



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA SAÚDE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
CURSO DE MEDICINA**

**MONOGRAFIA**

**FREQUÊNCIA DE MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES  
EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELLECTUAL E/OU  
MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS INVESTIGADOS ATRAVÉS DE  
MLPA**

**Aline Fernandes Alves**

**Thiago Oliveira Silva**

**Campina Grande-PB**

**2016**

**ALINE FERNANDES ALVES**

**THIAGO OLIVEIRA SILVA**

**FREQUÊNCIA DE MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES  
EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELECTUAL E/OU  
MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS INVESTIGADOS ATRAVÉS DE  
MLPA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus Campina Grande, como requisito parcial à obtenção do título de médico.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros**

**Campina Grande-PB**

**2016**

**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do HUAC - UFCG**

A474f

Alves, Aline Fernandes.

Frequência de microdeleções e microduplicações em pacientes com deficiência intelectual e/ou malformações congênitas investigados através de MLPA / Aline Fernandes Alves, Thiago Oliveira Silva. – Campina Grande, 2016.

65f.; il; tab.

Monografia (Graduação em Medicina) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências Médicas, Curso de Medicina, Campina Grande, 2016.

Orientadora: Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros, Dra.

1.Microdeleção. 2.Microduplicação. 3.MLPA. I.Silva, Thiago Oliveira. II.Título.

BSHUAC/CCBS/UFCG

CDU 61::575

**ALINE FERNANDES ALVES**

**THIAGO OLIVEIRA SILVA**

**FREQUÊNCIA DE MICRODELEÇÕES E MICRODUPLICAÇÕES  
EM PACIENTES COM DEFICIÊNCIA INTELLECTUAL E/OU MALFORMAÇÕES  
CONGÊNITAS INVESTIGADOS ATRAVÉS DE MLPA**

Data: 13 de Maio de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professor orientador: Dr<sup>a</sup>. Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

---

Professor convidado 1: Dr<sup>a</sup>. Adriana Farrant Braz

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

---

Professor convidado 2: Ms. Cátia Sueli de Sousa Eufrazino

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

## **AGRADECIMENTOS**

Aos pacientes e seus familiares, por serem exemplos de superação e gentilmente se prontificarem em participar e colaborar com esse estudo.

À professora doutora Paula Medeiros, pela paciência, pelo incentivo e pelo empenho em transmitir seus conhecimentos.

À doutora Fernanda Jehee e sua equipe, pela parceria científica.

Aos nossos familiares, pelo apoio e confiança contínuos.

Aos nossos amigos, pelos momentos de alegrias e angústias compartilhados.

A Elvis Guimarães, Giuliane Dantas, Guilherme Lima, Mansueto Bruno, Marcelo Castro e Victor Rafael, pelas oportunas colaborações.

Às funcionárias Maria José, Oneide, Laudênia e Sônia, pelo generoso auxílio.

À Universidade Federal de Campina Grande, ao Hospital Universitário Alcides Carneiro e à Santa Casa de Belo Horizonte, pelo apoio institucional.

## LISTA DE ABREVIACÕES

a: anos

AGD: atraso global do desenvolvimento

BE: baixa estatura

CN: comprimento ao nascer

CNV/CNVs: variação(ões) do número de cópias (*copy number variation*)

DI: deficiência intelectual

Eco: ecocardiograma

F: feminino

FISH: *fluorescence in situ hybridization*

G: gênero

HUAC: Hospital Universitário Alcides Carneiro

Kb: quilo par de bases

m: meses

M: masculino

Mb: mega par de bases

MFC: malformação(ões) congênita(s)

MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*

P: percentil

PC: perímetro cefálico

PN: peso ao nascer

RNM: ressonância nuclear magnética

AS: Síndrome de Angelman

SAG: Síndrome de Alagille

SCDC: Síndrome de Cri-Du-Chat

SMD: Síndrome de Miller-Dieker

SPW: Síndrome de Prader-Willi

SSM: Síndrome de Smith-Magenis

SUS: Sistema Único de Saúde

SWB: Síndrome de Williams-Beuren

SWH: Síndrome de Wolf-Hirschhorn

TC: transtorno(s) do comportamento

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais síndromes de microdeleção e microduplicação. ....	18
Tabela 2 (1/2). Dados básicos da amostra. ....	26
Tabela 3. Estudos com utilização de MLPA na investigação de deficiência intelectual e/ou malformações congênitas. ....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do MLPA.....	14
Figura 2. Fluxograma de interpretação de CNVs.....	17
Figura 3. Caso 4.....	28
Figura 4. Caso 19.....	28
Figura 5. Caso 35.....	28
Figura 6. Caso 43.....	28
Figura 7. Caso 17.....	29
Figura 8. Caso 31.....	29
Figura 9. Caso 32.....	29
Figura 10. Caso 44.....	29
Figura 11. Caso 7.....	30
Figura 12. Caso 15.....	30
Figura 13. Caso 41.....	30
Figura 14. Caso 36.....	30
Figura 15. Caso 38.....	30



## RESUMO

Técnicas modernas de citogenética molecular, como o MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), permitem a identificação de alterações cromossômicas não visualizadas ao cariótipo, como as microdeleções e microduplicações, geralmente implicadas em fenótipos que incluem deficiência intelectual e malformações congênitas. O presente estudo teve como objetivo realizar a investigação diagnóstica de pacientes com essas manifestações clínicas, sem etiologia definida, assistidos pelos serviços de Genética Médica do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC), Campina Grande, Paraíba. Foram avaliados 52 pacientes, investigados com os *kits* P064, P036 e P070 de MLPA. Em 14/52 (26,92%) pacientes foram identificadas variações do número de cópias (CNVs) patogênicas. Dentro dessa amostra, a prevalência das principais síndromes já conhecidas foi: 4 casos (7,69%) de Síndrome de Williams-Beuren; 2 casos (3,85%) de Síndrome da Deleção 22q11; e 1 caso (1,92%) de cada uma das seguintes síndromes: Cri-du-Chat, Prader-Willi, Smith-Magenis e Wolf-Hirschhorn. Foram detectadas também CNVs menos descritas na literatura, como microduplicação 5q35; microdeleção 13q34; microduplicação 22q13.33; microdeleção 3p26, microduplicação 20p12.2 e microduplicação 20p13. Em 3/52 (5,77%) pacientes foram identificadas CNVs possivelmente benignas, também identificadas nas respectivas genitoras. Em 36/52 (69,23%) não foram identificadas CNVs. Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que o MLPA é uma técnica molecular eficiente para o diagnóstico de microdeleções e microduplicações.

Palavras-chave: microdeleção; microduplicação; MLPA.

## ABSTRACT

Recent molecular cytogenetics technologies, including MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), can detect chromosomal abnormalities non-visualized with conventional cytogenetics (karyotype), such as microdeletions and microduplications, usually associated with phenotypes that include intellectual disability and congenital malformations. This study had aimed to investigate patients with those clinical features, without clear etiology, from the medical genetics service from University Hospital Alcides Carneiro, Paraíba, Brazil. Fifty two patients were evaluated with MLPA kits P064, P036 and P070. In 26,92% were detected pathogenic copy number variations (CNVs), including 4 (7,92%) Williams-Beuren Syndrome; 2 (3,85%) 22q11 Deletion Syndrome; and one case of each Cri-du-Chat, Prader-Willi, Smith-Magenis and Wolf-Hirshhorn syndromes. Plus, less well-known CNVs were found: 5q35 microduplication; 13q34 microdeletion; 22q13.33 microduplication; 3p26 microdeletion, 20p12.2 microduplication and 20p13 microduplication. In 69,23% the results were negative. The results demonstrate that MLPA is an efficient molecular genetic testing to detect chromosomal microdeletions and microduplications.

Key words: microdeletion; microduplication; MLPA.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Objetivos .....	13
1.1.1 Objetivo geral .....	13
1.1.2 Objetivos específicos .....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	13
2.1 Técnica e aplicações do MLPA .....	13
2.1.1 Interpretação de variações do número de cópias .....	16
2.2 Síndromes de microdeleções e microduplicações.....	18
2.2.1 Síndrome de Cri-du-Chat .....	19
2.2.2 Síndrome de Williams-Beuren .....	19
2.2.3 Síndrome de Prader-Willi .....	20
2.2.4 Síndrome de Angelman .....	21
2.2.5 Síndrome de Smith-Magenis .....	21
2.2.6 Síndrome de Alagille .....	22
2.2.7 Síndrome da Deleção 22q11.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.1 Desenho do estudo .....	23
3.2 População e locais do estudo .....	23
3.3 Aproximação da amostra .....	23
3.4 Critérios de inclusão .....	23
3.5 Critérios de exclusão.....	23
3.6 Tamanho amostral.....	24
3.7 Instrumentos e métodos para a coleta de dados:.....	24
3.8 Análise dos dados .....	24
4 RESULTADOS .....	25
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
APÊNDICES .....	46
ANEXO: “ <i>Array-CGH analysis in patients with intellectual disability and/or congenital malformations in Brazil</i> ” .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O espectro do atraso global do desenvolvimento, deficiência intelectual e malformações congênitas são individualmente raros, mas em conjunto afetam um número considerável de indivíduos e famílias (PENA, 2005). Em 40 a 60% dos casos, não é possível firmar um diagnóstico etiológico (VIANA, 2013), embora seja imprescindível para a conduta médica e aconselhamento genético. O cariótipo convencional possibilita o diagnóstico etiológico dessas manifestações em 3% a 15% dos recém-nascidos. (HOCHSTENBACH et al., 2009; RAUCH et al., 2006).

Técnicas modernas de citogenética molecular, como a MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) permitem a identificação de rearranjos cromossômicos menores que 5 Mb, as chamadas microdeleções e microduplicações (KULIKOWSKI, 2013), não visualizáveis através do cariótipo convencional, mas responsáveis por inúmeras síndromes. No entanto, os pacientes do SUS (Sistema Único de Saúde), no Brasil, em geral não têm acesso a esses exames genéticos, exceto quando assistidos por grandes instituições universitárias de pesquisa (PASSOS-BUENO et al., 2014) ou quando oriundos de instituições com menor tradição em pesquisa, se participantes de projetos interinstitucionais.

O Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC) foi indicado pelo Ministério da Saúde como centro de referência estadual pela Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras, o que o faz comportar uma maior amostra populacional e consequentemente, receber uma maior diversidade de casos. Mesmo assim, ainda persiste a dificuldade quanto aos exames. Dentro desse contexto, uma parceria entre a Genética Médica do HUAC e pesquisadores da Santa Casa de Belo Horizonte permitiu a investigação de microdeleções/microduplicações através de MLPA em pacientes do SUS com atraso global do desenvolvimento/deficiência intelectual e/ou malformações congênitas.

A determinação etiológica das manifestações investigadas deve permitir uma melhor assistência médica, especialmente na prevenção das comorbidades, fornecendo opções de terapia ou suporte ao paciente. A incerteza do diagnóstico é algo angustiante para cuidadores, e sua definição traz de certa forma um conforto familiar, além do aconselhamento genético, uma ferramenta importante para definição da prole. O presente estudo foi proposto com a intenção de aprofundar a análise dos resultados locais do HUAC, proporcionar à comunidade médica o conhecimento sobre o perfil epidemiológico das síndromes de microdeleção e microduplicação na população assistida, a fim de buscar melhorias na atenção à saúde de indivíduos afetados por doenças genéticas e facilitar futuros diagnósticos.

## **1.1 Objetivos**

### *1.1.1 Objetivo geral*

Determinar a frequência de microdeleções e microduplicações cromossômicas detectadas através de MLPA em pacientes, independente de idade ou sexo, com deficiência intelectual e/ou malformações congênicas de etiologia não esclarecida.

### *1.1.2 Objetivos específicos*

Analisar e comparar os dados obtidos localmente com os dados da literatura.

Demonstrar casos de microdeleções e microduplicações não descritos, mais complexos ou mais raros.

Demonstrar casos de síndromes reconhecíveis já descritas.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Técnica e aplicações do MLPA**

O atraso global do desenvolvimento ou neuropsicomotor (AGD) e a deficiência intelectual (DI) são caracterizados por prejuízo significativo da função mental e dificuldade nas habilidades adaptativas, sendo que o termo AGD é preferencialmente aplicável em crianças até 5 anos de idade (DSM-5, 2013; MOESCHLER, 2008). Estima-se que o espectro AGD/DI afete 1-3% da população mundial, e que em 25% desses casos a etiologia seja genética (MAULIK et al., 2011; SRIVASTAVA; SCHWARTZ, 2014).

