119 pacientes controles e estabeleceu uma associação de um SNP (single nucleotide polymorphism) no exon 8 nos pacientes homens afetados em relação aos controles. Entretanto, Muller et al., 2002 realizou um estudo semelhante e não estabeleceu a associação do SNP

para homens, mas apontou uma significância limítrofe ( $p= 0,51$ ) para as mulheres estudadas, após aplicação da correção de Bonferrone.

Dessa forma, não é possível esclarecer o significado deste achado nos pacientes estudados. Mesmo que essa associação de transtorno comportamental do tipo bipolar fosse considerada relevante para o estudo, principalmente no caso (5728), no momento, não seria possível estabelecê-la tendo em vista a idade dos pacientes.

#### **4.16) Casos com alterações em apenas um dos KITS para microdeleções subtelo méricas (P070-B3) sem confirmação pelo Kit P036-E2.**

Nesses casos não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo que permitisse, até o momento, direcionar o estudo de caso para um diagnóstico específico.

#### **Caso 5508 – Del SYBL1 não confirmada por outro método**

Dentre os três casos que apresentaram deleção na região correspondente a esse gene (vide item 4.15), neste, não foi confirmada a alteração do kit P070-B3 pelo kit P036-E2 e permanece sem diagnóstico.

O paciente iniciou acompanhamento no serviço de genético aos 16 anos de idade devido à deficiência intelectual, sem relato de alterações comportamentais, nem história familiar relevante. Realizado pesquisa cromossômica para síndrome de X-Frágil, a qual foi negativa. Apresentava distúrbios como: microcefalia, assimetria facial, voz anasalada, pregas epicantais, orelhas baixas implantadas, micrognatia, lábio grosso, tórax escavado, hiperцифose torácica, várias manchas café-com-leite no corpo, clinodactilia de terceiro e quinto dedos das mãos, sindactilia de segundo e terceiro dedos dos pés, hábitus marfanóide. A ultrassonografia abdominal

mostrou um rim direito pélvico de dimensões reduzidas. Foi aventada hipótese de neurofibromatose tipo 1 e indicado exclusão de síndrome velocardiofacial. Esta não foi confirmada pelo MPLA e sobre a hipótese daquela, não há uma conclusão clara sobre o diagnóstico clínico.

Até o momento não foi definido um diagnóstico sindrômico para esse paciente que contemple as alterações encontradas. Por causa da idade em última consulta, 18 anos, o aconselhamento genético foi dirigido para orientações quanto à possibilidade de recorrência de alterações semelhantes em futuros filhos. Considerando a possibilidade de um padrão autossômico dominante, a estimativa de risco foi de até 50%.

#### **Caso 5658 – Duplicação do gene SHOX não confirmada por outro método**

O paciente ao qual se refere o resultado de duplicação da região compreendida pelo gene SHOX no cromossomo X identificada pelo Kit P070-B3, porém não confirmada pelo Kit P036-E2. Apresentava um quadro de baixa estatura pós natal e deficiência intelectual sem associação com malformação ósseas. Iniciou acompanhamento no serviço de genética médica aos oito anos devido a um quadro de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e dismorfismos: bossa frontal, dolicocefalia, orelhas baixo implantadas, fendas palpebrais inclinadas para cima, ponte nasal alargada, clinodactilia de primeiro e quinto dedos das mãos, polegares proximais, pés planos. Há relato de consumo de álcool pela mãe durante a gravidez. Sem outros dados relevantes em história familiar.

Embora o gene SHOX (OMIM#312865) esteja associado à baixa estatura e haja descrição de casos na literatura que envolvem rearranjos cromossômicos com deleção nessa região, não foi possível através do teste estabelecer uma associação genótipo-fenótipo clara para determinar um diagnóstico específico para esse paciente. Um dado clínico relevante descrito é o uso do álcool durante a gestação. Sendo assim, algumas das características do fenótipo do paciente poderiam ser explicadas pelo efeito do álcool sobre o feto. Um estudo

molecular mais aprofundado do paciente, com acgh poderia auxiliar na compreensão do evento encontrado do teste por MLPA.

### **Caso 5766 e 5599 – duplicação 16q24.3 e deleção 4q35 não confirmadas**

Em um caso foi encontrada a duplicação 16q24.3 (sonda específica para o gene GAS8: #OMIM605178) e em outro caso a deleção 4q35 (sonda para o gene FRG1: OMIM#601278). Em ambos os casos, não houve concordância entre os dois kits para microdeleções e microduplicações subteloôméricas. Os dois pacientes apresentavam quadros sindrômicos distintos associados à DI/AGD e dismorfismos e permanecem sem diagnóstico sindrômico definido (vide descrição abaixo). Assim, não foi possível sugerir uma relação causa-efeito nestes dois pacientes através do teste genético. Para tal seria necessário o estudo por outros métodos moleculares para confirmar ou afastar os achados.

**Caso 5766:** Paciente do sexo feminino que iniciou acompanhamento no serviço de genética aos cinco anos com quadro de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, déficit intelectual, alterações comportamentais com temperamento agitado de difícil controle, crises convulsivas, anemia persistente com suspeita de talassemia menor, regurgitação mitral e tricúspide, hipoacusia e dismorfismos faciais: bossa frontal, ponte nasal levemente deprimida, lábios grossos, filtro nasolabial curto e pouco marcado e palato alto. Acompanhada por psiquiatria, hematologia e neurologia. Atualmente, aos 15 anos, não apresenta um diagnóstico definido.

**Caso 5599:** Acompanhado no serviço de genética médica desde os sete anos de idade devido a atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, hipotonia e

deficiência intelectual associada à transtorno do espectro autista. Histórico de exposição alcóolica no período fetal. Apresenta microcefalia e dismorfismos faciais discretos: implantação de cabelo mais baixa em frente, dorso nasal alargado e ponta nasal bulbosa, fenda labial ampla

### **Casos 5612 e 5613 – Duplicação 9p24.3 não confirmada**

De acordo com dados da literatura (OMIM #154230; ORPHANET) a região 9p24.3 está associada distúrbios na diferenciação sexual, como por exemplo, disgenesia gonadal. Apenas deleções e translocações foram relatadas envolvendo a região sugerindo associação com genes DMRT1 e DMRT2.

Dois casos mostraram uma duplicação (dup9p24.3) no kit P070 que não foi confirmada pelo kit P036-E2. Os achados dos testes se referem a sondas diferentes em uma mesma região. Entretanto, os dois pacientes são irmãos (sexo masculino) e isso corrobora com a possibilidade da alteração estar presente. Mesmo assim, seria necessária a confirmação dos resultados por outros kits ou exames. Além disso, não é possível, de acordo com os dados disponíveis na literatura, estabelecer uma associação causal da duplicação em 9p24.3, visto que o quadro clínico descrito em ambos pacientes é determinante para AGD/DI sindrômica sem associação com alterações voltadas para distúrbios da diferenciação sexual.

## 5) DISCUSSÃO

A definição do diagnóstico genético tem enorme implicação na vida do paciente e de seus familiares (MAKELA et al.,2009). O Serviço Especial de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais é o maior serviço de genética clínica do Estado de Minas Gerais e o único integrado ao SUS. Este serviço auxilia no diagnóstico de inúmeros pacientes da rede pública de saúde com suspeita de uma doença genética. Mesmo com uma equipe multidisciplinar e com profissionais experientes, inúmeros casos ainda permanecem sem diagnóstico. Esse fato se deve a vários fatores ligados à variabilidade de manifestações dessas doenças em si e da heterogeneidade das causas de DI e ou AGD em pacientes sindrômicos (MICLEA et al., 2015).

A evolução das técnicas de exames moleculares que auxiliam no diagnóstico, permite esclarecer casos que por testes convencionais como cariótipo e FISH não seriam esclarecidos (VISSERS et al,2010). No atual momento, o Serviço dispõe apenas do cariótipo como método de exame. Essa situação, muitas vezes, limita o estudo dos casos para direcionar o diagnóstico e o aconselhamento genético.

Existem vários métodos de testes genéticos com aplicabilidade clínica para busca de um diagnóstico de pacientes com AGD/DI e dismorfismos associados (STUPPIA et al.,2010). Dentre eles, o MLPA, por motivos econômicos e de conveniência, foi o método de escolha para este estudo para aqueles pacientes que não tinham diagnóstico esclarecido pelo cariótipo convencional.

Uma das principais vantagens desse teste é o baixo custo e a possibilidade de detectar, em apenas um exame, diferentes causas de alterações patogênicas de diferentes síndromes de microdeleções e microduplicações (STUPPIA et al., 2012; JEHEE et al., 2011). Isso é válido, tanto para pacientes com uma suspeita clínica passível de diagnóstico molecular por aquele método, quanto para casos em que não há uma suspeita específica. Além disso, do ponto de vista técnico, é um teste consideravelmente menos complexo comparado a outros como o aCGH.