Quando associado a malformações congênicas (MFC) e na ausência de fator ambiental evidente, como uso de drogas na gestação, infecções congênicas, intercorrências perinatais e prejuízo sócio-cultural, o espectro AGD/DI tem causa genética na maioria dos casos (RAFATI et al., 2012). Essas prevalências podem variar conforme a técnica diagnóstica empregada, a seleção da amostra e a inclusão de causas mais comuns de AGD/DI, como a Síndrome de Down e a Síndrome do X Frágil (SABBAG et al., 2013).

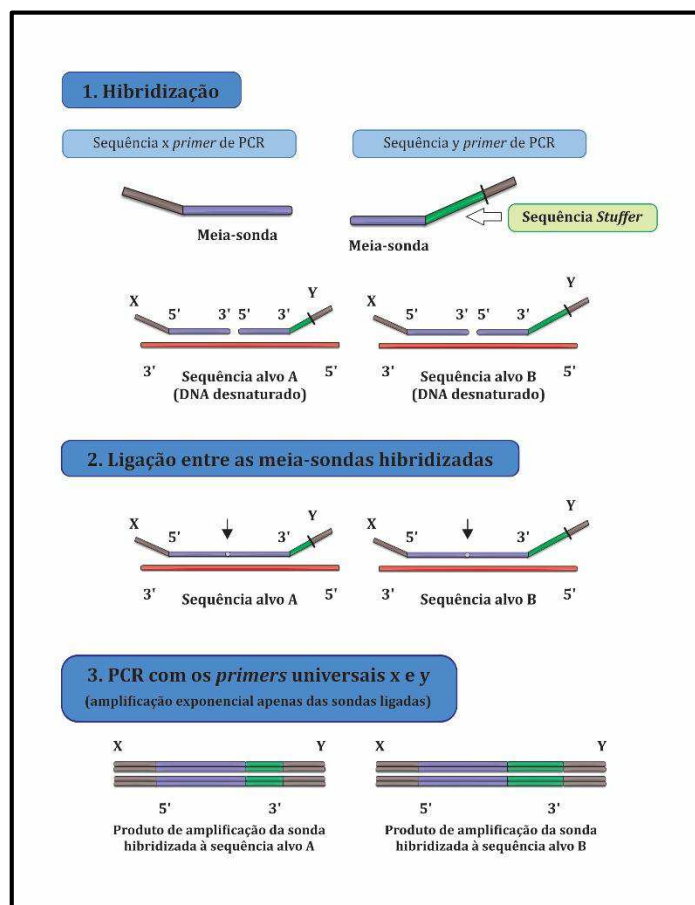
Como o espectro AGD/DI, isolado ou em associação com MFC, representa a maioria das procuras por atendimento especializado em genética médica (RAUCH et al., 2006) e compromete seriamente o desenvolvimento social e intelectual dos indivíduos afetados, o uso da citogenética na investigação etiológica tem sido alvo de diversos estudos. As síndromes de

microdeleção e microduplicação representam um considerável grupo dentre as etiologias já descritas (WATSON et al., 2014).

A técnica de MLPA (do inglês *multiplex ligation-dependent probe amplification* – amplificação múltipla de sonda(s) dependente(s) de ligação, em tradução livre) foi desenvolvida no início da década de 2000, como uma opção de diagnóstico citogenético relativamente simples e barata. Ela tem sido utilizada para o diagnóstico pré-natal de anomalias cromossômicas; em doenças gênicas de prevalência considerável, como a distrofia muscular de Duchenne e as hemofilias; e na análise citogenética de tumores e expressão de oncogenes. A sua maior utilidade clínica, porém, consiste na investigação etiológica de indivíduos com AGD/DI e/ou MFC, com vários estudos publicados (STUPPIA et al., 2012).

O MLPA consiste em uma fase de hibridização entre sondas, que são sequências de nucleotídeos pré-determinadas, e as regiões de interesse do DNA teste; e uma fase de amplificação dessas regiões através de PCR (reação em cadeia da polimerase), com uso de eletroforese para separação dos produtos (SCHOUTEN et al., 2002). A Figura 1 demonstra as etapas dessa técnica.

**Figura 1. Etapas do MLPA.**



Adaptado de: <http://mlpa.com>

Cada sonda de MLPA é composta por duas partes: uma meia-sonda 5' e uma meia-sonda 3'. Por sua vez, cada meia-sonda é composta por uma sequência específica à região alvo e uma sequência *primer* universal (SCHOUTEN et al., 2002). A sequência *primer* universal permite que todas as meias-sondas sejam amplificadas simultaneamente durante a PCR. A meia-sonda 3' ainda possui uma sequência na sua extremidade 5' capaz de hibridizá-la à extremidade 3' da meia-sonda 5' (SHOUTEN et al., 2002). Adicionalmente, uma ou ambas meias-sondas possuem uma sequência *stuffer* específica que permite a diferenciação do comprimento das sondas e do tamanho dos produtos de amplificação durante a eletroforese (STUPPIA et al., 2012). A sequência *stuffer*, assim como a sequência *primer*, não sofre hibridização (SHOUTEN et al., 2002).

Após ser extraído da amostra em análise, o DNA teste é desnaturado e incubado com as sondas do MLPA. As duas meias-sondas reconhecem e se ligam às sequências alvo do DNA teste. A hibridização ocorre apenas se houver complementaridade total entre a meia-sonda e a região alvo. A meia-sonda 5' e a meia-sonda 3' ficam então imediatamente adjacentes e, posteriormente, são ligadas entre si através de uma ligase termoestável, formando uma sequência única. O DNA teste e as sondas hibridizadas são então separados do conteúdo extra e submetidos à PCR (SHOUTEN et al., 2002).

Os produtos de amplificação da PCR são separados por eletroforese capilar, sob condições de desnaturação. A sequência *stuffer* é que possibilita a diferenciação entre as sondas. O peso ou a área dos produtos de amplificação é mensurado através da fluorescência emitida por um dos *primers* da PCR, gerando um pico, que é comparado a amostras de DNA controle, através de software. Como o pico de fluorescência corresponde à quantidade do produto de amplificação, a interpretação, em comparação ao DNA controle, é basicamente que metade do pico corresponde a uma perda (microdeleção de um alelo ou hemizigose) e um pico aumentado em 50% corresponde a um ganho (microduplicação de um alelo). O uso de DNA controle, além de possibilitar a identificação dos rearranjos, certifica se foi utilizada a quantidade adequada de DNA e se a amplificação por PCR foi satisfatória (SHOUTEN et al., 2002; STUPPIA et al., 2012).

Existem no mercado mais de 300 conjuntos ou *kits* de sondas, de acordo com a aplicação clínica requerida (STUPPIA et al., 2012). O *kit* P064 possui sondas correspondentes às regiões das principais síndromes conhecidas de microdeleção. Os *kits* P036 e P070 têm como alvo as regiões subteloméricas, imediatamente proximais aos telômeros, que são as extremidades dos cromossomos. Rearranjos nessas regiões, que são ricas em genes, podem ser responsáveis por 3,5% dos casos de AGD/DI e/ou MFC (FLINT et al., 1995; KNIGHT et al.,

1999; MICHELSON et al., 2011). A combinação dos *kits* P064, P036 e P070 para a investigação etiológica dessas manifestações apresenta boa sensibilidade e custo compensatório em relação a outras técnicas (JEHEE et al., 2011).

Em comparação a outras técnicas de citogenética molecular, como o FISH (*fluorescence in situ hybridization*) e os *array*, o MLPA é uma técnica barata, simples e rápida (SHEN; WU, 2009). É requerida uma pequena quantidade de DNA, e 40 sequências alvo podem ser investigadas simultaneamente, sendo necessário apenas 1 par de *primers* para a amplificação por PCR (SCHOUTEN et al., 2002; STUPPIA et al., 2012). O MLPA também apresenta a vantagem de poder ser combinado a outras técnicas, como análise de metilação (NYGREN et al., 2005).

Entre as limitações do MLPA estão a considerável taxa de contaminação e a variação na qualidade dos resultados conforme a origem tecidual da amostra e o estado de conservação do DNA (KOZLOWSKI; JASINSKA; KWIATKOWSKI, 2008; STUPPIA et al., 2012). O MLPA usualmente não é capaz de detectar mutações em um único éxon, que podem representar mutações patogênicas ou polimorfismos; perda de heterozigosidade; e rearranjos equilibrados, uma vez que eles não alteram a quantidade de informação genética, sendo necessária a complementação com FISH em alguns casos (SCHOUTEN et al., 2002; STUPPIA et al., 2012).

### 2.1.1 *Interpretação de variações do número de cópias*

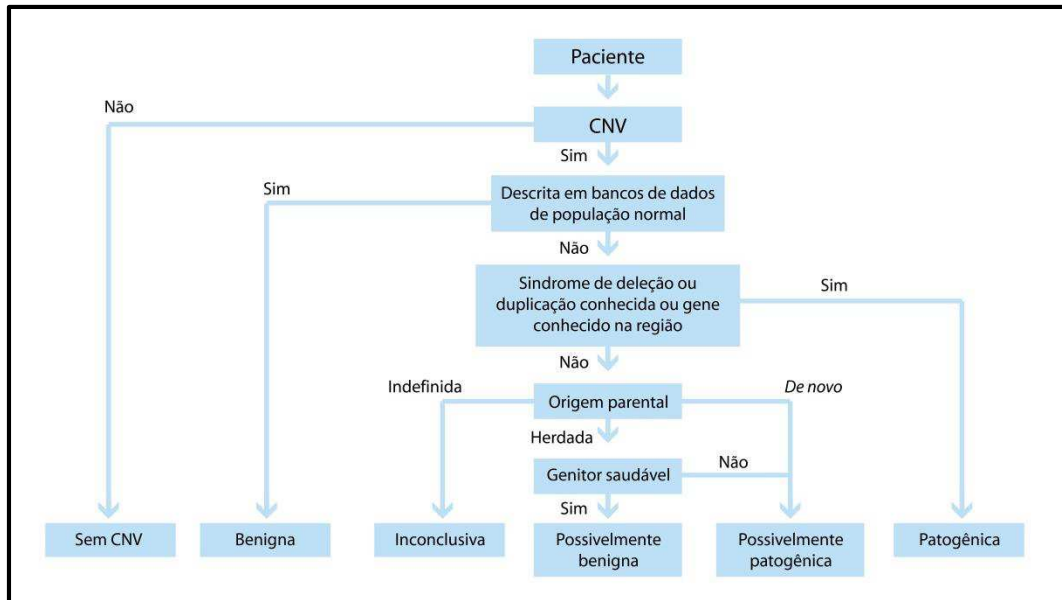
Técnicas modernas de estudo do genoma humano evidenciaram que nele existem diversas regiões suscetíveis a rearranjos cromossômicos, gerando as CNVs (do inglês *copy number variations* – variações do número de cópias, em tradução livre). Estima-se que 12% do genoma de qualquer indivíduo é composto por CNVs, demonstrando que muitos desses rearranjos são benignos (REDON et al., 2006). A interpretação das CNVs como alterações patológicas ou benignas está inclusa então na metodologia de algumas técnicas de citogenética molecular, incluindo o MLPA. Existem vários bancos de dados *online* onde os pesquisadores podem fazer consultas sobre os rearranjos já identificados, comparando as descrições prévias e os resultados de suas amostras (RIEGEL, 2014). A Figura 2 descreve de maneira simplificada o fluxograma usual na interpretação das CNVs.

Por definição, CNVs benignas são aquelas já descritas em indivíduos saudáveis, em pelo menos dois relatos diferentes, onde as regiões são correspondentes em no mínimo 50% e as regiões não correspondentes em menos de 100 Kb. CNVs patogênicas são aquelas



previamente descritas em síndromes de microdeleção, microduplicação ou que contenham genes associados a alguma doença (GIJSBERS; SCHOUMANS; RUIVENKAMP, 2011).

**Figura 2. Fluxograma de interpretação de CNVs.**



Adaptado de: Kulikowski (2013).

CNVs de significado incerto são aquelas que não estão registradas nos bancos de dados, seja como benignas ou patogênicas. Nesses casos, é necessária a avaliação dos genitores. Quando a CNV é herdada de algum genitor saudável, ela é considerada possivelmente benigna. A patogenicidade não pode ser descartada, pois os rearranjos, mesmo as deleções, podem apresentar penetrância e expressividade variáveis ou causar a manifestação fenotípica de uma mutação recessiva ou *imprinting* presente no alelo homólogo (BUYSSSE et al., 2009; KULIKOWSKI, 2013). Quando a CNV é *de novo* – ou seja, ocorre somente na linhagem germinativa de algum genitor ou no zigoto – ou está presente em algum genitor que compartilha o fenótipo patológico do probando, considera-se como possivelmente patogênica, principalmente em casos de deleção; ou, quando não há amostra dos genitores disponível, a CNV é classificada como inconclusiva (KULIKOWSKI, 2013).

No MLPA, dois fatores dificultam a interpretação das CNVs: dependendo do *kit* utilizado, não é possível determinar a extensão da microdeleção/duplicação impossibilitando a comparação da região afetada com os bancos de dados disponíveis; a presença de SNPs (*single nucleotide polymorphism*) pode simular uma deleção e impedir a hibridação da sonda com a região alvo, o que torna a análise dos genitores essencial (KULIKOWSKI, 2013). No caso das regiões subtelo méricas, o uso combinado dos *kits* P036 e P070 contribui para a

interpretação das CNVs, pois uma mesma alteração observada em sondas diferentes afasta a possibilidade de falsos negativos e falsos positivos (JEHEE et al., 2011).

## 2.2 Síndromes de microdeleções e microduplicações

As síndromes de microdeleção/microduplicação cromossômica são causadas por variações submicroscópicas no número de cópias de determinada região do genoma e são uma causa comum de AGD/DI, MFC e distúrbios neuropsiquiátricos (DEAK et al., 2011). As duplicações geralmente resultam em fenótipos mais brandos, ou mesmo ausentes, quando comparadas com deleções nas mesmas regiões genômicas (KULIKOWSKI, 2013).

A Tabela 1 resume as principais síndromes de microdeleção/duplicação descritas.

**Tabela 1. Principais síndromes de microdeleção e microduplicação.**

SÍNDROME	LOCALIZAÇÃO	REARRANJO	PREVALÊNCIA
Deleção 1p36*	1p36.13-33	Deleção	1:5000-10.000
Deleção 1q21.1	1q21.1	Deleção	Rara
Deleção 2p16.1-p15	2p16.1-p15	Deleção	Rara
Deleção 2q37	2q37	Deleção	Rara
Wolf-Hirschhorn*	4p16.3	Deleção	1:50.000
Cri-du-Chat*	5p15.3, 15.2	Deleção	1:15.000-50.000
Deleção 5p			
Síndrome de Sotos*	5q35	Deleção	1:10.000 - 1:50.000
Grieg cefalopolissindactilia	7p13	Deleção	1-9 : 1.000.000
	7p14.1		
Saethre-Chatzen*	7p21-22	Deleção	1-9 : 100.000
Williams*	7q11.23	Deleção	1:7.500-20.000
Langer-Giedion*	8q24.1	Deleção	Rara
Microdeleção 9q22.3	9q22.3	Deleção	Rara
Kleefstra	9q34.3	Deleção	Rara
Potocki-Shaffer	11p11.2	Deleção	Rara
WAGR*	11p13	Deleção	1:500.000
Jacobsen, Deleção terminal 11q	11q24.1	Deleção	1:100.000
Retinoblastoma	13q14	Deleção	Rara
Microdeleção 15q13.3	15q13.3	Deleção	1:40.000
Microdeleção 15q24	15q24	Deleção	Muito Rara
Surdez neurosensorial e infertilidade masculina	15q	Deleção	Desconhecida
Prader-Willi*	15q11-13	Deleção	1:10.000-25.000
Angelman			1:12.000-20.000
Deleção 16p11.2	16p11.2	Deleção	3:10.000
Rubinstein-Taybi*	16p13.3	Deleção	1:100.000-125.000
Miller-Dieker*	17p13.3	Deleção	Rara
Koolen-De Vries	17q21.31	Deleção	1:16.000
Smith-Magenis*	17p11.2	Deleção	1:15.000-25.000
Charcot-Marie-Tooth	17p11.2-12	Duplicação	Desconhecida
Tipo 1a			
Alagille*	20p12	Deleção	1:70.000
Cat-eye	22q11	Duplicação	1-9: 100 000
Deleção 22q11.2*	22q11.2	Deleção	1:4.000-6.000
Phelan-McDermid*	22q13.3	Deleção	Poucos
Microftalmia com defeito linear na pele	Xp22	Deleção	Rara
Kallmann	Xp22.3	Deleção	1-9 / 100.000
Fator de azoospermia / infertilidade do cromossomo y	Yq11.23	Deleção	1:2.000-3.000 Homens

Adaptado de CROTWELL et al. (2012); HE et al. (2014). Legenda: \*síndromes investigadas pelo *kit* P064 (<https://mlpa.com>)

### 2.2.1 Síndrome de Cri-du-Chat

A Síndrome de Cri-du-Chat (SCDC) é causada pela perda total ou parcial do braço curto do cromossomo 5. Apresenta herança autossômica dominante, embora mais 80% dos casos sejam por mutações *de novo*. Sua incidência é de 1:15.000 a 1:50.000 (MAINARDI, 2006; SHAPIRO et al., 2014). Mais de 90% dos pacientes possuem uma deleção na região crítica 5p15.2, que envolve o gene *DNAH5*. Um importante diagnóstico diferencial é a Discinesia Ciliar Primária, que afeta a mesma região (SHAPIRO et al., 2014).

As manifestações incluem choro agudo na infância, semelhante ao miado de um gato, originando o nome da síndrome; baixo peso ao nascimento; microcefalia; dismorfismos faciais; hipotonia; AGD/DI graves. Malformações cardíacas, renais e oculares também são descritas (RODRIGUEZ-CABALLERO et al., 2010). Problemas respiratórios são comumente descritos. Afecções respiratórias, como pneumonia, bronquite e otite média, são comuns, incluindo no período neonatal, e estão associadas a hipotonia e broncoaspiração de repetição (SHAPIRO et al., 2014).

### 2.2.2 Síndrome de Williams-Beuren

A prevalência da Síndrome de Williams-Beuren (SWB) é de 1:7.500 a 1:20.000 (STROMME; BJORNSTAD; RAMSTAD, 2002). A síndrome é decorrente de microdeleções em heterozigose de genes contíguos na região 7q11.23 (PEOPLES et al., 2000). A maioria das deleções é *de novo*, tendo baixo risco de recorrência (MORRIS; TOMAS; GREENBERG, 1993). Os pacientes afetados apresentam AGD/DI e dismorfismos faciais típicos, que incluem fronte ampla, edema periorbital, estrabismo, íris estrelada, ponte nasal deprimida, nariz curto e arrebitado, filtro nasal longo, bochechas proeminentes e lábios grossos (KULIKOWSKI, 2013).

Estenose aórtica supravalvar é encontrada em aproximadamente 70% dos pacientes, e hipertensão arterial em cerca de 50%. A mortalidade cardiovascular é 25 a 100 vezes maior em pacientes com SWB que em indivíduos saudáveis (WESSEL et al., 2004). Afecções endócrinas, voz rouca, epilepsias (em fenótipos mais graves) e hipersociabilidade também são características prevalentes (POBER, 2010; VIANA et al., 2013).

Apesar da hipersociabilização, os pacientes podem desenvolver, principalmente na vida adulta, transtorno de ansiedade, fobias, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade. Em um aparente paradoxo, a sensibilidade a certos ruídos (especialmente tempestades e fogos

de artifício) desenvolve-se em até 90% dos casos, mas a apreciação musical é quase universal em pacientes com SWB (POBER, 2010).

A variabilidade fenotípica na SWB sugere que outros fatores, além da deleção, possam estar envolvidos, como efeitos de posição das CNVS e penetrância reduzida para fenótipos específicos. (EUTENEUER et al., 2013). Microdeleções menores que 1,0 Mb, estão frequentemente associadas a características clínicas mais leves, enquanto que as deleções maiores que 2,0Mb estão associadas a fenótipos mais graves (GAGLIARDI et al., 2003).

Estudos recentes indicam que a deleção do gene *ELN* é estabelecida como responsável para o fenótipo cardiovascular, mas a contribuição exata de outros genes para o fenótipo da SWB permanece indefinida. Há evidências sugerindo que o gene *LIMK1* pode desempenhar um papel no perfil cognitivo. Estudos adicionais em pacientes com deleções atípicas são necessários para melhor caracterizar a correlação genótipo-fenótipo (EUTENEUER et al., 2013).

### 2.2.3 Síndrome de Prader-Willi

A Síndrome de Prader-Willi (SPW) trata-se de uma doença genética de etiologia complexa, causada pela falta de expressão de genes na região cromossômica 15q11.2-q13 herdada do pai. Tem uma prevalência de 1:10.000 a 1:25.000 nascidos vivos e o espectro da mutação pode ser decorrente de deleção *de novo* de origem paterna (70-75%) em 15q11-q13, dissomia uniparental materna (25-30%) ou defeito do centro de *imprinting* (1%). A análise de metilação do DNA diferencia geneticamente a SPW da Síndrome de Angelman, associada à mesma região cromossômica, mas de origem materna, embora a clínica seja bastante dissociativa (ANGULO; BUTLER; CATALETTO, 2015; BUITING et al., 2014).

A apresentação clínica é de baixo peso ao nascimento, hipotonia, principalmente no período neonatal, sucção débil e, conseqüentemente, dificuldade de crescimento no início da infância. Após essa fase, os pacientes apresentam hiperfagia e obesidade, baixa estatura, ADG/DI, dismorfismos (diâmetro bifrontal estreito, fissuras palpebrais em forma de amêndoa, lábio superior fino, rima bucal deprimida, mãos e pés pequenos) e comportamento obsessivo-compulsivo (ANGULO; BUTLER; CATALETTO, 2015; CASSIDY; DRISCOLL, 2009).

A maior parte do fenótipo decorre da disfunção hipotalâmica, responsável pela hiperfagia, instabilidade da temperatura, alto limiar da dor, hipersonia e múltiplas anormalidades endócrinas, incluindo deficiência de hormônio de crescimento e hormônio estimulante da tireoide, hipogonadismo e insuficiência adrenal central. A maioria dos casos de

ambos os sexos apresenta infertilidade. A obesidade e suas complicações são as principais causas de morbidade e mortalidade na SPW (ANGULO, BUTLER, CATALETTO, 2015).

#### 2.2.4 Síndrome de Angelman

A Síndrome de Angelman (AS) tem prevalência em nascidos vivos de aproximadamente 1:12.000 a 1:20.000, relacionada à mesma região da SPW na maioria dos casos. A etiologia pode ser decorrente de deleção materna 15q11-q13 (75%); dissomia uniparental paterna (1-2%); defeito do centro imprinting (3%); variantes no gene *UBE3A* (5-10%); ou de origem desconhecida (10-15%). Nesse último caso, é importante excluir diagnósticos diferenciais, já que existe uma sobreposição fenotípica com várias outras síndromes genéticas (BUITING et al., 2014). A deleção geralmente apresenta um fenótipo mais grave, enquanto a dissomia uniparental e defeitos do centro de *imprinting*, um fenótipo mais brando (MARGOLIS et al., 2015).

A SA é caracterizada por AGD/DI grave, observado desde o primeiro ano de vida, microcefalia, disfunção motora (tremores, movimentos bruscos e ataxia de marcha), redução ou ausência da fala, hiperatividade, convulsões frequentes (mais de 80% dos casos e de início precoce), distúrbios do sono e aparência constante de felicidade, incluindo riso impróprio e excitabilidade. Apesar do fenótipo característico, a confirmação genética assegura o diagnóstico e também auxilia no esclarecimento da relação genótipo-fenótipo (BUITING et al., 2014; DAGLI; BUITING; WILLIAMS, 2012; MARGOLIS et al., 2015).

#### 2.2.5 Síndrome de Smith-Magenis

A Síndrome de Smith-Magenis (SSM) é causada por uma microdeleção em 17p11.2. Sua prevalência é de 1:15.000 a 1:25.000 nascidos vivos (JUYAL et al., 1995), de igual distribuição entre os sexos. É caracterizada por AGD/DI moderado a severa; comportamento autodestrutivo, agressivo e impulsivo, presente em 70-97% dos casos; distúrbios do sono; obesidade; alterações esqueléticas e craniofaciais (ELSEA; GIRIRAJAN, 2008; HICKS et al., 2008; SLONEEM et al., 2011).