Em pesquisa pessoal da autora, o preço de um exame por a-CGH em grandes laboratórios está próximo dos R\$ 5.000,00. Já o custo do estudo para síndromes de microdeleções intersticiais por MLPA, por exemplo, é de aproximadamente R\$ 700,00 e o por FISH para regiões subteloméricas, de cerca de R\$2.000,00. A diferença de custo entre os testes é muito relevante. De acordo com o novo ROL de procedimentos em saúde da Agência Nacional de Saúde Suplementar de 2016, para indicação de cobertura para testes genéticos, o a-CGH é coberto para casos em que o quadro do paciente não sugira o diagnóstico de uma síndrome reconhecível clinicamente ou detectável por métodos menos complexos e de custo menor. Para casos em que há uma suspeita de síndrome de microdeleções/duplicações reconhecível e passível de ser identificada por técnicas como FISH e MLPA, há cobertura do custo para estes testes.

De acordo com as recomendações do Colégio Americano de Genética Médica para análise citogenômica constitucional pré e pós-natal por microarray, ao considerar a complexidade da análise dos resultados do aCGH em comparação ao MLPA, podemos ainda inferir que há necessidade de profissionais com maior proficiência para realizar o aCGH do que para o MLPA (SOUTH et al., 2013). Em nosso meio ainda há limitações para o acesso aos profissionais que dominam essa técnica. Não só para realizar as técnicas dos exames, mas, também, para a interpretação precisa dos resultados. Boa parte desses exames, mesmo em laboratórios da rede particular são realizados em centros especializados dentro ou fora do país de forma terceirizada.

Outro ponto importante a ser considerado é que, como em toda prática médica, o achado laboratorial deve ser validado pelo profissional de saúde levando em conta o quadro clínico do paciente. Em genética médica, portanto, a “correlação genótipo-fenótipo” em casos de AGD/DI é fundamental para a interpretação dos resultados, preferencialmente com auxílio do geneticista (MOESCHLER et al.,2014).

A maior parte dos pacientes estudados neste trabalho foi do sexo masculino, concordante com a literatura que relata uma maior prevalência do AGD/DI em pacientes desse gênero. Isso se deve a contribuição importante da deficiência intelectual ligada ao cromossomo X dentre as principais causas de origem genética (CHEN et al.,2015).

A utilização do MLPA permitiu o diagnóstico ou a identificação de alguma deleção/duplicação em 15,2% (29/191) de pacientes que permaneceriam sem diagnóstico definido e aconselhamento genético, contribuindo assim para uma melhora importante na acuidade diagnóstica do Serviço.

Todos os casos foram avaliados isoladamente, com intuito de determinar a implicação que o resultado do MLPA teria para direcionar o diagnóstico de cada paciente. Em alguns casos o resultado foi concordante com a suspeita clínica e definiu o diagnóstico. Em outros casos, nos quais não havia uma suspeita clínica definida, o resultado permitiu direcionar o estudo e, estabelecer um diagnóstico que previamente não foi suspeitado.

A maioria das síndromes genéticas são raras. As síndromes de microdeleção/microduplicação, mais ainda, e se manifestam com uma expressividade muito variável e muitas delas descritas ainda recentemente (NEVADO et al.,2014). Assim, a confirmação do achado clínico do Kit de MLPA por um outro Kit com cobertura semelhante é importante para aumentar a confiabilidade dos resultados laboratoriais quando não há uma suspeita clínica clara. Por outro lado, também permite um “caminho inverso”, ou seja, o achado laboratorial direciona a reavaliação do caso. A partir daí, baseado no exame laboratorial e nos dados da literatura é possível definir melhor a hipótese diagnóstica e isso aumenta a “expertise” da equipe médica.

Os kits de MLPA utilizados são direcionados para o diagnóstico de síndromes de microdeleções e microduplicações específicas, sejam elas intersticiais ou subteloméricas (MRC-HOLLAND®). Esta é uma primeira limitação do método. Ele não é um instrumento de diagnóstico amplo, que faça uma cobertura global, como o cariótipo e o aCGH (SOUTH et al.,2013). Esses kits abrangem um número limitado de doenças, diante de um universo de milhares. Por outro lado, apresenta vantagens, permitindo a confirmação diagnóstica, de forma econômica, de síndromes mais conhecidas, suspeitadas pelos respectivos fenótipos. Quando há suspeita, bem estabelecida, de uma síndrome coberta pelo método, por exemplo, de síndrome de Williams, não se justifica, do ponto de vista econômico a sua confirmação por um método muito mais dispendioso e complexo, como o aCGH.

O espectro de síndromes coberto pelo MLPA inclui algumas doenças menos raras, com fenótipos relativamente bem estabelecidos, mas com uma expressividade muito variável. Isso dificulta a suspeita clínica das mesmas. Inclui também síndromes raras que, embora reportadas, contam com apenas dezenas de casos descritos e não têm ainda um fenótipo bem definido na literatura, pois os mesmos são estabelecidos com poucos casos descritos, sendo difícil para o médico geneticista incluí-la entre suas hipóteses diagnósticas (NEVADO et al.,2014). Essas últimas, mais facilmente, escapam ao diagnóstico clínico. A identificação desses casos contribui para a melhor definição das mesmas, ampliando ou reduzindo o seu fenótipo e para que a própria equipe de geneticistas se capacite a conhecê-las, para diagnósticos futuros.

Neste estudo os 29 casos com resultados positivos representaram uma taxa de detecção de 15,2% de alterações possivelmente patogênicas do MLPA para pacientes com cariótipo normal. O estudo realizado por Jehee et al.,2011 em um serviço de saúde brasileiro (SP) , determinou uma taxa de detecção de 21,8% (incluindo 6,9% de pacientes com cariótipo alterado). Os critérios de seleção usados nesse estudo foram diferentes, assim como a metodologia, para estabelecer uma comparação. Entretanto, os números absolutos foram próximos e foi o estudo mais próximo da realidade deste trabalho.

Dentre esses 29 casos, sete (24,1%) apresentavam uma suspeita clínica clara (casos 5583, 5585, 5630,5729, 5511, 5608, 5596), mostrando a validade do estudo do fenótipo, associado ao exame molecular.

Nos casos 5583 e 5585 foram confirmadas as suspeitas de síndrome de Williams. No caso 5630 foi confirmada a suspeita de Prader-Willi, e no caso 5729 foi confirmada a suspeita de síndrome velocardiofacial

A importância da clínica também ficou evidenciada no caso 551, no qual apesar de um primeiro resultado negativo, por FISH, permaneceu a hipótese clínica de síndrome velocardiofacial, comprovado por três sondas com cobertura para a região 22q11.2.

Outro aspecto interessante foi observado no caso 5608, que apesar de ter ocorrido uma dupla deleção, em 22q11.2 e em 1p36, prevalecia o fenótipo da síndrome velocardiofacial e foi essa suspeita que levou ao estudo por MLPA do cas.De forma semelhante, no caso 5596 ocorria a deleções 5q35 que conferia ao paciente o fenótipo predominante de síndrome de Sotos o qual levou ao estudo por MLPA, confirmando esta deleção. No entanto, quando confirmado o achado por aCGH além daquela deleção foi encontrada a duplicação 11p15 associada à síndrome de Beckwith-Wiedeman. Neste caso foi considerada a hipótese de um rearranjo cromossômico balanceado em um dos genitores, mas até o momento não foi possível confirmar isso.

O uso de técnicas de diagnósticos moleculares mais sofisticados tem levado a identificação de muitos pacientes com mais de uma microdeleção/microduplicação(HU et al.,2015; ZANETTI et al.,2014). Esses casos demonstram a complexidade dos fenótipos. Futuramente poder-se-ão identificar as interações entre os fenótipos e talvez os motivos da predominância de alguns fenótipos sobre outros.

Os demais 22 casos (75,9%) não apresentavam diagnósticos sindrômicos definidos, e assim os achados do MLPA permitiram diagnosticar e direcionar o aconselhamento genético em muitos deles. Permitiram também, um conhecimento maior dos fenótipos destas síndromes.

Em nossa amostragem, a deleção 22q11.2 (SVF) foi a mais frequente e detectada em seis pacientes (20,6%) . De fato, a síndrome Velocardiofacial tem uma prevalência estimada muito maior do que outras síndromes também detectadas nesse estudo. Em um estudo populacional (BOTTO et al.,2003) reportaram uma prevalência de 1/6000 em brancos, negros e asiáticos e de 1/3800 em indivíduos de origem hispânica. Já para a síndrome de Kleeftstra, por exemplo, a prevalência reportada é de 1/200.000, embora fosse considerada subdiagnosticada e, subestimada (KLEEFSTRA et al.,2010). Isso mostra quão frequente ou raro são essas síndromes e, por isso, necessitam métodos diagnósticos especiais.

As outras síndromes de microdeleções/duplicações encontradas nesse estudo como del1q44 (5597), del2q33.1 (5592), del2q37.2 (5780) e duplicações MECP2 (5721), embora fossem bem descritas na literatura, ainda sim apresentam expressiva variabilidade fenotípica e são pouco reconhecíveis clinicamente (HYUN et al,2014; BALASUBRAMANIAN et al.,2011; DOHERTY, 2013; VAN ESCH,2011) . Por isso, se não fosse pelo teste, provavelmente, esses pacientes permaneceriam sem diagnóstico por algum tempo ainda.

Outros casos de microdeleções/duplicações subteloméricas encontradas que são raras e pouco descritas na literatura foram as del8p23.3, dup8p23.3, dup9p24.3 com del18p11.32, del6q27 e 6p25. A avaliação do fenótipo após o achado laboratorial, na maioria das vezes, permitiu conferir o diagnóstico clínico e o aconselhamento genético. É importante lembrar a definição proposta por Van Karnebeek et al. (2005) de que “o diagnóstico etiológico envolve determinar evidências suficientemente reportadas na literatura capazes de levar a uma conclusão de causalidade”.