Aproximadamente 90% dos pacientes possuem microdeleções na região 17p11.2, enquanto 10% possuem mutações no gene *RAI1*, que levam à formação de uma proteína truncada ou à perda da função. A grande maioria dos casos é de deleção *de novo*, com baixo risco de repetição (ELSEA; WILLIAMS, 2011).

### 2.2.6 Síndrome de Alagille

A prevalência estimada da Síndrome de Alagille (SAG) é de 1:70.000 e a incidência 1:30.000-50.000 nascidos vivos, com provável frequência subestimada devido ao fenótipo variável. Mais de 97% dos pacientes apresentam mutação, incluindo deleção, do gene *JAG1*, localizado em 20p12.2, e uma pequena parcela, no gene *NOTCH2*. Por ser uma doença de herança autossômica dominante, tem risco de recorrência de 50% para filhos de afetados (AHN et al., 2015; LEONARD et al., 2013; TURNPENNY; ELLARD, 2012).

A clínica da SAG é multissistêmica e inclui: colestase crônica, devido à redução de ductos biliares; estenose de artéria pulmonar; dismorfismos faciais, como fronte ampla, olhos fundos e amplamente espaçados, nariz em sela, queixo pequeno e pontudo; vértebras em formato de borboleta; retinopatia pigmentar; hemorragias intracranianas; e malformações renais (AHN et al., 2015; TURNPENNY; ELLARD, 2012). Os achados são altamente variáveis em gravidade. Uma considerável parcela dos pacientes pode evoluir com complicações hepáticas graves (CHO et al., 2015).

### 2.2.7 Síndrome da Deleção 22q11

A Síndrome da Deleção 22q11, também conhecida como Síndrome DiGeorge, Velocardiofacial e CATCH22, é a síndrome de microdeleção mais comum, com uma prevalência estimada em 1:4.000 a 1:6.000 nascidos vivos, e possivelmente 1:2.000, considerando que as estatísticas podem subestimar pacientes que apresentam anomalias letais e pacientes assintomáticos e/ou com características leves (CANCRINI et al., 2014; GENNERY, 2012). Em pesquisa anterior realizada no Brasil, a deleção 22q11.21 foi a alteração mais frequente, observada em 12/261 (4.6%) casos, representando 21,1% de todos os diagnósticos da amostra (JEHEE et al., 2011). A herança é autossômica dominante, mas cerca de 90% dos casos é proveniente de uma deleção *de novo* (CANCRINI et al., 2014).

As alterações fenóticas incluem mais de 190 manifestações, incluindo dismorfismos faciais, malformações cardíacas, renais, oculares, laríngeas e esqueléticas, insuficiência velofaríngea com ou sem fenda palatina, hipoplasia do timo, hipoplasia da paratireóide e hipocalcemia, deficiência auditiva, AGD/DI, transtornos psiquiátricos e alteração imunológica. O diagnóstico antes dos 2 anos de idade está mais associado com a presença de anomalias cardíacas e hipocalcemia neonatal. Após 2 anos, as características clínicas mais

prevalentes são ADG, defeitos cardíacos menores, infecções recorrentes e dismorfismos faciais. Tal variabilidade fenotípica, já relatada inclusive em gêmeos monozigóticos, dificulta a associação genótipo-fenótipo (CANCRINI et al., 2014; HACIHAMDIOGLU, HACIHAMDIOGLU, DELIL, 2015; WILLIAMS, 2011).

A deleção ou haploinsuficiência dos genes da região 22q11 compromete a morfogênese dos arcos faríngeos, coração, esqueleto e cérebro. No entanto, ainda não existe uma correlação totalmente definida entre o tamanho ou tipo de deleção e o fenótipo resultante (HACIHAMDIOGLU; HACIHAMDIOGLU; DELIL, 2015).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do estudo**

Estudo observacional transversal descritivo.

#### **3.2 População e locais do estudo**

Pacientes assistidos pelos serviços de Genética Médica do Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC), Campina Grande, Paraíba.

#### **3.3 Aproximação da amostra**

Avaliação clínica (anamnese e exame físico) de pacientes atendidos no ambulatório de Genética Médica no HUAC, encaminhados por livre demanda, entre dezembro de 2012 e dezembro de 2014.

#### **3.4 Critérios de inclusão**

Paciente, independente de sexo e idade, que apresentava deficiência intelectual e/ou malformações congênitas sem etiologia definida.

#### **3.5 Critérios de exclusão**

Não comparecimento na data previamente agendada para a coleta de sangue.

### 3.6 Tamanho amostral

A amostra final, após exclusão dos pacientes omissos, foi de 52 pacientes.

### 3.7 Instrumentos e métodos para a coleta de dados:

Foram coletados de dados de identificação, epidemiológicos e clínicos através de formulário padrão.

Foram coletadas fotografias do probando e eventualmente dos genitores.

Foi coletada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após explicação dos objetivos e procedimentos da pesquisa e da concordância do pai, mãe ou responsável legal na participação de seu(sua) filho(a) ou tutelado(a) na pesquisa, em caso de menor de 18 anos ou maior de 18 anos incapaz, ou do próprio paciente, em caso de maior de 18 anos. Coletada também assinatura do Termo de Assentimento, em caso de menor de 18 anos ou maior de 18 anos incapaz, se possível.

Foi coletada amostra de sangue do probando e, quando possível, dos genitores.

As amostras e cópias dos termos e formulários foram enviadas para a Santa Casa de Belo Horizonte, onde foram realizados os MLPA, com uso dos *kits* P064, P036 e P070.

### 3.8 Análise dos dados

As microdeleções/duplicações detectadas no MLPA foram interpretadas de acordo com os dados clínicos do paciente e com os resultados dos genitores, conforme a metodologia do exame.

Os laudos finais dos exames foram analisados estatisticamente para demonstrar a frequência de rearranjos detectados na amostra, através do software SSPS (*Statistical Product and Service Solutions*) versão 17.0.

Casos selecionados, cujas microdeleções/duplicações não tenham sido previamente descritas ou tenham maior raridade ou complexidade, foram avaliados e demonstrados com maior destaque.

Casos de síndromes reconhecíveis previamente descritas foram demonstrados em grupo.



## 4 RESULTADOS

A amostra foi composta de 52 pacientes (Tabela 2), que atenderam aos critérios de inclusão, isto é, apresentaram deficiência intelectual e/ou malformações congênitas sem etiologia definida, independente de sexo e idade, sendo 22/52 (42,31%) do gênero masculino e 30/52 (57,69%) do feminino. A idade média dos pacientes foi de 9 anos e 3 meses (DP  $\pm$  6 anos e 10 meses), com variabilidade de 5 meses a 32 anos e 2 meses.

AGD/DI e MFC foram as manifestações clínicas mais prevalentes, cada uma presente em 80,77% dos pacientes, seguidas por transtornos do comportamento, como labilidade emocional, agressividade e dificuldade de sociabilização (21,15%), epilepsia (15,38%) e baixa estatura (11,54%). Não foram aplicados questionários ou escores de gravidade de AGD/DI, mas em todos os pacientes com essa manifestação havia outras manifestações associadas, sugerindo um quadro sindrômico.

Em 50/52 (96,15%) pacientes foi realizado MLPA com 1 *kit* (P064) para as principais síndromes de microdeleção e 2 *kits* (P036 e P070) para regiões subteloméricas. Em 2 pacientes - casos 18 e 32 - foi realizado MLPA apenas com o *kit* P064, pois as manifestações clínicas sugeriram fortemente os diagnósticos de Síndrome da Deleção 22q11 e Síndrome de Prader-Willi, respectivamente. Os resultados confirmaram essas hipóteses diagnósticas.

Em 14/52 (26,92%) pacientes foram identificadas CNVs patogênicas. Dentro da amostra, a prevalência de síndromes conhecidas foi: 2 casos (3,85%) de Síndrome da Deleção 22q11; 1 caso (1,92%) de Síndrome do Cri-du-chat; 1 caso (1,92%) de Síndrome de Prader-Willi; 1 caso (1,92%) de Síndrome de Smith-Magenis; 4 casos (7,69%) de Síndrome de Williams-Beuren; 1 caso (1,92%) de Síndrome de Wolf-Hirschhorn. Em todos esses casos, a queixa principal na primeira consulta era uma manifestação da síndrome de microdeleção/microduplicação, descrita na literatura.

Em 3/52 (5,77%) pacientes - casos 31, 36 e 38 - foram identificadas CNVs possivelmente benignas. Nos 3 casos, a CNV foi identificada no MLPA da respectiva genitora, nenhuma com quadro fenotípico semelhante aos dos probandos. No caso 31, além da CNV possivelmente benigna, também foram identificadas 2 CNVs patogênicas, associadas a Síndrome de Wolf-Hirschhorn. No caso 36, a região envolvida corresponde a da Síndrome de Miller-Dieker. Em 36/52 (69,23%) não foram identificadas CNVs.

**Tabela 2 (1/2). Dados básicos da amostra.**

Caso	Idade	G	Cariótipo	Resultado do MLPA (quantidade)	Rearranjos detectados (síndrome descrita)	Queixa principal	Manifestações clínicas adicionais
1	9a 2m	M	46, XX	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC, BE, Lipodistrofia
2	14a 6m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Sobrepeso	AGD/DI, TC
3	2a 4m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Displasia esquelética	MFC, BE
4	1a 6m	F	nr	CNV patogênica (1)	Microdeleção 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren)	MFC	AGD/DI
5	32a 2m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Hipogonadismo hipogonadotrófico	AGD/DI, MFC, Alterações à neuroimagem
6	8a 8m	F	46, XX	CNV patogênica (1)	Microduplicação 5q35	BE	AGD/DI, MFC, TC
7	9a 9m	F	46, XX	CNV patogênica (1)	Microdeleção 13q34	MFC	AGD/DI, Epilepsia, TC
8	1a 8m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Diabetes mellitus neonatal	AGD/DI, MFC, Macrosomia
9	2a 4m	F	46, XX	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	MFC	-
10	9a 3m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
11	3a 7m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
12	22a 10m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Puberdade precoce	AGD/DI, Epilepsia
13	22a 9m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
14	5a 2m	F	46, XX	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	MFC	-
15	7a 10m	F	46, XX	CNV patogênica (1)	Microduplicação 22q13.33	MFC	AGD/DI, TC
16	6a 2m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Regressão neurológica	MFC
17	11a 11m	M	46, XY	CNV patogênica (1)	Microdeleção 17p11.2 (Síndrome de Smith-Magenis)	AGD/DI	MFC, TC
18	11a	F	nr	CNV patogênica (1)	Deleção 22q11.21 (Síndrome da Deleção 22q11)	Plaquetopenia	AGD/DI, MFC, Epilepsia
19	12a	M	nr	CNV patogênica (1)	Microdeleção 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren)	MFC	AGD/DI
20	10a 11m	F	46, XX	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	MFC	AGD/DI
21	5a 1m	M	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	Obesidade, TC
22	17a 1m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Baixa estatura	MFC, Espectro autista, Alterações à neuroimagem
23	23a 8m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	TC
24	17a 1m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
25	4a 3m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Puberdade precoce	AGD/DI
26*	7a 5m	F	46,XX,9qh+	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	MFC	Alta estatura
27	6a 8m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Epilepsia	AGD/DI
28	12a 3m	M	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	BE	AGD/DI

Legenda: a = anos; m = meses; G = gênero; F = feminino, M = masculino; nr= não realizado; CNV= Variação do número de cópias; AGD = atraso global do desenvolvimento; DI = deficiência intelectual; MCF= malformação(ões) congênita(s); BE = baixa estatura; TC = transtorno do comportamento

\*A alteração detectada no cariótipo (46,XX,9qh+) é um polimorfismo e não justifica as manifestações clínicas do caso.