Relevante também é considerar a sobreposição de outros fatores etiológicos, não genéticos. Em um paciente (caso, 5732), foi identificada a associação com um teratogênio (carbamazepina) (BRIGGS et al.,2008), que poderia ter influenciado no fenótipo do paciente. Situação semelhante ocorreu nos caso 5658, no qual foi encontrada a duplicação do gene SHOX em apenas um dos kits e não foi confirmado por outros métodos e a exposição do feto ao álcool. Neste caso a opinião dos geneticistas foi de que o fenótipo do paciente poderia estar

associado aos riscos do uso de álcool pela mãe durante a gravidez (MAY et al.,2004). Entretanto, não é possível afastar completamente algum efeito da duplicação encontrada.

Alguns achados deste trabalho não permitiram uma conclusão definitiva, uns pelo achado molecular em si, que ainda é controverso, outros por limitações do método. Entre os primeiros, o encontro de três pacientes com deleção no gene SYBL1. Segundo o OMIM (#300035) não há uma correlação entre o genótipo de microdeleção dessa região e a deficiência intelectual sindrômica. Embora Saito et al. (2000) sugira uma associação com distúrbios bipolares em homens, esses dados são conflitantes com os de Muller et al. (2002) e não permitem uma conclusão definitiva. Um aspecto que poderia ser considerado é que os pacientes aqui estudados ainda são jovens para que se possa estabelecer um diagnóstico de transtorno bipolar, ou de outra doença psiquiátrica bem definida.

Entre as vicissitudes dependente do método, estão aqueles casos onde a confirmação de uma deleção ou duplicação encontrada em um kit não foi confirmada por outro, exigindo o estudo por aCGH, permanecendo sem um diagnóstico, ou optando-se por validar o achado em função do fenótipo do paciente estudado. Não há uma resposta adequada, quando inexistem condições de realizar exames mais sofisticados e onerosos, como frequentemente ocorre no sistema público ou mesmo no sistema privado brasileiro. Isso, no entanto não invalida o método, pois efetivamente ele contribui para melhor abordagem dos pacientes em situações de escassez de recursos.

Vale ainda lembrar que na realidade atual, no sistema público não é possível contar sistematicamente nem com o MLPA.

## **6) CONCLUSÕES**

A utilização do MLPA se mostrou positiva, permitindo a confirmação diagnóstica, o diagnóstico insuspeito e o aconselhamento genético adequado ou, pelo menos, mais refinado de mais de 15% dos pacientes que permaneceriam sem diagnóstico e prosseguiriam em sua peregrinação em busca dos mesmos.

Casos em que há uma suspeita de síndrome reconhecível o MLPA pode ser uma boa opção para a sua confirmação ou mesmo a exclusão do diagnóstico.

O método apresenta dificuldades e em determinadas situações é dependente da confirmação por métodos mais sofisticados de biologia molecular. A familiarização com a técnica do exame, suas limitações e a análise cuidadosa da correlação genótipo fenótipo é determinante para o geneticista clínico avaliar a implicação do teste para uma definição diagnóstica e do aconselhamento genético dos pacientes.

## 7) ARTIGO

O relato de caso submetido à revista American Journal of Medical Genetics.

### **Ectodermal dysplasia-like phenotype and 2q33.1 microdeletion syndrome: case report and literature review**

G. C. Salazar<sup>1</sup>, A. M. Chami<sup>2</sup>, S. B. Ferreira<sup>2</sup>, Coser. E. M.<sup>3</sup>, I. C. Rosse<sup>1</sup>, P. A. S. Fonseca<sup>1</sup>, M. R. S. Carvalho<sup>1</sup>, M. J. B. Aguiar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>2</sup>Serviço Especial de Genética do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup> Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/MG, Brazil

G.C. Salazar and A. M. Chami contributed equally to this paper.

M. J. B. Aguiar and M. R. S. Carvalho contributed equally to this paper.

### **ABSTRACT**

The 2q33.1 microdeletion syndrome (2q33.1DS, OMIM\*612313) is a challenging condition characterized by complex clinical manifestations and complex underlying molecular mechanisms. 2q33.1DS clinically can resemble microdeletion syndromes of

other chromosomal regions such as Seckel, 1p36DS, 22q11DS, Angelman, Smith-Magenis or Williams syndromes. 2q33.1DS is characterized by intellectual disabilities of varying severity and dysmorphic facial features including: micrognathia; downslanting palpebral fissures; cleft/high palate; crowded teeth; seizures; joint laxity; arachnodactyly; and, happy demeanor. In the present study, we describe a girl presenting a 2q33.1 microdeletion and review the literature on phenotypes mapped to this region. The patient is a 7-year-old girl. Her most prominent features are dental abnormalities, thin hair, sparse eyebrows, thin skin with visible veins, thin and hypoplastic nails, suggesting an ectodermal dysplasia. Interstitial microdeletions/microduplications were screened using Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) kit P245-B1. Probes on the SATB2 gene were deleted. aCGH confirmed an 8.4 Mb microdeletion in 2q33.1. SATB2 was suggested as the principal component of this phenotype. SATB2 binds AT-rich regions frequently found in regulatory elements. An ectodermal dysplasia locus was proposed in the 2q region involving EDAR and a cluster of candidate genes for dental development, including DLX1 and DLX2. However, the deletion presented by this girl does not include DLX1 and DLX2 or the putative EDAR locus region. This patient provides evidence that deletions in 2q33.1 produce clinical pictures typical of other chromosomal regions, including the ectodermal dysplasia phenotype.

**Keywords:** 2q33.1 microdeletion syndrome, developmental delay, SATB2 gene, ectodermal dysplasia

## INTRODUCTION

2q33.1 microdeletion syndrome (2q33.1DS; [OMIM] \*612313) is a challenging condition characterized by complex clinical manifestations and complex underlying molecular mechanisms. The phenotypes of 2q33.1DS resemble other phenotypes caused by microdeletions of other chromosomal regions such as Seckel, 1p36 microdeletion, 22q11 microdeletion, Angelman, Smith-Magenis or Williams syndromes [1-3]. In addition, these patients may present with the Glass Syndrome phenotype ([OMIM] \*612313). Glass syndrome is characterized by intellectual disability of varying degrees and dysmorphic facial features, including micrognathia, downslanting palpebral fissures, cleft/high palate, crowded teeth, seizures, joint laxity, arachnodactyly and

happy demeanor. Here, we describe a girl presenting a 2q32-q33 microdeletion and review the literature on the phenotypes mapped to this region.

## **CASE REPORT**

This patient was investigated as part of a research project approved by the local ethics in research committee (ETIC 0091.0.203.000-10) and data were collected only after the informed consent was signed by the parents. The patient is a 7-year-old girl, the first child of healthy, non-consanguineous parents. Pregnancy was uneventful and she was born by caesarian section at 39 weeks of gestation. She has been followed by the medical genetics service from the age of one year and nine months due to delayed psychomotor development and dysmorphic features.

Physical examination at the age of six years and three months revealed weight and height in the 3rd percentile; microcephaly (HC: 47.5 cm); wide forehead with receded thin hair; sparse eyebrows; mid-face hypoplasia; large, prominent ears; marked, short philtrum; wide mouth; prominent chin; thin skin with visible veins; thin and hypoplastic (or short) nails; fifth finger clinodactyly; and, broad first toes (Figure 1a). Oral clinical examination revealed mixed dentition, absence of upper and lower lateral incisors, maxillary central incisors in eruptive phase, presence of caries (tooth 55), presence of wear on the occlusal surface in primary molars, diastema and gingival recession (tooth 74) (Figure 1b).

She has an agitated but friendly and happy demeanor with a significant speech delay. She does not communicate verbally, as she is unable to say a word. She has a broad based gait, is dependent for activities of daily life and still had no toilet training. At her first evaluation, the clinical hypothesis of Williams syndrome was suggested due to the facial dysmorphisms and happy demeanor. Metabolic laboratorial tests performed were

within the normal range. Abdominal ultrasonography and head CT-scan showed no significant alterations. Brain MRI showed Rathke cysts in the adenohypophysis. Otoacoustics emissions testing showed slight hearing loss. In early childhood, she used valproic acid for seizures.



Figure 1 – a) Facial characteristics: observe the pointed chin, large ears, highly implanted hair and happy demeanor. b) Intra-oral examination: observe the upper central incisors in eruption, wide-space between lower central incisors, the flat occlusal surface of the deciduous premolars and gingival recession.

She presented normal G-banding karyotype, 46,XX. Microdeletions/microduplications were screened using Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) with SALSA MLPA kit P245-B1 microdeletion syndromes-1 according to the manufacturer's recommendations (MRC-Holland, Amsterdam, TheNetherlands). Probes 15315-L17114 and 15318-L19750 on the *SATB2* gene were deleted (Figure 2a). This microdeletion was further characterized using aCGH Microarray Human Genome 180K

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), which confirmed an 8.4 Mb microdeletion in 2q32.3-q33.2 arr[GRCh37 – vs hg19](196,019,487-204,430,793) (Figure 2b).