**Tabela 2 (2/2). Dados básicos da amostra.**

Caso	Idade	G	Cariótipo	Resultado do MLPA (quantidade)	Rearranjos detectados (síndrome descrita)	Queixa principal	Manifestações clínicas adicionais
29	15a 11m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	BE	ADG/DI, MFC, Deficiência auditiva
30	14a 4m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Hipocalcemia	ADG/DI
31	3a 2m	F	nr	CNV patogênica (2) CNV possivelmente benigna (1)	Microdeleção 4p16, microduplicação 8p23 (Síndrome de Wolf-Hirschhorn) Microduplicação Xp22.3	Epilepsia	ADG/DI, MFC, BE
32	1a 11m	F	nr	CNV patogênica (1)	Microdeleção 15q11-q12 (Síndrome de Prader-Willi)	Obesidade	ADG/DI, MFC
33	1a 7m	F	46, XX	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	MFC	ADG/DI
34	1a 4m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	MFC	-
35	7a 4m	M	nr	CNV patogênica (1)	Microdeleção 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren)	AGD/DI	MFC
36	1a 5m	F	46, XX	CNV possivelmente benigna (1)	Microdeleção 17p13.3 (Síndrome de Miller-Dieker)	MFC	ADG/DI, Epilepsia, TC
37	6a 3m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC, Epilepsia, Alterações à neuroimagem
38	10a 1m	M	nr	CNV possivelmente benigna (1)	Duplicação 20qter	AGD/DI	MFC, TC
39	14a	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Alta estatura	MFC
40	5a 6m	M	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
41	9a 7m	M	nr	CNV patogênica (3)	Microdeleção 3p26, microduplicação 20p12.2, microduplicação 20p13	MFC	ADG/DI
42	14a 5m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
43	1a 2m	M	nr	CNV patogênica (1)	Microdeleção 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren)	MFC	ADG/DI
44	5m 24d	F	nr	CNV patogênica (1)	Microdeleção 22q11.21 (Síndrome da Deleção 22q11)	Tremores	MFC
45	7a 1m	F	46, XX	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC, TC
46	2a 8m	M	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	TC
47	10a 9m	F	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	Epilepsia, Hipotireoidismo
48	6a 11m	F	46, XX	CNV patogênica (1)	Microdeleção 5pter (Síndrome de Cri-du-Chat)	AGD/DI	MFC
49	17a 2m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Alta estatura	ADG/DI, MFC
50	11a 4m	M	nr	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
51	17a 11m	F	46, XX	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	AGD/DI	MFC
52	3a 8m	M	46, XY	Sem CNV	Sem alterações nas regiões estudadas	Espectro autista	MFC

Legenda: a = anos; m = meses; G = gênero; F = feminino, M = masculino; nr= não realizado; CNV= Variação do número de cópias; AGD = atraso global do desenvolvimento; DI = deficiência intelectual; MCF = malformação(s) congênita(s); BE = baixa estatura; TC = transtorno(s) do comportamento.

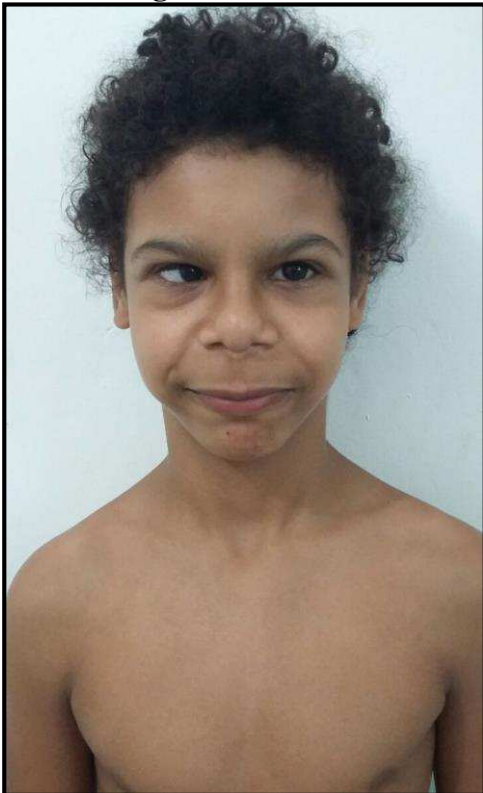
**Figura 3. Caso 4**



**Figura 4. Caso 19.**



**Figura 5. Caso 35**



**Figura 6. Caso 43.**



Legenda das Figuras 3, 4, 5 e 6: Casos detectados de microdeleção 7q11.23 (Síndrome de Williams-Beuren).



**Figura 7. Caso 17****Figura 8. Caso 31.****Figura 9. Caso 32****Figura 10. Caso 44.**

Legenda das Figuras 7, 8, 9, 10: Casos detectados de microdeleção 17p11.2 (Síndrome de Smith-Magenis); microdeleção 4p16 e microduplicação 8p23 (Síndrome de Wolf-Hirschhorn); microdeleção 15q11-q12 (Síndrome de Prader-Willi); microdeleção 22q11.2 (Síndrome da Deleção 22q11), respectivamente.

**Figura 11. Caso 7****Figura 12. Caso 15.****Figura 13. Caso 41.****Figura 14. Caso 36****Figura 15. Caso 38.**

Legenda das Figuras 11, 12 e 13: Casos detectados de microdeleção 13q34; microduplicação 22q13.33; Microdeleção 3p26, microduplicação 20p12.2, microduplicação 20p13, respectivamente.

Legenda das Figuras 14 e 15: Casos detectados de microdeleção 17p13.3, região da Síndrome de Miller-Dieker, e microduplicação 20qter, respectivamente. Por serem herdadas, as CNVs detectadas nesses casos são consideradas possivelmente benignas.

## 5 DISCUSSÃO

A prevalência de rearranjos cromossômicos em pacientes com AGD/DI, associado ou não a alterações dismórficas, varia conforme a técnica e a abrangência dos *kits* ou sondas utilizados, além da seleção da amostra (RAUCH et al., 2006; SABBAG et al., 2013; SHAFFER et al., 2007; VAN KARNEBEEK et al., 2005). Isto pode ser demonstrado na Tabela 3, onde se observa que, apesar de em todos os estudos ter sido utilizada a técnica MLPA, a prevalência de microdeleções/microduplicações variou de 4,2% a 31,8%, basicamente dependente da utilização de diferentes *kits*.

**Tabela 3. Estudos com utilização de MLPA na investigação de deficiência intelectual e/ou malformações congênitas.**

Estudo	<i>Kits</i> de MLPA	Amostra	Prevalência de CNVs	Prevalência de CNVs patogênicas
Kirchhoff et al (2007)	P064	428	9,11%	9,11%
Stegmann et al (2008)	P036 e P070	466	11,37%	5,36%
Jehee et al (2011)	P064, P036 e P070	261	31,80%	20,69%
Pohovski et al (2013)	P045*, P036 e P070	150	14%	11,33%
Sabbag et al (2013)	P064	57	7,02%	7,02%
Boggula et al (2014)	P245*, P036 e P070	203	9,36%	9,36%
Dutra et al (2014)	P064, P036 e P070	416	22,35%	15,14%**
Medina et al (2014)	P036 e P070	119	4,20%	3,36%

Legenda: \**Kit* para as principais síndromes de microdeleção, com maior quantidade de regiões investigadas em relação ao *kit* P064 (<https://mlpa.com>). \*\*Prevalência mínima, pela indisponibilidade de amostras de todos os genitores. CNV(s) = variação(s) do número de cópias.

Em nosso estudo encontramos uma prevalência de CNVs patogênicas (26,92%), valor superior à reportada na literatura. Em um estudo brasileiro com 261 indivíduos (132 homens e 129 mulheres), publicado por Jehee et al. (2011), utilizando os mesmos *kits* de MLPA (P064, P070 e P036) do presente estudo, foram detectados rearranjos cromossômicos em 83 pacientes (31,8%), dos quais 54 (20,69%) possuíam rearranjos patogênicos. Consideramos que dois fatores podem ter contribuído para uma prevalência mais elevada no presente estudo: 1) o local do estudo é um dos poucos hospitais públicos da região com ambulatório especializado em Genética Médica, atendendo a uma grande demanda de pacientes, inclusive de municípios de outros estados, o que implica na seleção natural de pacientes cujos pais reconhecem a real necessidade de uma avaliação genética e persistem na procura pelo

atendimento; 2) o local do estudo é um hospital universitário, pertencendo a esfera de atenção terciária dentro do SUS, o que contribui para que a demanda passe por uma triagem, não sistematizada, realizada por outros profissionais médicos. Essas hipóteses podem ser fundamentadas pelo fato de outros pacientes do HUAC terem participado da amostra do estudo de Jehee et al. (2011) junto com pacientes de outros serviços/estados, tendo sido obtida uma prevalência inferior àquela do atual estudo, como referido acima, apesar da utilização da mesma técnica e *kits*.

Outro estudo brasileiro, publicado por Sabbag et al. (2013), utilizando apenas o *kit* P064, identificou uma prevalência de microrrearranjos de apenas 7,02%, o que é esperado pela não utilização de *kits* subteloméricos. Um terceiro estudo no Brasil, realizado por Dutra et al. (2014), detectou um resultado mais próximo do nosso estudo, 93/416 (22,35%), utilizando também os *kits* P064, P036 e P070.

O estudo de Jehee et al. (2011) também demonstrou a viabilidade do MLPA, como uma técnica relativamente barata e com sensibilidade satisfatória para diagnosticar as principais síndromes de microdeleção, em países em desenvolvimento, onde o uso da tecnologia *array* é financeiramente proibitivo. Outros estudos utilizando o MLPA em países em desenvolvimento, como Índia e Colômbia, foram publicados (BOGGULA et al., 2014; MEDINA et al., 2014).

Sabe-se que dentre as síndromes de microdeleção, a Síndrome da Deleção 22q11 é a mais frequente (CANCRINI et al., 2014), no entanto a maior prevalência no nosso estudo foi para a Síndrome de Williams-Beuren, quatro pacientes, em contraste com apenas dois casos de Síndrome da Deleção 22q11. A SWB é uma das síndromes genéticas com fenótipo mais reconhecível, o que pode ser comprovado nas imagens dos quatro casos identificados neste estudo (Figuras 3, 4, 5 e 6), o que facilita o diagnóstico. Apenas um desses pacientes apresentava estenose supraaórtica, que é observada em 70% dos pacientes (POBER, 2010), mas outros sinais, sobretudo os dismorfismos faciais, permitiram a hipótese diagnóstica já na primeira consulta. A baixa prevalência de Síndrome da Deleção 22q11 pode estar relacionada ao seu amplo espectro clínico, contribuindo para um subdiagnóstico. Os dois casos detectados, 18 e 44, apresentavam malformações cardíacas; possível malformação facial pela queixa de regurgitação alimentar pelo nariz; e dismorfismos faciais característicos. Não temos imagem disponível do caso 18, mas a Figura 10 corresponde à paciente do caso 44. O diagnóstico tardio do caso 18, apenas aos 11 anos, exemplifica a dificuldade do reconhecimento clínico da Síndrome da Deleção 22q11.



O caso 17, com síndrome de Smith-Magenis, apresentava quadro sugestivo de neuropatia periférica, clínica presente em 55% dos pacientes (GREENBERG et al., 1991).

Foi identificada no presente estudo uma rara presença de 3 cópias das sondas localizadas nos éxons 4, 12 e 17 do gene *NSDI*, mapeado em 5q35 (caso 6), região da Síndrome de Sotos, que tem como sinal maior a alta estatura pré e pós-natal. A paciente, 8 anos e 8 meses, teve como queixa principal a baixa estatura, além de baixo rendimento escolar e labilidade emocional, sem dismorfismos. Chen et al. (2006) descreveram um caso de uma duplicação da região 5q35.2-5q35.3 com baixa estatura, microcefalia, face pequena oval, fronte pequena, dificuldade de aprendizagem e atraso no desenvolvimento motor. Dutra (2014) descreveu 3 casos de duplicação na região 5q35: em duas irmãs, que apresentavam três cópias dos éxons 4, 12 e 17 do gene *NDSI*, com fenótipo que incluía baixa estatura, AGD/DI, e dismorfismos faciais. O terceiro caso apresentava microduplicação nos mesmos éxons e manifestações clínicas semelhantes, além de malformação cardíaca. O caso 6 e esses relatos acima descritos sugerem que o gene *NSDI* tem efeito de dosagem: quando está em haploinsuficiência causa a Síndrome de Sotos, caracterizada por hipercrecimento, e quando duplicado resulta em um fenótipo com baixa estatura.

Caso 7 evidenciou hemizigose das regiões relativas às duas sondas localizadas nos genes *F7* e *CDC16*, mapeados em 13q34. Trata-se de uma paciente do sexo feminino, 9 anos e 9 meses, com história de convulsões a partir dos 8 meses de idade, AGD, principalmente na aquisição da fala e epistaxes frequentes. Relato ainda de agressividade, labilidade emocional e dificuldade de sociabilização. Ao exame, microcefalia, microftalmia, estrabismo convergente à esquerda, prega epicântica, ponte nasal alargada, narinas antevertidas, prega de flexão única no 5º quirodáctilo à direita, afastamento entre hálux e 2º pododáctilo. O gene *F7* codifica o fator VII de coagulação (zimogênio do fator VIIa) que participa na via extrínseca da coagulação sanguínea, enquanto o *CDC16* está relacionado com o ciclo de divisão celular. Relatos na literatura mostram que as características de uma pequena deleção com ponto de interrupção em 13q34 podem ser bastante variáveis, sendo mais provável AGD/DI. Algumas pessoas são completamente saudáveis e permanecem sem diagnóstico enquanto outras têm dismorfismos reconhecíveis, já associadas a deleções na região 13q, como defeitos do couro cabeludo, alopecia areata e hipospádia. Microcefalia, malformações cardíacas, hemivértebras, linfedema e redução dos níveis do fator de coagulação X, além do fator VII, também foram descritos (FRYNS JP, 1995). A microcefalia estava presente na paciente do caso 7, mas não foi investigada uma redução dos níveis de fatores de coagulação VII e X como provável causa

das epistaxes recorrentes apresentadas. Yang et al. (2013) descreveram mais um relato de caso de hemizigose 13q34 com DI e MFC, como átrio único, fronte ampla, fendas palpebrais oblíquas, *pectus carinatum* e polidactilia, a maioria delas não observadas na paciente do caso 7.

O caso 15 trata-se de uma paciente de 7 anos e 10 meses, apresentando dismorfismos faciais, atraso na aquisição da fala e no MLPA 3 cópias de uma única sonda na região 22q13.33, no gene *RABL2B*. Ao exame dismórfico, apresentava linha de implantação anterior dos cabelos alta, pálpebras superiores edemaciadas, prega epicântica bilateral, ponte nasal alargada, orelhas grandes e displásicas, dentes incisivos grandes e dedos longos. *RABL2B* é provavelmente o gene mais distal do cromossomo 22q. Ahn et al. (2013) mostraram resultados que sugerem efeitos pleiotrópicos nessa região e relação com anormalidades no desenvolvimento cerebral. Relatos na literatura associam a trissomia distal 22q com achados que incluem AGD/DI, restrição de crescimento pós-natal, hipotonia, hidrocefalia, microcefalia, prega epicântica bilateral, orelhas de implantação baixa, ponte nasal proeminente e larga, fenda palatina, filtro longo, micrognatia e criptorquidia, sugerindo que esse rearranjo pode levar a um fenótipo reconhecível (BARAJAS-BARAJAS et al., 2004; OKAMOTO, 2007). Embora alguns desses sinais se sobreponham aos da paciente, não foi possível uma suspeita da síndrome na avaliação clínica. Um mecanismo molecular possível para este rearranjo é uma replicação induzida por ruptura (MAGRI, 2015).

A Síndrome da Deleção 22q11.21 foi identificada nos casos 18 e 44. Mutações no gene *SNAP29* são responsáveis por fenótipos atípicos em alguns pacientes, como disgenesia cerebral, neuropatia, ictiose e ceratoderma palmoplantar (MCDONALD-MCGINN, 2013). Esses sinais não foram observados nos casos, embora ambos apresentassem deleção desse gene. Nahorski et al. (2015) mostraram um papel essencial para *CLTCL1*, também deletados nos casos identificados, no desenvolvimento da crista neural e na gênese da dor e sensibilidade., possivelmente responsáveis pela incapacidade congênita de sentir dor e pela deficiência intelectual.

O caso 31 corresponde a uma criança de 3 anos e 2 meses de idade, com queixa principal de epilepsia, com histórico de sucção débil, sem aquisição da fala, agressividade, peso e estatura abaixo do percentil 5, microcefalia, fendas palpebrais oblíquas, ponte nasal alargada, orelhas displásicas e lábio superior fino. RNM (ressonância nuclear magnética) de pelve evidenciou displasia do quadril. Resultado do MLPA mostrou hemizigose do gene *PIGG* mapeado em 4p16; duplicação do gene *FBXO25* mapeado em 8p23; e duplicação do

gene *SHOX* mapeado em Xp22.3, sendo este último rearranjo também detectado na genitora. Esses achados sugerem uma translocação desequilibrada entre as regiões 4p e 8p: uma microdeleção 4p16 e uma microduplicação 8p23. Translocações, incluindo a t(4;8), como o caso descrito, podem ser responsáveis por 45% dos casos (SOUTH et al., 2008) da Síndrome de Wolf-Hirschhorn, que pode ser também causada por deleção em 4p (região 4p16.3 crítica), cromossomo 4 em anel e deleção 4p em mosaico. A síndrome é caracterizada por restrição grave do crescimento pós-natal, AGD/DI, hipotonia, epilepsia, microcefalia, coloboma, ponte nasal alargada contínua com a fronte, dando o aspecto de "capacete de guerreiro grego", fenda orofacial e malformações septais cardíacas (BERGEMANN, 2005). O gene *PIGG* está associado com DI de herança autossômica recessiva. Embora alguns dismorfismos faciais da paciente pudessem sugerir o diagnóstico, a paciente só foi diagnosticada pelo MLPA. A extensão da deleção e a presença de rearranjos associados contribuem para variações fenotípicas (ZOLLINO et al., 2008). Em aproximadamente metade dos casos o diagnóstico citogenético pode ser feito pelo cariótipo (SIFAKIS et al., 2012).

No caso 41, sexo masculino, 9 anos e 7 meses, encaminhado por apresentar dismorfismos faciais (bico de viúva, fendas palpebrais estreitas, indentação das narinas), atraso importante na fala, antecedentes cirúrgicos de correção de ânus imperfurado e orquidopexia à esquerda. Ao exame dismorfológico, apresentava ainda pescoço curto, distância intermamilar aumentada e mamilos invertidos. Supinação parcial dos antebraços. Resultado do MLPA mostrou hemizigose do gene *CHLI* mapeado em 3p26; duplicação dos genes *SOX12* e *ZCCHC3 (FLJ22115)* mapeados em 20p13; e duplicação do gene *JAG1* mapeado em 20p12.2, sugerindo uma translocação não equilibrada envolvendo as regiões 3pter e 20p12.2-20pter. O paciente possui, portanto, uma duplicação na região da Síndrome de Alagille. Características observadas em duplicações 20p12.2 cromossômicas incluem aparência facial típica de um rosto redondo, com bochechas proeminentes, cabelos grossos e lisos, fendas palpebrais oblíquas e atraso de desenvolvimento e aprendizagem, com crescimento normal (RAVEL et al., 2003). No entanto, a correlação genótipo-fenótipo permanece imprecisa devido à coexistência de outras anormalidades cromossômicas. Mills et al. (2013) descreveu uma duplicação 20p12.3 com síndrome de Wolff–Parkinson–White (WPW) em um paciente que apresentou hidropsia fetal não-imune. Seu tio paterno também possui a duplicação e tem transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e achados eletrocardiográficos compatíveis com WPW. Não foi possível determinar uma associação do quadro clínico do caso 41 com a referida síndrome. Essa dificuldade aumenta com o antecedente gestacional de exposição a

drogas potencialmente teratogênicas até o sétimo mês. A menor região de sobreposição para todos os casos relatados na literatura com deleção 3p é cerca de 895 Kb no cromossomo 3p26, contendo apenas o gene *CHLI*. A supressão do gene *CHLI* tem sido sugerida como causa do atraso no desenvolvimento (CUOCO et al., 2011). Uma redução de 50% da expressão do gene *CHLI* no cérebro em desenvolvimento de ratos resulta em déficit cognitivo, o que sugere que esse gene é um excelente candidato para uma forma autossômica de AGD/DI (FRINTS et al., 2003).

O caso 48 se trata de paciente do sexo feminino, 6 anos e 11 meses, com atraso na fala, microcefalia, linha anterior de implantação dos cabelos alta, fronte ampla, sobrancelhas retificadas, olhos grandes e voltados para cima, cílios longos, apêndice pré auricular à direita, micrognatia, dedos longos, escoliose e ataxia. História de baixo peso ao nascimento e agressividade. MLPA detectou hemizigose dos genes *CCDC127*, *PDCD6*, *TERT* (éxons 2 e 13), *CLPTMIL* e *IRX4*, localizados na região 5p15.3, indicando que a paciente apresenta uma microdeleção em 5pter de no mínimo 1,7 Mb, correspondente a Síndrome do Cri-du-Chat ou Miado do Gato, não identificada no exame físico nem no cariótipo. Os sinais clínicos da síndrome são variáveis em função do tamanho da deleção (MAINARDI, 2006).

Os casos 36 e 38 correspondem a CNVs possivelmente benignas. No caso 36 foi identificada uma microdeleção 17p13.3, região da Síndrome de Miller-Dieker, em uma paciente do sexo feminino, 1 ano e 5 meses, encaminhada por apresentar dismorfismos faciais, AGD, hipotonia, epilepsia e episódios de agressividade e automutilação. Ao exame dismorfológico, fendas palpebrais oblíquas, estrabismo convergente à direita, orelha direita displásica, palato arqueado, dedos longos, afastamento entre 1º e 2º pododáctilos. RNM de crânio evidenciou aspecto levemente encurtado do hipocampo esquerdo, porém sem área de sinal anômalo na topografia do mesmo. MLPA mostrou deleção da sonda localizada no gene *METT10D*, em 17p13.3, região associada a Síndrome de Miller-Dieker (SMD). MLPA da genitora aparentemente saudável evidenciou a mesma alteração, concluindo que se tratava de uma CNV herdada, possivelmente não patogênica. Outros exames são necessários para esclarecer o quadro da paciente e da genitora. Algumas CNVs patogênicas podem ter baixa penetrância em genitores saudáveis ou estar envolvidas com mecanismos de *imprinting*, levando a fenótipos cognitivos e comportamentais muitos leves e, conseqüentemente, pouco reconhecidos. Nestes casos, apenas a criança afetada é em geral alvo da consulta (JEHEE et al., 2011; SCHAAF et al., 2011). No caso relatado, a ausência de lisencefalia, um dos sinais mais prevalentes da SMD, justificou a realização do MLPA nos genitores.

Chen et al. (2013) relataram uma caracterização citogenética molecular da síndrome de deleção 17p13.3 em um feto com lisencefalia, disgenesia de corpo caloso, ventriculomegalia, microcefalia, restrição do crescimento intrauterino, polidrâmnio e artéria umbilical única. Os ensaios revelaram uma deleção 17p distal de origem materna, mas com ausência de sinal da sonda *LISI*, indicando uma haploinsuficiência do gene. Há uma estimativa que cerca de 80% dos pacientes com SMD tem uma deleção *de novo* envolvendo a região 17p13.3, e aproximadamente 20% têm uma deleção 17p13.3 herdada de um rearranjo parental (DOBYNS, 2009)

No Caso 38 foi observada uma duplicação 20qter, no gene *OPRL1*. Essa mesma alteração foi observada no MLPA da genitora, saudável. Relatos clínicos dessa duplicação incluem achados de AGD/DI moderado, microftalmia, orelhas alongadas, narinas antevertidas, fenda orofacial, queixo pequeno e malformações cardíacas. Variabilidade na extensão da duplicação e presença de monossomias associadas, porém, dificultam a elucidação de um fenótipo típico para duplicações terminais 20q (BLANC et al., 2008; STARR et al., 2014).

## 6 CONCLUSÕES

Na pesquisa de microdeleções e microduplicações em 52 pacientes do HUAC com AGD/DI e/ou malformações congênicas, observamos uma elevada frequência de CNVs em relação à literatura, provavelmente explicada pela triagem prévia a qual os pacientes são submetidos antes de chegar ao serviço e pela seleção clínica adequada.

Em todos os casos com CNVs detectadas através do MLPA, ou o cariótipo foi normal ou não teria sido capaz de detectar a alteração presente no paciente. Embora esse exame preceda em complexidade e custo financeiro o MLPA, ele não traria contribuição ao diagnóstico, aumentando o custo financeiro total e o tempo para a elucidação dos casos. Nesse mesmo grupo de pacientes, todos os casos apresentavam AGD/DI, com exceção de um caso de Síndrome da Deleção 22q11, cuja idade (5 meses) dificultou a observação dessa manifestação.