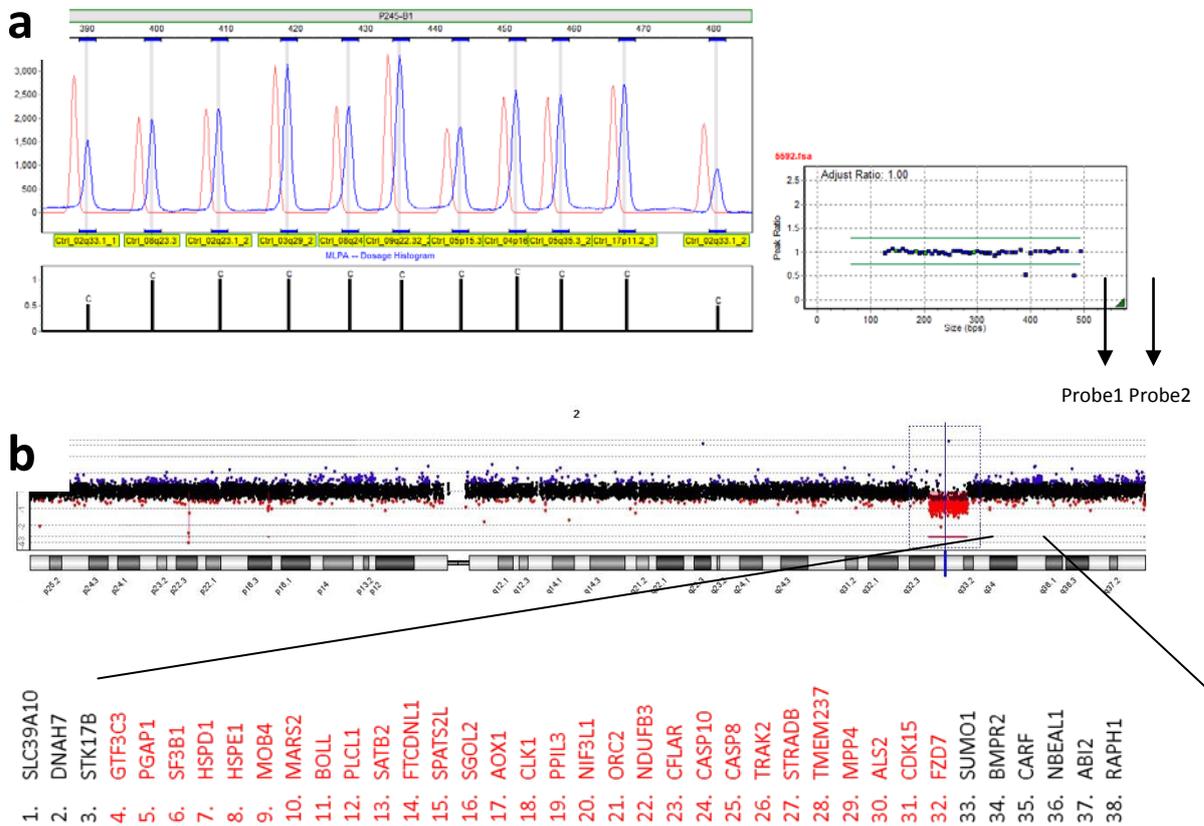


Figure 2 - a) Results of MLPA performed using SALSA MLPA P245-B1 kit indicating the deletion of the two *SATB2* gene probes. b) CGH results showing 8.4Mb deletion in 2q32.3-q33.2 arr[GRCh37 – vs hg19](196,019,487-204,430,793) present in the patient described here. Genes in the deletion are shown below. In red, the list of genes in the critically deleted region proposed in the literature [4].

## DISCUSSION

The diagnosis of 2q33.1DS is difficult, partially due to the large number of names used in the literature for this condition make it more difficult to characterize the condition.

Also, the phenotype may resemble other syndromes. There are several names designating the 2q33.1DS and SATB2 Associated Syndromes (SAS) . SAS involves not only microdeletions but also point mutations in *SATB2*[5].

This patient phenotype resembles other microdeletion syndromes such as Williams (large mouth, happy demeanor) and, particularly, Angelman (agitation; ataxic gait; frequent, unmotivated smiles; absence of speech; seizures). However, the most prominent features in this patient are the dental abnormalities, thin hair, sparse eyebrows, thin skin with visible veins, and thin and hypoplastic nails, suggesting an ectodermal dysplasia. Indeed, the presence of an ectodermal dysplasia locus in 2q32 has already been proposed [4]. This proposal was based on a patient presenting a 26 Mb microdeletion that partially overlaps the minimal critical region (MCR) (Rifai et al., 2009) for 2q33.1DS, but extending centromerically (Figure 3). Based on the deletion map, those authors suggested that a cluster of genes for dental development would map to 2q31 and the candidate genes would be *DLX1* and *DLX2*. However, the microdeletion present in the patient reported here is much smaller and does not extend to these genes. Indeed, her deletion overlaps the MCR, extending for short stretches in both directions.

In the literature, we were able to find 17 articles describing patients with 2q33.1DS, having deletions that partially or completely overlap the 2q33.1DS MCR. The clinical findings described in these patients are summarized in Supplementary Table 1.

Dental abnormalities including malocclusion, missing teeth, diastemas and abnormally shaped teeth have been described in individuals with 2q32-q33 microdeletions[2-9]. Intraoral examination of our patient showed absence of upper and lower lateral incisors, while upper central incisors were in the eruption stage. Diastemas and occlusal wear were observed in our patient. Another striking finding was the bruxism, which already caused the destruction of the dental cuspids of the premolars. Bruxism is

not a common finding in patients with 2q33.1DS, but it has been previously described in a patient simultaneously presenting crowded teeth and primary macrodontia[6].

Mutations in *SATB2*, one of the genes in 2q33.1DS MCR causes isolated cleft palate in humans [5], which is common in patients with 2q33.1DS. However, this patient does not present high palate or cleft palate and four additional patients in the literature also did not present palate abnormalities [7,9,10]. These findings suggest that *SATB2* haploinsufficiency is *not* the only cause of cleft palate, as proposed done. Furthermore, a high palate is described in the patient reported by Mencarelli et al., indicating that other genes in addition to *SATB2*, in this chromosomal region, are probably also involved in palate development [13].

*SATB2* microdeletion is the central characteristic of Glass syndrome (intellectual deficiency, downslanting palpebral fissures, micrognathia, cleft palate, crowded teeth, seizures, joint laxity, arachnodactyly, and happy demeanor). In addition, a patient with a similar phenotype and a deletion overlapping the *SATB2* gene was already described [4]. Those authors reported a patient presenting developmental delay; growth retardation; microcephaly; an ectodermal dysplasia-like phenotype, characterized by atrophic skin; thin, sparse, slow growing hair; oligodonty; and, abnormally shaped teeth.

The *SATB2* gene was identified as the gene responsible for abnormalities/defects associated with deletions and translocations of 2q32-q33 [11]. This gene is located in a relatively gene poor region and encodes a 733-amino-acid, highly conserved protein [5]. The *SATB2* protein is involved in chromatin remodeling and transcriptional regulation due to its ability to bind to AT-rich sequences, known as binding regions of matrix-associated regions [5, 12]. Depending on the locus, it can repress or activate the transcription of specific genes [5].

The term Glass syndrome has been used more specifically for microdeletions involving the *SATB2* gene ([OMIM] \*612313) and SAS for both microdeletions and point mutations in *SATB2*. In addition, it was proposed that SAS is under-diagnosed and should be considered more frequently in children with intellectual disability, delayed speech, cleft or high-arched palate and dental anomalies [5].

To the best of our knowledge, 39 patients with a 2q33.1 microdeletion syndrome have been described in the literature. Microdeletions in this region have variable sizes and breakpoints ranging from 35kb to 26Mb. Most of the patients present large microdeletions, extending proximally or distally or in both directions around *SATB2*[2-4,6,7,9]. Eighteen small deletions have already been described (Figure 3).

A minimal overlapping region was characterized, reported as the 2q33.1DS MCR (figure 3). It has been proposed that the most common phenotypic characteristics would result from haploinsufficiency. 2q33DS MCR is located precisely between the *GTF3C3* and *FZD7* genes and involves 29 of the genes deleted in those studies (Figure 2) [2-4,6,7,9]. The typical phenotype of 2q33DS includes intellectual disability, feeding difficulties, growth retardation, dysmorphic features, thin and sparse hair, high/cleft palate, dental anomalies and behavioral problems [3,7].



distance regulatory elements. Therefore, the myriad clinical manifestations presented by 2q33.1DS patients reflect the chromatin interactions that underlie the complex, tridimensional, inter-chromosomal regulatory mechanisms.

## REFERENCES

1. Courtens W, Speleman F, Messiaen L, Bormans J, Roy NV, et al. (1997) Interstitial deletion 2q33. 3-q34 in a boy with a phenotype resembling the Seckel syndrome. *American journal of medical genetics* 71: 479-485.
2. Urquhart J, Black GC, Clayton-Smith J (2009) 4.5 Mb microdeletion in chromosome band 2q33. 1 associated with learning disability and cleft palate. *European journal of medical genetics* 52: 454-457.
3. Balasubramanian M, Smith K, Basel-Vanagaite L, Feingold M, Brock P, et al. (2011) Case series: 2q33. 1 microdeletion syndrome—further delineation of the phenotype. *Journal of medical genetics: jmg*. 2010.084491.
4. Rifai L, Port-Lis M, Tabet AC, Bailleul-Forestier I, Benzacken B, et al. (2010) Ectodermal dysplasia-like syndrome with mental retardation due to contiguous gene deletion: Further clinical and molecular delineation of del (2q32) syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152: 111-117.
5. Docker D, Schubach M, Menzel M, Munz M, Spaich C, et al. (2014) Further delineation of the SATB2 phenotype. *Eur J Hum Genet* 22: 1034-1039.
6. Van Buggenhout G, Van Ravenswaaij-Arts C, Mc Maas N, Thoelen R, Vogels A, et al. (2005) The del(2)(q32.2q33) deletion syndrome defined by clinical and molecular characterization of four patients. *Eur J Med Genet* 48: 276-289.
7. Rosenfeld JA, Ballif BC, Lucas A, Spence EJ, Powell C, et al. (2009) Small deletions of SATB2 cause some of the clinical features of the 2q33. 1 microdeletion syndrome. *PloS one* 4: e6568.
8. Zarate YA, Perry H, Ben-Omran T, Sellars EA, Stein Q, et al. (2015) Further supporting evidence for the SATB2-associated syndrome found through whole exome sequencing. *Am J Med Genet A* 167A: 1026-1032.
9. Yu N, Shin S, Lee K-A (2015) First Korean Case of SATB2-Associated 2q32-q33 Microdeletion Syndrome. *Annals of laboratory medicine* 35: 275-278.
10. Mc Cormack A, Taylor J, Gregersen N, George AM, Love DR (2013) Delineation of 2q32q35 deletion phenotypes: two apparent "proximal" and "distal" syndromes. *Case Rep Genet* 2013: 823451.

11. FitzPatrick DR, Carr IM, McLaren L, Leek JP, Wightman P, et al. (2003) Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32-q33. *Hum Mol Genet* 12: 2491-2501.
12. Leoyklang P, Suphapeetiporn K, Srichomthong C, et al. Disorders with similar clinical phenotypes reveal underlying genetic interaction: SATB2 acts as an activator of the UPF3B gene (2013). *Hum Genet* 132: 1383–1393.
13. Mencarelli MA, Caselli R, Pescucci C, et al (2007) Clinical and molecular characterization of a patient with a 2q31.2-32.3 deletion identified by array-CGH. *Am J Med Genet A* 143A: 858–865.
14. García-Martín P, et al. Displasias ectodérmicas: revisión clínica y molecular. *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104:451-70.

#### **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Table 1 – Synthesis of the 2q33.1DS patients reported in the literature.

Note: ND: Notdescribed.

|                            | Case report  |                                 |                                    | Nae Yu                             |                                    | Cormack P3   |  | Balasubramanian P1                        |   | Balasubramanian P2                        |   |
|----------------------------|--|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|--|---|---|---|---|
|                            | P3   |                                 | P4                                 |                                    | P5                                 |  | P6   |   | P7  |   | Rifai   |
|                            | Year   | del2-q                          | Year                               | Year                               | Year                               | Year   | Year   | Year                                      | Year                                      | Year                                      | Year  |
| Size deletion              | 2011   |                                 | 2011                               | 2011                               | 2011                               | 2011   | 2011   | 2011                                      | 2011                                      | 2011                                      | 2010  |
| HD                         | 2q32.3-q33.1   | 2q33.1-q33.2                    | 2q33.1                             | 2q33.1                             | 2q33.1                             | 2q32.3-q33.1   | 2q33.1   | 2q33.1                                    | 2q33.1                                    | 2q33.1                                    | 2q31.2-q33.2                                  |
| Age of description         | 5.9 Mb   | 4.9 MB                          | 34.7 Mb                            | 34.7 Mb                            | 4.1 Mb                             | 4.1 Mb   | 4.1 Mb   | 2.4 Mb                                    | 2.4 Mb                                    | 2.4 Mb                                    | 26.1 Mb                                       |
| Sex                        | ND   | 22q11DS/SMDS/ADS                | ND                                 | ND                                 | ND                                 | ND   | ND   | ND  | ND  | ND  | ND  |
| ID                         | 8.5y   | 9y                              | ND                                 | ND                                 | ND                                 | 4y   | 4y   | 3.5y                                      | 3.5y                                      | 3.5y                                      | 16y   |
| Speech/Voice               | M  | M                               | ND                                 | ND                                 | ND                                 | M  | M  | F   | F   | F   | F   |
| Brain CT/MRI               | Moderate delay   | Severe delay                    | Moderate delay                     | Moderate delay                     | Moderate delay                     | Severe delay   | Severe delay   | Mild global delay                         | Mild global delay                         | Mild global delay                         | Severe  |
| Craniofacial               | No words   | No speech                       | None                               | None                               | None                               | Single words only  | Single words only  | Few words/signs                           | Few words/signs                           | Few words/signs                           | No active speech                              |
| Skin                       | ND   | ND                              | ND                                 | ND                                 | ND                                 | ND   | ND   | ND  | ND  | ND  | Bitemporal constriction                       |
| Hair                       | high forehead  | Prominent forehead              | Long, narrow face                  | Long, narrow face                  | Long, narrow face                  | high forehead  | high forehead  | Normo-cephalic                            | Normo-cephalic                            | Normo-cephalic                            | Asymmetry/ microcephaly                       |
| Eyes                       | ND   | ND                              | ND                                 | ND                                 | ND                                 | ND   | ND   | Fair skin                                 | Fair skin                                 | Fair skin                                 | Thin/lipoatroppic                             |
| Ears                       | No   | No                              | No                                 | No                                 | No                                 | No   | No   | Curly hair                                | Curly hair                                | Curly hair                                | Wooly sparse                                  |
| Nose                       | Hypertelorism  | Prominent orbits                | Intermittent exotropia             | Intermittent exotropia             | Intermittent exotropia             | Esotropia; hypermetropia, blond fundus                         | Esotropia; hypermetropia, blond fundus                         | Normal                                    | Normal                                    | Normal                                    | Down slanting alvebral fissures               |
| Cleft palate               | Cupped, prominent  | Low set, recurrent otitis media | Low set, mild HL                   | Low set, mild HL                   | Low set, mild HL                   | Normal   | Normal   | Normal                                    | Normal                                    | Normal                                    | Low set, cupped                               |
| Mouth/ philtrum            | Up-turned  | Small, up-turned                | Beaked Nose, hypoplastic alae nasi | Beaked Nose, hypoplastic alae nasi | Beaked Nose, hypoplastic alae nasi | Normal   | Normal   | Upturned nasal tip                        | Upturned nasal tip                        | Upturned nasal tip                        | Thin, prominent tip                           |
| Teeth                      | Cleft palate, narrow   | Cleft palate                    | Cleft palate                       | Cleft palate                       | Cleft palate                       | High arched, narrow palate                                     | High arched, narrow palate                                     | High palate                               | High palate                               | High palate                               | Cleft palate, soft, bifid uvula               |
|                            | Long   | Thin upper lip, long philtrum   | Microstomia, short philtrum        | Microstomia, short philtrum        | Microstomia, short philtrum        | Normal   | Normal   | Thin, long philtrum                       | Thin, long philtrum                       | Thin, long philtrum                       | Straight upper lip                            |
| Micrognathia/ chin         | Crowded, missing front upper incisors  | Crowded teeth                   | No                                 | No                                 | No                                 | Crowded teeth  | Crowded teeth  | Normal                                    | Normal                                    | Normal                                    | Oligodontia with 7 missing teeth              |
| Heart                      | Prominent chin   | Micrognathia                    | Micrognathia                       | Micrognathia                       | Micrognathia                       | Normal   | Normal   | Normal                                    | Normal                                    | Normal                                    | Prominent chin                                |
| Genitalia                  | Normal   | Normal                          | ND                                 | ND                                 | ND                                 | Murmur   | Murmur   | Normal                                    | Normal                                    | Normal                                    | No active speech                              |
| Feet hand nails            | Hypospadias  | Normal                          | Normal                             | Normal                             | Normal                             | Normal   | Normal   | Normal                                    | Normal                                    | Normal                                    | Inguinal hernia of ovary                      |
| Feeding difficulties       | Broad thumbs and big toes  | Normal                          | Overlapping toes                   | Overlapping toes                   | Overlapping toes                   | 5th toe clinodactyly   | 5th toe clinodactyly   | Normal                                    | Normal                                    | Normal                                    | Short thumbs, bilat/thick nails, hard, convex |
| Neurological abnormalities | NG feeding   | Yes                             | Yes                                | Yes                                | Yes                                | Yes  | Yes  | Yes                                       | Yes                                       | Yes                                       | Yes   |
| Behavioral abnormal        | Hypotonia, balance difficulties, wide based gait/ joint laxity; pectus excavatum | Hypotonia/ Tip-toe walking      | Tight heel-cords                   | Tight heel-cords                   | Tight heel-cords                   | Bilateral extensor plantaris carinatum, narrow shoulder girdle | Bilateral extensor plantaris carinatum, narrow shoulder girdle | Hypotonia                                 | Hypotonia                                 | Hypotonia                                 | Hypotonic, broad based gait/seizures          |
|                            | Inappropriate hugging, laughter  | Violent bursts of aggression    | ND                                 | ND                                 | ND                                 | Hyperactivity; autistic features                               | Hyperactivity; autistic features                               | Friendly, social with occasional tantrums | Friendly, social with occasional tantrums | Friendly, social with occasional tantrums | ND  |