Quatro síndromes reconhecíveis, confirmadas pelo MLPA, tiveram a suspeita clínica já na seleção da amostra: síndromes de Williams-Beuren, Prader-Willi, Smith-Magenis, Deleção 22q11. Foram identificados microrrearranjos raros, que, a partir da contribuição deste estudo, permitiu um melhor conhecimento sobre eles. Em todos os demais casos positivos,

apenas com o MLPA foi possível ser identificada a etiologia do ADG/DI e/ou malformações congênitas.

Nenhum paciente com AGD/DI ou malformação congênita isolados teve o MLPA positivo, reforçando que uma investigação clínica cuidadosa é imprescindível para indicação desse exame. Recomendamos que para os casos negativos, a investigação deve prosseguir com técnicas de pesquisa de microdeleções/microduplicações mais abrangentes que o MLPA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, K et al. High rate of disease-related copy number variations in childhood onset schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.568-572, 21 maio 2013. Nature Publishing Group.
- AHN, Kyung Jin et al. Alagille syndrome and a JAG1 mutation: 41 cases of experience at a single center. **Korean J Pediatr**, [s.l.], v. 58, n. 10, p.392-397, 2015.
- ANGULO, M. A.; BUTLER, M. G.; CATALETTO, M. E. Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. **Journal Of Endocrinological Investigation**, [s.l.], v. 38, n. 12, p.1249-1263, 11 jun. 2015.
- BARAJAS-BARAJAS LO, VALDEZ LL, GONZALEZ JR, GARCIA-GARCIA C, RIVERA H, RAMIREZ L. Sensorineural deafness in two infants: a novel feature in the 22q distal duplication syndrome. Cardinal signs in trisomies 22 subtypes. **Genet Couns**. 2004;15(2):167–73.
- BERGEMANN A; COLE, F; HIRSCHHORN, K. The etiology of Wolf Hirschhorn syndrome. **Trends In Genetics**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.188-195, mar. 2005.
- BLANC, Pierre et al. Trisomy 20q caused by interstitial duplication 20q13.2: Clinical report and literature review. **Am. J. Med. Genet.**, [s.l.], v. 146, n. 10, p.1307-1311, maio 2008.
- BOGGULA VR, ANJU SHUKLA, SUMITA DANDA, SANKAR V. HARIHARAN, SHEELA NAMPOOTHIRI, RASHMI KUMAR, SHUBHA R. PHADKE. Clinical utility of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in identification of aetiology of unexplained mental retardation: A study in 203 Indian patients. **Indian J Med Res** 139, January 2014, pp 66-75.
- BUITING, Karin et al. Clinical utility gene card for: Angelman Syndrome. **Eur J Hum Genet**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.1-3, 4 jun. 2014.
- BUITING, Karin et al. Clinical utility gene card for: Prader-Willi Syndrome. **Eur J Hum Genet**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1-3, 16 abr. 2014.
- BUYSSE, K. BARBARA DELLE CHIAIE A, RUDY VAN COSTER B, BART LOEYS A, ANNE DE PAEPE A, GEERT MORTIER A, FRANK SPELEMAN A, BJOËRN MENTEN A. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: Lessons learned from a 1001 sample experience. **European Journal of Medical Genetics** 52 (2009) 398–403.
- CANCRINI, Caterina et al. Clinical Features and Follow-Up in Patients with 22q11.2 Deletion Syndrome. **The Journal Of Pediatrics**. New York, p. 1475-1480. jun. 2014.
- CASSIDY SB, DRISCOLL DJ. Prader-Willy syndrome. **Eur J Hum Genet**. 2009; 17(1):3-13.

CHEN, C. P.; LIN, S. P.; LIN, C. C.; CHEN, Y. J.; CHERN, S. R.; LI, Y. C.; HSIEH, L. J.; LEE, C. C.; PAN, C. W.; WANG, W.: Molecular cytogenetic analysis of De Novo dup(5)(q35.2q35.3) and review of the literature of pure partial trisomy 5q. **American Journal of medical Genetics Part A**. 140: 1594-1600,2006.

CHEN, Chih-ping et al. Chromosome 17p13.3 deletion syndrome: aCGH characterization, prenatal findings and diagnosis, and literature review. **Gene**, [s.l.], v. 532, n. 1, p.152-159, dez. 2013.

CHO, Jin Min et al. Clinical features, outcomes, and genetic analysis in Korean children with Alagille syndrome. **Pediatrics International**, [s.l.], v. 57, n. 4, p.552-557, 6 maio 2015.

CROTWELL PL, HOYME HE. Advances in whole-genome genetic testing: from chromosomes to microarrays. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**. 2012; 42(3):47-73.

CUOCO, C., et al. Microarray based analysis of an inherited terminal 3p26.3 deletion, containing only the CHL1 gene, from a normal father to his two affected children. **Orphanet J Rare Dis**. 2011. 6, 12.

DAGLI A, BUITING K, WILLIAMS CA. Molecular and Clinical Aspects of Angelman Syndrome. **Mol Syndromol**. 2012;2(3-5):100-112.

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

DOBYNS, W.B., DAS, S. LIS1-associated Lissencephaly/Subcortical Band Heterotopia. In:DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,5th ed. Arlington: **American Psychiatric Publishing**. 2009.

DUTRA, Roberta Lelis. **Investigação da variação no número de cópias genômicas (CNVs) em pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) pela técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)**. 2014. 189 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, FMUSP, São Paulo, 2014.

ELSEA SH, GIRIRAJAN S, Smith-Magenis syndrome. **Eur J Hum Genet**. 2008; 16(4):412-21.

ELSEA SH, WILLIAMS SR. Smith-Magenis syndrome: haploinsufficiency of RAI1 results in altered gene regulation in neurological and metabolic pathways. **Expert Rev Mol Med**. 2011; 13:e14.

EUTENEUER, J. et al. Molecular and phenotypic characterization of atypical Williams-Beuren syndrome. **Clin Genet**, [s.l.], v. 86, n. 5, p.487-491, 18 nov. 2013.

FLINT J, WILKIE AO, BUCKLE VJ, WINTER RM, HOLLAND AJ, MCDERMID HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. **Nat Genet** 1995;9:132-40.



FRINTS, SGM, et al. CALL interrupted in a patient with non-specific mental retardation: gene dosage-dependent alteration of murine brain development and behavior. **Hum. Molec. Genet.** 12: 1463-1474, 2003.

FRYNS JP. Microcephaly/lymphedema and terminal deletion of the long arm of chromosome 13. **Am J Med Genet**, S.l., v. 57, n. 3, p.504-510, jul. 1995.

GAGLIARDI C, et al., Unusual cognitive and behavioural profile in a Williams syndrome patient with atypical 7q11.23 deletion. **J Med Genet.** 2003, 40:526-30.

GENNERY AR. Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. **Cell Mol Life Sci.** 2012; 69(1):17-27.

GIJSBERS ACJ, SCHOUMANS J, RUIVENKAMP CAL. Interpretation of Array Comparative Genome Hybridization Data: A Major Challenge. **Cytogenet Genome Res** 2011;135:222–227.

GREENBERG, F., et al. Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2). **Am J Hum Genet.** 49: 1207-1218, 1991.

HACIHAMADIOGLU, Bulent; HACIHAMADIOGLU, Duygu Ovunc; DELIL, Kenan. 22q11 deletion syndrome: current perspective. **Tacg**, [s.l.], p.123-132, maio 2015.

HE, Wenyin et al. The Prevalence of Chromosomal Deletions Relating to Developmental Delay and/or Intellectual Disability in Human Euploid Blastocysts. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-11, 7 jan. 2014.

HOCHSTENBACH R, et al. Array analysis and karyotyping: Workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. **Eur J Med Genet.** 2009; 52 (4): 161-9

JEHEE, Fernanda Sarquis 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. **European Journal Of Medical Genetics**, [s.l.], v. 54, n. 4, p.425-432, jul. 2011.

JUYAL RC, et al., Smith-Magenis syndrome deletion: a case with equivocal cytogenetic findingd resolved by fluorescence in situ hybridization. **Am J Med Genet** 58:286-291, 1995.

KIRCHHOFF M, ANNE-MARIE BISGAARD A, THUE BRYNDORF B, TOMMY GERDES. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and WilliamseBeuren syndrome regions. **European Journal of Medical Genetics** 50 (2007) 33e42

KNIGHT SJL, REGAN R, NICOD A, HORSLEY SW, KEARNEY L, HOMFRAY T, WINTER RM, BOLTON P, FLINT J. Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. **Lancet** 1999;354:1676-81.

KOZLOWSKI P, JASINSKA AJ, KWIATKOWSKI DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. **Electrophoresis** 2008, 29, 4627–4636

KULIKOWSKI LD. **Citogenômica aplicada à prática médica**. São Paulo: Editora Atheneu; 2013

LEONARD, Laura D et al. Clinical utility gene card for: Alagille Syndrome (ALGS). **Eur J Hum Genet**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.1-3, 24 jul. 2013.

MAGRI, C. et al. SNP array and FISH analysis of a proband with a 22q13.2- 22qter duplication shed light on the molecular origin of the rearrangement. **Bmc Medical Genetics**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-10, 7 jul. 2015.

MAINARDI, Paola Cerruti. Cri du Chat syndrome. **Orphanet Journal Of Rare Diseases**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.33-42, 2006.

MARGOLIS, Seth S. et al. Angelman Syndrome. **Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.641-650, 4 jun. 2015.

MAULIK PK, MASCARENHAS MN, MATHERS CD, DUA T, SAXENA S. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. **Res Dev Disabil**. 2011;32:419-436.

MCDONALD-MCGINN DM, FAHIMINIYA S, REVIL T, NOWAKOWSKA BA, SUHL J, et al. Hemizygous mutations in SNAP29 unmask autosomal recessive conditions and contribute to atypical findings in patients with 22q11.2DS. **J. Med. Genet**. 2013.50:80–90

MEDINA A, PIÑEROS L, ARTEAGA C, et al. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification to Subtelomeric Rearrangements in Idiopathic Intellectual Disability in Colombia. **Pediatric Neurology** 50 (2014) 250e254

MICHELSON DJ, SHEVELL MI, SHERR EH, MOESCHLER JB, GROPMAN AL, ASHWAL S. Evidence report: Genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**. 2011. 77:1629–1635

MILLS KI, ANDERSON J, LEVY PT, COLE FS, SILVA JNA, KULKARNI S, SHINAWI M. Duplication of 20p12.3 associated with familial Wolff–Parkinson–White syndrome. **Am J Med Genet** 2013. Part A 161A:137–144.

MOESCHLER, J.B. Genetic evaluation of intellectual disabilities. **Semin Pediatr Neurol**, 15(1), 2-9, Mar. 2008.

NAHORSKI, M.S., et al. A novel disorder reveals clathrin heavy chain-22 is essential for human pain and touch development. **Brain** 138: 2147-2160, 2015.

NYGREN AO, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. **Nucleic Acids Res.** 2005 Aug 16;33(14):e128.

OKAMOTO, Nobuhiko et al. 22q13 microduplication in two patients with common clinical manifestations: A recognizable syndrome? **Am. J. Med. Genet.**, [s.l.], v. 143, n. 23, p.2804-2809, set. 2007.

PASSOS-BUENO, Maria Rita et al. Genetics and genomics in Brazil: a promising future. **Mol Genet Genomic Med**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.280-291, jul. 2014.

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

PEOPLES R, et al., A physical map, including a BAC/PAC clone contig, of the Williams-Beuren syndrome - deletion region at 7q11.23. **Am J Hum Genet.** 2000, 66:47-68.

POBER, Barbara R.. Williams–Beuren Syndrome. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 362, n. 3, p.239-252, 21 jan. 2010.

POHOVSKI LM, KATJA K DUMIC, LJUBICA ODAK AND INGEBORG BARISIC. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. **Molecular Cytogenetics** 2013, 6:7

RAFATI M, et al. “Familial” versus “Sporadic” intellectual disability: contribution of common microdeletion and microduplication syndromes. **Molecular Cytogenetics** 2012, 5:9

RAUCH A, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. **Am J Med Genet Part A.** 2006; 140a:2063-2074.

RAVEL TJL, VERMEESCH JR, FRYNS JP. De novo interstitial tandem duplication of chromosome 20p12.1p3. **Am J Med Genet** 2003. 117A:76-79.

RICHARD REDON<sup>1</sup>, SHUMPEI ISHIKAWA<sup>2,3</sup>, KAREN R. FITCH<sup>4</sup> et al. Global variation in copy number in the human genome. **NATURE** | Vol 444|23 Nov 2006

RIEGEL, Mariluce. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. **Genet Mol Biol**, S.l, v. 37, n. 1, p.194-209, mar. 2014.

RODRIGUEZ-CABALLERO A, et al., Cri du Chat syndrome: a critical review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**2010; 15(3):e473-8.

SABBAG ARC, et al. Identifying Microdeletion Syndromes in Patients with Intellectual Disability Using Molecular Genetic Testing: An Example for the Brazilian Public Health Care System **American Journal of Public Health Research**, 2013, Vol. 1, No. 4, 86-92

SCHAAF CP, SCOTT DA, WISZNIEWSKA J, BEAUDET AL. Identification of incestuous parental relationships by SNP-based DNA microarrays. **Lancet.**2011; 377(9765):555-6.

SCHOUTEN, Jan P. et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res**, S.l., v. 30, n. 12, p.57-70, jun. 2002.

SHAFFER LG, BEJJANI BA, TORCHIA B, KIRKPATRICK S, COPPINGER J, BALLIF BC. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. **Am J Med Genet C Semin Med Genet**. 2007;145C(4):335-45.

SHAPIRO, Adam J. et al. Cri du Chat Syndrome and Primary Ciliary Dyskinesia: A Common Genetic Cause on Chromosome 5p. **The Journal Of Pediatrics**, [s.l.], v. 165, n. 4, p.858-861, out. 2014.

SHEN Y, WU BL. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. **Journal of Genetics and Genomics** 36 (2009) 257-265

SIFAKIS S, MANOLAKOS E, VETRO A, KAPPOU D, PEITSIDIS P, KONTODIOU M et al. Pre-natal diagnosis of Wolf-Hirschhorn syndrome confirmed by comparative genomic hybridization array: report of two cases and review of the literatura. **Mol Cytogenet**. 2012;5:12.

SLONEEM, J. et al. Prevalence, phenomenology, aetiology and predictors of challenging behaviour in Smith-Magenis syndrome. **Journal Of Intellectual Disability Research**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.138-151, 4 jan. 2011.

SOUTH ST, WHITBY H, BATTAGLIA A, CAREY JC, BROTHAMN AR. Comprehensive analysis of Wolf-Hirschhorn syndrome using array CGH indicates a high prevalence of translocations. **Eur J Hum Genet**. 2008;16:45-52.

SRIVASTAVA AK, SCHWARTZ CE . Intellectual disability and autism spectrum disorders: causal genes and molecular mechanisms. **Neurosci Biobehav Rev**. 2014. 46:161–174

STARR, Lois J. et al. Duplication of 20qter and deletion of 20pter due to paternal pericentric inversion: Patient report and review of 20qter duplications. **Am. J. Med. Genet.**, [s.l.], v. 164, n. 8, p.2020-2024, 20 jun. 2014.

STEGMANN APA, L.M.H. JONKER, J.J.M. ENGELEN. Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. **European Journal of Medical Genetics** 51 (2008) 93e10

STROMME P, BJORNSTAD PG, RAMSTAD K: Prevalence estimation of Williams syndrome. **J Child Neurol**, 2002; 17:269-271.

STUPPIA, Liborio et al. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. **Ijms**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.3245-3276, 8 mar. 2012.

TURNPENNY PD, ELLARD S. Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. **Eur J Hum Genet**. 2012;20(3):251-7.

VAN KARNEBEEK CDM, et al. Diagnostic investigation in individuals with mental retardation: a systematic literature review on their usefulness, **Eur J Hum Genet**. 2005, 13:6-25.

VIANA, Melissa Machado et al. Phenotype of Williams-Beuren syndrome in Brazilian patients: Comments on the article by Patil et al. [2012] and discussion of variable phenotypes in distinct populations. **Am. J. Med. Genet.**, [s.l.], v. 161, n. 3, p.637-638, 24 jan. 2013.

WATSON CT, et al. The Genetics of Microdeletion and Microduplication Syndromes: An Update. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet**. 2014.15:215–44

WESSEL A, GRAVENHORST V, BUCHHORN R, GOSCH A, PARTSCH CJ, PANKAU R. Risk of sudden death in the Williams-Beuren syndrome. **Am J Med Genet A** 2004;127A:234-7.


WILLIAMS, N. M.. Molecular Mechanisms in 22q11 Deletion Syndrome. **Schizophrenia Bulletin**, [s.l.], v. 37, n. 5, p.882-889, 22 ago. 2011.

YANG, Yi-feng et al. A 1.1Mb deletion in distal 13q deletion syndrome region with congenital heart defect and postaxial polydactyly: Additional support for a CHD locus at distal 13q34 region. **Gene**, [s.l.], v. 528, n. 1, p.51-54, out. 2013.

ZOLLINO M, et al. On the nosology and pathogenesis of Wolf-Hirschhorn syndrome: Genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. **Am. J. Med. Genet**, [s.l.], v. 148, n. 4, p.257-269, 15 nov. 2008.

## APÊNDICES

Apêndice A: parecer de aprovação da pesquisa “*Triagem de microdeleções por MLPA como primeiro teste diagnóstico em pacientes com malformação congênita e deficiência mental*” por Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP).

<p>SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE BELO HORIZONTE - SCMBH</p> 
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>
<b>Título da Pesquisa:</b> Triagem de microdeleções por MLPA como primeiro teste diagnóstico em pacientes com malformação congênita e deficiência mental
<b>Pesquisador:</b> Fernanda Maria Sarquis Jehee
<b>Área Temática:</b> Área 1. Genética Humana. (Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);
<b>Versão:</b> 1
<b>CAAE:</b> 01989512.9.0000.5138
<b>Instituição Proponente:</b> SANTA CASA DE MISERICORDIA DE BELO HORIZONTE
<b>DADOS DO PARECER</b>
<b>Número do Parecer:</b> 145.160
<b>Data da Relatoria:</b> 28/10/2012
<b>Apresentação do Projeto:</b>
<b>Introdução:</b>
Malformações congênitas múltiplas, deficiências de crescimento, dificuldades de aprendizagem e deficiência cognitiva (MC/DC) compreendem um grupo grande e extremamente heterogêneo de doenças com incidência de 2-3% em nascidos vivos e representam portanto, um problema importante de saúde pública.
<b>Objetivo da Pesquisa:</b>
<b>Objetivo Primário:</b>
Implementação e avaliação da utilização de uma combinação de kits de MLPA como teste inicial na investigação da patofisiologia de pacientes com MC/DC.
<b>Objetivo Secundário:</b>
1. Objetivos específicos 1) Validação da técnica de MLPA no laboratório do Núcleo da Pós-Graduação da Santa Casa de Belo Horizonte. 2) Avaliação dos tipos e da taxa de detecção de alterações cromossômicas utilizando MLPA como teste inicial para pacientes com MC/DC. 3) Comparação dos tipos e taxas de detecção de alterações cromossômicas encontrados através da técnica proposta
<p><b>Endereço:</b> Rua Domingos Vieira 590  <b>Bairro:</b> Santa Efigênia <b>CEP:</b> 30.150-240  <b>UF:</b> MG <b>Município:</b> BELO HORIZONTE  <b>Telefone:</b> (31)3238-8933 <b>Fax:</b> (31)3238-9838 <b>E-mail:</b> cep@santacasabh.org.br</p>

com as demais estratégias utilizadas na literatura, tais como: cariótipo, cariótipo + MLPA e triagem genômica por microarray. 4) Relacionar as alterações cromossômicas encontradas às alterações clínicas para determinação do diagnóstico e do prognóstico do paciente. 5) Efetuar o aconselhamento genético familiar. 6) Avaliação de custos e tempo de execução da estratégia proposta. 7) Estudo de custo-efetividade da estratégia proposta em comparação com demais estratégias como cariótipo, cariótipo + MLPA e microarray. 8) Avaliação da satisfação do médico ou instituição referente em relação ao teste e resultados obtidos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto não gera riscos aos pacientes ou à família dos mesmos, como explicitado abaixo. Para a realização do projeto será necessária a coleta de sangue periférico do probando e de seus genitores. Essas coletas serão feitas apenas para o estudo e em nada influenciarão no tratamento do paciente, o que será informado à família. As coletas, realizadas por profissionais experientes e capacitados, não causarão nenhum problema, exceto a dor da picada da agulha no local da coleta. Também será informado à família que os resultados do estudo não devem curar o paciente e que a família tem a liberdade de desistir ou interromper a colaboração no estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e que a desistência não causará nenhum prejuízo ao paciente e não interferirá no atendimento ou tratamento médico do mesmo. É informado à família que os resultados obtidos durante o projeto serão mantidos em sigilo, mas podem, com a concordância da família, ser divulgados em publicações científicas, mantendo a confidencialidade de dados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O grande benefício direto e imediato deste projeto para os pacientes envolvidos é a oferta de um diagnóstico genético ao qual eles não têm acesso nos serviços de saúde públicos. O diagnóstico correto e precoce de alterações cromossômicas em pacientes com malformações congênitas e deficiência cognitiva é fundamental para compreensão do quadro clínico, orientação e aconselhamento genético das famílias e estabelecimento de medidas preventivas de recorrência. Outra vantagem da identificação precoce da etiologia genética em malformações congênitas e deficiência cognitiva é a eliminação de custos adicionais provindos da grande quantidade de procedimentos

Endereço: Rua Domingos Vieira 590  
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br



SANTA CASA DE  
MISERICÓRDIA DE BELO  
HORIZONTE - SCMBH



diagnósticos utilizados na tentativa de elucidar a causa das malformações congênitas e deficiência cognitiva do paciente. Os resultados deste projeto devem gerar grande impacto na política de saúde pública nacional, pois será possível construir um fluxograma ideal de atendimento e diagnóstico eficaz e economicamente adequado para a aplicação nos pacientes atendidos pelo SUS. Além disto, propiciará a formação de profissionais da área de Genética Humana já que inclui temas como genética clássica e molecular e sua correlação com a genética clínica, padrões de herança genética, estratégias de investigação laboratorial e aconselhamento genético.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Estudando as melhores estratégias de investigação populacional em pacientes com malformações congênitas e deficiência cognitiva esperamos encontrar alternativas viáveis, clinicamente e economicamente, para o diagnóstico de alterações cromossômicas neste grupo clínico. A utilização de uma abordagem diagnóstica utilizando a técnica de MLPA surge como alternativa viável economicamente e é uma abordagem de maior poder diagnóstico quando comparada com o cariótipo convencional, único teste genético oferecido nos grandes centros médicos públicos ao pacientes com malformações congênitas. Um grande desfecho deste projeto é a criação da primeira unidade de Genética Humana e Médica do Grupo de Hospitais da Santa Casa de Belo Horizonte. Estando dentro do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa temos oportunidade de formar novos profissionais da área de Genética Humana, sendo através de cursos, interações com médicos, formação de alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, etc. Esperamos, a médio ou longo prazo, capacitar outros serviços de genética que possam também receber um maior número de exames, ampliando o diagnóstico genético molecular e aconselhamento genético para um número maior de pacientes.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Favorável à aprovação do projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Rua Domingos Vieira 590  
 Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br



SANTA CASA DE  
MISERICÓRDIA DE BELO  
HORIZONTE - SCMBH



**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O projeto esta bem fundamentado no ponto de vista metodológico, apresenta relevancia clínica e nao implica em riscos adicionais, exceto o da retirada de amostras de sangue.

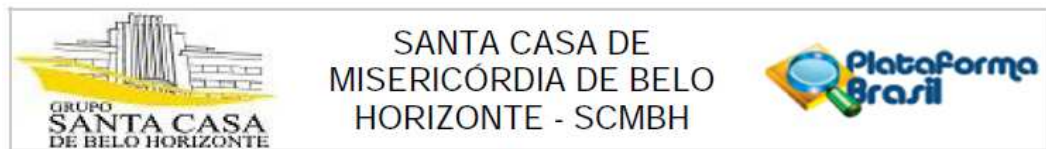
BELO HORIZONTE, 13 de Novembro de 2012

---

Assinador por:  
Francisco das Chagas Lima e Silva  
(Coordenador)

Endereço: Rua Domingos Vieira 590  
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.150-240  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3238-8933 Fax: (31)3238-8838 E-mail: cep@santacasabh.org.br

Apêndice B: parecer de aprovação da pesquisa “*Investigação etiológica em deficiência intelectual, malformações congênitas e/ou crises convulsivas através de técnicas citogenômicas*” por Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP).



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação etiológica em deficiência intelectual, malformações congênitas e/ou crises convulsivas através de técnicas citogenômicas