| Rosenfeld                                      |  |                                       | Urchhart   |  |  | Buggenhout   |  |  |
|--|--|---------------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| P1   | P2                                     | P3                                    |  | P2   | P3   | P4   |  |  |
| 2009   | 2009                                   | 2009                                  |  | 2005   | 2005   | 2005   |  |  |
| 2q33.1<br>183 pb                               | 2q33.1<br>173 pb                       | 2q33.1<br>185 pb                      |  | q32.1-q33.3<br>21.6 Mb   | q32.2-q34<br>21 Mb   | q32.3-q33.3<br>11 Mb   |  |  |
| ND   | ND                                     | ND                                    | 22q11DS 1p36DS ADS   | Pierre-Robin sequence  | Seckel syndrome  | ND   |  |  |
| 9y, 6m<br>F                                    | 21y<br>M                               | 6y<br>F                               | 5.5y<br>F  | 20y<br>M   | 3y8m<br>M  | 11y11m<br>M  |  |  |
| Severe   | Severe                                 | Severe                                | Moderate   | Severe   | Severe   | Severe   |  |  |
| Few words/sings<br>MRI Normal                  | Single words only<br>ND                | No words/ signs<br>ND                 | Few words<br>Normal  | Cry high pitched<br>ND   | Donald Duck/few words<br>Corpus callosum agenesis  | Donald Duck speech<br>ND   |  |  |
| Long, narrow face,<br>frontal bossing<br>ND    | Macrocephaly<br>ND                     | Microcephaly/<br>Brachycephalic<br>No | Broad, high forehead/<br>macrocephaly<br>Mottling of skin<br>ND        | Long face with small skull<br>Thin transparent<br>Sparse and thin hair | Asymmetry, Metopic<br>ridge/sloping forehead<br>Thin transparent<br>Sparse and thin hair | Microcephaly/Small face,<br>Flat occiput<br>ND                     |  |  |
| Normal   | Normal                                 | Normal                                | Deep set   | Deep-set, downward slanting  | Dacryocystitis, retina and iris<br>coloboma  | Sparse thin white hairs<br>Downward slanting<br>palpebral fissures |  |  |
| Normal   | Normal                                 | Normal                                | Normal   | Low-set, dysplastic, narrow<br>ear canals, otitis                      | Frequent otitis media  | Dysplastic   |  |  |
| Slightly large                                 | Normal                                 | Normal                                | Normal   | High and broad nasal bridge  | High and broad nasal bridge  | Prominent nasal bridge,<br>beaked Nose<br>High palate              |  |  |
| Normal   | Broad nasal<br>midsection<br>Yes       | Normal                                | Cleft and high palate<br>Small mouth/Thin, flat<br>philtrum            | Yes<br>ND  | High palate<br>ND  | short philtrum/ Thin lips  |  |  |
| ND   | Short tongue                           | No<br>ND                              | Missing lateral incisors   | ND   | ND   |  |  |  |
| Smooth upper<br>lip/smooth philtrum            | Crowded teeth                          | Fused mandibular<br>central incisors  |  | Diastema, short and broad<br>teeth                                     | Abnormal teet/ bruxism   | Absent adult teeth   |  |  |
| Malocclusion/ delayed<br>primary dentition     |  |                                       |  |  |  |  |  |  |
| Micrognathia/<br>prominent maxillary<br>Murmur | Small mandible<br>Normal               | ND<br>Normal                          | Small chin<br>ND   | Maxilla hypoplasia,<br>micrognathia<br>ND                              | ND   | ND   |  |  |
| Normal   | Small testes                           | Normal                                | ND   | Small genitalia/bilateral<br>inguinal hernia and<br>cryptorchidism     | Ventricle septum defect<br>ND  | ND   |  |  |
| Digits Nodules from<br>chewing                 | Digits Broad thumb<br>and big toe      | ND                                    | Broad thumb and big<br>toes/short fingers and<br>toes/valgus deformity | Small hands e feet<br>Hypoplasia 5th toenails                          | ND   | ND   |  |  |
| No   | Yes                                    | No                                    | Yes  | Sucking and swallowing<br>problems                                     | Sucking and swallowing<br>problems   | Sucking and swallowing<br>problems                                 |  |  |
| No   | Hypertonia/ high<br>tolerance for pain | No                                    | Febrile convulsions joint<br>laxity                                    | Spasticity lower extremities/<br>broad based gait/ seizures            | Severe motor restlessness/<br>Thoracic kyphosis  | Contractures of the knees,<br>opisthotonus/ hypotonia              |  |  |
| Repetitive, sociable                           | Happy, over-eating,<br>aggressive      | No sleeping<br>throughout             | Sociable disposition   | Difficult behavior, self-<br>mutilation                                | mood changes, hyperactive,<br>autistic-like  | No behavioral problems   |  |  |

## 8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J. W. et al. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. **BMC Med Genet**, v. 8, p. 9, 2007.

AKTAS, D. et al. Clinically abnormal case with paternally derived partial trisomy 8p23.3 to 8p12 including maternal isodissomy of 8p23.3: a case report. **Molecular Cytogenetics**, v.2, p.14, 2009.

BALASUBRAMANIAN, M. et al. Case series: 2q33. 1 microdeletion syndrome—further delineation of the phenotype. **J Med Genet**, v.48, n.5, p.290-8, 2011

BERTELLI, M.O. et al. Intellectual developmental disorders": reflections on the international consensus document for redefining "mental retardation-intellectual disability" in ICD-11. **AdvMent Health Intellect Disabil**, v.10, n.1, p.36-58,2016

BOTTO, L.D. et al. A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. **Pediatrics**,v112, p.101-107, 2003.

BRIGGS, G.G.; FREEMAN, R.K.; YAFFE, S.J. Drugs in Preganancy and lactation. Philadelphia. **Lippincott Williams & Wilkins**. 2008.

CARULLA, L. et al. Developmental disorder: towards a new name, definition and framework for "mental retardation/intellectual disability in ICD-1. **World Psychiatry**, v.10, p.175-180, 2011.

Centers for Disease Control and Prevention. Economic costs associated with mental retardation, cerebral palsy, hearing loss, and vision impairment-United States, 2003. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.53, n.3, p.57–59, 2009.

CHEN, X. et al. Fragile X syndrome screening in Chinese children with unknown intellectual developmental disorder. **BMC Pediatr**, v.15, n.77, p.1-9, 2015.

DE VRIES, B.B. et al. Submicroscopic 8pter deletion, mild retardation and behavioral problems caused by a familial t(8;20)(p23;p13). **Am J Med Genet** v. 99, p. 314-319, 2001.

DOHERTY,E. 2q37 Microdeletion syndrome. **GeneReviews**®(Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1158/> , último acesso em fev/2016)

DUPONT, C. et al. First reported case of intrachromosomal cryptic inv dup delXp in a boy with developmental retardation. **Am J Med Genet**, v.143A, n.11, p.1236-43, 2007.

FISCH, G.S. et al. Genotype-Phenotype Association of Chromosome 8p Inverted Duplication Syndrome. **Behav Genet**. V. 41, n.3, p. 373-380, may 2011.

GOOULD, D. et al. Phenotypic and molecular assessment of seven patients with 6p25 deletion syndrome: Relevance to ocular dysgenesis and hearing impairment. **BMC Medical Genetics**, v.5, p.17, 2004.

GUILHERME, R.S. et al. Duplication 9p and their implication to phenotype. Guilherme et al. **BMC Medical Genetics**, v.15, p.142,2014.

HASSING, R.J. 22q11.2 deletion syndrome diagnosed in an adult male. **Ned Tijdschr Geneesk**, v.155, n.40, p.A3644,2011.

HASTINGS, P.J. et al. Mechanisms of Change in Gene Copy Number. **Nat Rev Genet**. v.10, n.8, p.551-564, Aug 2009.

HOLMES, L.B. et al. The teratogenicity of anticonvulsants drugs. **N Engl J Med**, v. 344, n. 15, p.1132-38 , 2001.

HU, J. et al. A novel maternally inherited 8q24.3 and a rare paternally inherited 14q23.3 CNVs in a family with neurodevelopmental disorders. **Am J Med Genet A**, v.167A, n.8, p.1921-6, 2015.

HYUN CHO, J. et al. A chromosome 1q44 deletion in a 4-month-old girl; The first report in Korea Case report Korean. **J Pediatr** , v. 57, n.6, p.292-296, 2014.

IZZO, G. et al. A microduplication of 5p15.33 reveals CLPTM1L as a candidate gene for cleft lip and palate. **Euro J Med Genet**, v.56, n.4, p.222-225, Apr 2013.

JEHEE, F.S. et al. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. **Eur. J. of Med Genet**, v.54, p.425-432, 2011.

JONES, K.L.; JONES, M.C.; DEL CAMPO, M. **Smith's, Recognizable Patterns of Human Malformations**. ELSEVIER; 7ª Edição, 2013.

KINI, U. ET AL. Dysmorphic features: an important clue to the diagnosis and severity of fetal anticonvulsant syndromes. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v.91, p.90–95, 2006.

KLEESFTRA, T.; NILESEN, W.M.; YNLEMA, H.G. Kleefstra Syndrome. **GeneReviews**® Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47079/> (último acesso em 23/3/016)

MACDONAL-MAGINN, D.; ZACKAI, E.H. 22q11.2 Deletion Syndrome. **GeneReviews**®, acesso em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1523/-> del 22q11.2.

MAKELA, N.L.; BIRCH, P.H.; FRIEDMAN, J.M.; MARRA C.A. Parental perceive value of a diagnosis for intellectual disability (ID): a qualitative comparasion of families with and without a diagnosis for their child´s ID. **Am J Med Genet A**, v.149A, n.11, 2393-2402, 2009.

MAULIK, P.K. et al. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. **ResearDev Dis**, v.32, p. 419-36, 2011.

MAY, P.A. et al. Alcohol consumption and other maternal risk factors for fetal alcohol syndrome among three distinct samples of women before, during, and after pregnancy: the risk is relative. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, v.127C, n.1, p.10-20, 2004.

MICLEA, D. et al. Genetic Testing in Patients With Global Developmental Delay / Intellectual Disabilities. A Review. **Clujul Medical**, v.88, n.3, p. 288-292, 2015.

MOESCHLER, J.; SHEVELL, M. Clinical Genetic Evaluation of the Child With Mental Retardations or Developmental Dalys, **Pediatrics**, v. 117, p.2304, 2006

MOESCHLER, J. B.; SHEVEL, M.; COMMITTEE ON GENETICS. Comprehensive Evaluation of the Child With Intellectual Disability or Global Developmental Delays. **Pediatrics**, v.134, n.3, p.e903, 2014.

MRC-HOLLAND® b.v. (Disponível em [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com), último acesso em 6/4/216).

MULLER, D. J. et al. Association between a polymorphism in the pseudoautosomal X-linked gene SYBL1 and bipolar affective disorder. **Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiat. Genet.)** v.114B, p. 74-78, 2002

NEVADO, J. et al. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. **Genetics and Molecular Biology**, v.37, n.1, p. 210-219, 2014.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MEN.OMIM™. (Disponível em: <http://www.omim.org>, último acesso em 05/2/2016)

ORPHANET - The portal for rare diseases and orphan drugs.(Disponível em: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=EN>, Acesso em 28/05/2016).

PEDDIBHOTLA, S. et al. Delineation of candidate genes responsible for structural brain abnormalities in patients with terminal deletions of chromosome 6q27. **European Journal of Human Genetics**, v.23, p. 54–60, 2015.

POHOVSKI, L.M.; DUMIC, K., ODAK, L.B. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability.**Molecular Cytogenetics**, v.6, p,1-7,2013.

PUBMED (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, último acesso em 3/5/2105).

ROBIN, N.H.; SPRINTZEN, R.J. Defining the critical spectrum of deletion22q11.2.**J Pediatr** v.147, p.9—6, 2005.

ROL de Procedimentos e Eventos da Agência Nacional de Saúde Suplementar 2016, item 110.38, p. 126

SALAZAR GC. Contribuição das microdeleções/duplicações Intersticiais para o fenótipo da Dificuldade de Aprendizado na Matemática. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte,2013.

SALAZAR, G. C.; CHAMI, A. M. ; MARTINS, A. A. S. ; MIRANDA, M. ; TEIXEIRA, T. B. ; FARIA, J. P. G. ; LAMOUNIER, A. ; LEÃO, L. L. ; AGUIAR, M. J. B. ; CARVALHO, M. R. S. . Relato de caso: paciente com síndrome velocardi facial apresentando dupla deleção: 22q11.2 e 1p36. In: XXVI Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2014, Fortaleza. Relato de caso: paciente com síndrome velocardi facial apresentando dupla deleção: 22q11.2 e 1p36, 2014. In: XV Congresso Brasileiro de Genética Médica,2013, Porto Alegre.

SATIO, T.; PAPOLOS D.F.; LACHMAN, H. M. Analysis of pseudoautosomal X-linked gene SYBL1 in bipolar affective disorder: description of a new candidate allele for psychiatric disorders. **Am J Genet. (Neuropsychiat Genet)**, v.96B, p.317-323, 2000.

SCHAEFER, G.B.; BOEDENSTEINER, J.B. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. **Pediatr Clin North Am**, V.39, n.4, p.929-943, 1992.

SHALOCK, R.L. et al. The renaming of mental retardation: understanding the change to the term of intellectual disability (ID). **Intellect Dev Disabil**, v.45, n.2, p.116-124.

SIGNORINI, C. et al. MECP2 Duplication Syndrome: Evidence of Enhanced Oxidative Stress. A Comparison with Rett Syndrome. **Journal. Pone**, v.10, p.1-12, 2016.

SOUTH, S.L. et al. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. **Genet. Med**, v.15, n.11, p.901-9, 2013.

STUPPIA, L. et al. Use of MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. **Int. J. Mol. Sci**, v.13, n.15, p. 3245-3276, 2012.

VAN ESCH, H. MECP2 Duplication Syndrome. **Mol Syndromol** v.2, p.128-136, 2011.

VAN KARNEBEEK, C.D. et al. Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. **Eur J Hum Genet** 2005, v.13, n.1, p.6-25, 2005.

VAN KARNEBEEK, C.S.; STOCKLER, I.S. Evidence-based approach to identify treatable metabolic diseases causing intellectual disability. Paper presented at: **Annual Conference of the American College of Medical Genetics**; Vancouver, BC, Canada, March 11, 2011.

VIANA, M.M.; CHADID, G. S; CHAMI, A.M.; MARTINS, A.A.; LEÃO L.L.; AGUIAR, M.J.B.; CARVALHO, M.R.S. Relato de caso: sobreposição das síndromes de Beckwith-Wiedemann e Sotos em paciente com microdeleção em 5q35.5 e microduplicação em 11p15.5. In: **XVII Congresso Brasileiro de Genética Médica**, Ribeirão Preto, 2015.

VISSERS, L.E. et al. Array-Based Comparative Genomic Hybridization for the Genome wide Detection of Submicroscopic Chromosomal Abnormalities. **Am. J. Hum. Genet**, v.73, p.1261–1270, 2003.

VISSERS, L.E.; DE VRIES B.B.; VEITMAN, J.A. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. **J Med Genet**.v.47, n.5, p. 289-297, 2010.

WEBER, A. ET AL. 8p23.1 duplication syndrome: narrowing of critical interval to 1.80 Mbp. **Molecular Cytogenetics**, v.7, n 94, p.2-4, 2014.

WU, B.L. et al. Distal 8p deletion (8)(p23.1): an easily missed chromosomal abnormality that maybe associated with congenital heart defect and mental retardation. **Am J Genet**, v.62, p.77-83, 1996.

WU, Y. et al. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. **BMC Medical Genetics**, v.11, n.32, p. 1-12,2010.

ZANETTI, A. et al. A Hunter Patient with a Severe Phenotype Reveals Two Large Deletions and Two Duplications Extending 1.2 Mb Distally to IDS Locus. **JIMD Reports**, v.17, p.13-21, 2014.

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

---

**Título da Pesquisa:**

**Avaliação de estratégia de diagnóstico neuropsicológico e genético-molecular dos transtornos do desenvolvimento cognitivo (retardo mental)**

Prezado (a),

este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é um convite para vocês participarem do projeto de pesquisa acima. Aqui, queremos fornecer a vocês todas as informações necessárias para vocês entenderem o projeto e qual seria sua participação nele, para poderem decidir se querem participar ou não. A participação é voluntária. Se vocês optarem por não participar, não tem problema. Isto não vai influenciar o seu atendimento ou o da criança pela qual você é responsável.

O objetivo deste projeto de pesquisa é desenvolver e avaliar ferramentas (testes) para o diagnóstico de crianças com transtornos do desenvolvimento cognitivo (retardo mental). Além disto, buscamos avaliar testes para investigar se há uma causa genética para a dificuldade detectada na criança.

**Estamos sua à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas em relação à pesquisa antes da sua realização e durante a execução da mesma.**

**Leia as informações abaixo antes de expressar ou não o seu consentimento para participar da pesquisa.**

Quando uma criança não se desenvolve como é esperado de acordo com a idade, são necessários testes para esclarecer o que está acontecendo (diagnóstico). Além disto, precisamos saber quão alterado o desenvolvimento é e se há outros aspectos do desenvolvimento comprometidos. Para isto são necessários os testes. Os testes têm que ser padronizados, ou seja, crianças são muito diferentes uma das outras. Precisamos saber o que é normal numa determinada idade, para depois definirmos se o desenvolvimento de uma criança é normal ou não. Não é possível usar dados de outros lugares, pois o desenvolvimento varia conforme o ambiente. Assim, nesta pesquisa estamos desenvolvendo e padronizando testes para uso na população de Minas Gerais. A idéia é obter-se um perfil completo do

funcionamento da criança, ou seja, quais as funções estão comprometidas e quais as preservadas, que sirva como referência para orientação do seu atendimento. Também a definição de um modelo de aconselhamento voltado para a reabilitação se tornará viável.

A outra pergunta freqüente, quando a família ou o profissional de saúde se depara que um desenvolvimento diferente do esperado, é qual é a causa. Podem ser problemas genéticos (mesmo quando não há outros casos na família), podem ser problemas relacionados à gestação ou ao parto, assim como efeito de drogas ou acidentes. Atualmente, há muitos testes diagnósticos para investigar as causas genéticas das alterações do desenvolvimento cognitivo. O uso destes testes depende da hipótese formulada pelo médico, mas também depende dos custos. Alguns destes testes são baratos e outros muito caros. Alguns destes testes são novos e não estão ainda disponíveis para a nossa população. Assim, é preciso estabelecer critérios para o uso dos testes, levando em conta a freqüência dos diversos tipos de doenças genética no nosso meio, e a ordem de utilização dos testes. Ao longo deste projeto, alguns testes novos passaram a ser oferecidos. Estes testes visam avaliar alterações em alguns genes ou cromossomas ou partes de cromossomas, que quando alterados causam alteração do desenvolvimento. Estes testes são baseados em diversos métodos (MLPA, PCR, qPCR, cariótipo, aGCH, entre outros) e para cada um deles devemos avaliar as vantagens, dificuldades e custos. Esta pesquisa é financiada pelo SUS e queremos obter as informações necessárias para que este órgão disponibilize estes testes à população atendida.

A pesquisa será conduzida pelo Laboratório de Neuropsicologia do Desenvolvimento, do Departamento de Psicologia, da Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas (FAFICH), da UFMG em conjunto com o Laboratório de Genética Humana e Médica, do Departamento de Biologia Geral, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFMG.

Caso você autorize a participação de seu (sua) filho (a) na pesquisa, você deverá preencher questionários e participar de uma entrevista para coleta da história da criança. Além disto, haverá a avaliação da criança, que será feita em aproximadamente 4 sessões de 1h e 30min cada. A criança responderá testes que avaliam inteligência, habilidades pré-escolares, atenção, memória, percepção, destreza motora, velocidade de realização das tarefas, linguagem e planejamento. De maneira geral, são tarefas simples e divertidas, feitas com lápis e papel, jogos ou na tela do computador.

Finalmente, haverá um encontro de aproximadamente 1h para a devolução dos resultados.

Caso a pessoa não tenha sido avaliada por um Geneticista Clínico, poderá ser feito exame clínico-genético, que constará de coleta da história da criança (anamnese), exame clínico e história familiar. Para investigação molecular, será feita uma coleta de material biológico. Este material pode ser obtido uma das seguintes maneiras: 1. sangue (5 ml, de uma veia do braço); saliva (neste caso a criança será convidada a cuspir num tubo de ensaio); 3. raspado de bochecha (a criança abre a boca e o coletador raspa delicadamente sua bochecha

com um palito de madeira). A coleta será feita por profissionais de saúde habilitados e com experiência na coleta de sangue ou outros materiais. O material biológico será utilizado para análises genéticas no Departamento de Genética Humana e Médica do Departamento de Biologia Geral do ICB da UFMG, ao qual somente os pesquisadores têm acesso. Todos os procedimentos serão realizados no Serviço de Psicologia Aplicada da UFMG (SPA), o qual dispõe de consultórios apropriados à realização de todo o procedimento. Caso autorize a coleta de material biológico de seu filho, o mesmo poderá ser guardado em um banco de materiais biológicos humanos, podendo vir a ser usado em pesquisas futuras. Neste caso, será coletado outro termo de consentimento livre e esclarecido, específico para o biobanco de materiais biológicos humanos.

Poderá ser necessária a realização de fotografia do corpo ou de partes do corpo do paciente, assim como filmagem ou gravação da entrevista ou de parte do exame físico ou neuropsicológico. Esta documentação será armazenada em banco de dados digital, sob responsabilidade dos coordenadores da pesquisa. Uma vez que estamos desenvolvendo uma linha de pesquisa em busca de métodos diagnósticos, e que, para muitas doenças, estes ainda não estão disponíveis, estes documentos serão armazenados permanentemente.

As fotografias e filmagens serão usadas apenas em reuniões e publicações científicas. Neste caso, as fotos serão modificadas (cobertas por tarjas, borradas parcialmente ou cortadas, de forma a apresentar apenas o detalhe relevante, de maneira a impedir sua identificação. Em nenhuma forma de publicação serão apresentados dados que permitam sua identificação ou a de seu(s) dependente(s).

Os dados coletados na avaliação neuropsicológica serão armazenados em um banco de dados no Laboratório de Neuropsicologia do Desenvolvimento do Departamento de Psicologia da UFMG, sob responsabilidade do professor Dr. Vitor Geraldi Haase. O material biológico colhido e seus derivados (DNA, por exemplo) serão armazenados em um banco de material biológico sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho. Ambos os bancos de dados são regulamentados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG) e poderão ser utilizados em outras pesquisas. Neste caso, é obrigatório por lei que se peça uma nova autorização ao COEP/UFMG.

É importante mencionar que a participação da criança na pesquisa é voluntária. Dessa forma, você poderá negar o consentimento ou optar, em qualquer momento da pesquisa, pelo encerramento da participação da criança sem sofrer nenhum tipo de prejuízo. Ou seja, você pode continuar a receber atendimento, caso opte por não participar da pesquisa.

Toda a participação na pesquisa é gratuita. Vocês não precisarão pagar pelos exames, avaliações ou consultas de orientação e entrega de resultados em momento algum. Por outro lado, o fato de vocês participarem da pesquisa não implica em compromisso financeiro para as equipes da UFMG ou os órgãos financiadores da pesquisa. Ou seja, não haverá qualquer forma de pagamento, ressarcimento ou indenização, em função da participação da criança e sua família no projeto de pesquisa.

Os resultados da pesquisa poderão ser utilizados em trabalhos científicos publicados ou apresentados oralmente em congressos e palestras, também sem revelar a identidade dos

participantes. Os resultados serão apresentados em geral de forma coletiva, por exemplo, quantos pacientes tiveram alterado um determinado exame. Entretanto, se o estudo de uma criança acrescentar novas informações, que auxiliem a compreensão da doença ou dos métodos diagnósticos, seu caso poderá ser publicado isoladamente, sempre se protegendo sua identidade e de sua família.

Quanto aos riscos oferecidos pela pesquisa, assegura-se que são mínimos. A coleta de sangue pode doer um pouco e deixar uma mancha no local, mas, como numa escoriação rotineira, desaparece com o passar do tempo. Os outros métodos não apresentam riscos. Todo o material utilizado para coleta de materiais biológicos é estéril, descartável, e não existe nenhum risco de contrair doenças. Em relação à avaliação neuropsicológica, o risco máximo é de desconforto físico e ansiedade relacionada aos procedimentos de testagem. Todo esforço será feito no sentido de atentar para o bem-estar físico e psicológico dos participantes, interrompendo-se a avaliação aos menores sinais de desconforto, além de se adotar procedimentos de relaxamento e esclarecimento nessas ocasiões.

Como benefício aos participantes será oferecido, em uma entrevista de devolução, um relatório contendo todos os resultados da avaliação neuropsicológica realizada, ressaltando os domínios cognitivos preservados e, porventura, afetados do indivíduo. Além disto, as famílias receberão os resultados dos testes genéticos realizados, sejam eles alterados ou normais. Caso seja identificado algum problema de saúde ou alguma necessidade educacional específica, você e sua família serão orientados e encaminhados para os serviços disponíveis na comunidade com o objetivo de melhorar sua saúde, bem-estar e capacidades de aprendizagem.

Agradecemos sua atenção e valiosa colaboração, e nos colocando a sua disposição para esclarecer dúvidas que apareçam a qualquer tempo, durante o desenvolvimento deste projeto, subscrevendo-nos.

Atenciosamente,

---

Prof. Dr. Vitor Geraldi Haase  
CRM-MG 29960-T  
Coordenador da Pesquisa  
Professor Associado do Departamento de Psicologia da UFMG  
Av. Antônio Carlos, 6627, FAFICH-UFMG, Sala 4060  
Laboratório de Neuropsicologia do Desenvolvimento  
Tel: (31)34096295, (31)91059589/ E-mail: [haase@fafich.ufmg.br](mailto:haase@fafich.ufmg.br)

---

Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho  
CRM-MG 54.170  
Pesquisadora responsável pela parte genética da pesquisa  
Professora Associada do Departamento de Biologia Geral da UFMG  
Av. Antônio Carlos, 6627, ICB-UFMG

Laboratório de Genética Humana e Médica

Tel: (31)34092598/(31)-91559531 E-mail: [mraquel@icb.ufmg.br](mailto:mraquel@icb.ufmg.br)

Para maiores esclarecimentos:

**Comitê de Ética em Pesquisa(COEP/UFMG)**, na Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º andar/ Campus Pampulha- UFMG

Tel: (31)34094592/ E-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)

**Responsável pela coleta do termo**

Eu, \_\_\_\_\_, CI n° \_\_\_\_\_, declaro que coletei este TCLE. Declaro ainda que expliquei seu conteúdo, informando os participantes de sobre todos os aspectos pertinentes, e respondi às perguntas que me foram feitas.

---

**Participante**

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado (a), declaro ter sido informado (a) sobre os procedimentos e propostas da pesquisa *Avaliação de estratégia de diagnóstico neuropsicológico e genético-molecular dos transtornos do desenvolvimento cognitivo (retardo mental)* e concordo com a participação voluntária da criança \_\_\_\_\_, pela qual sou responsável. Declaro que li este termo e por estar de acordo, assino.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura



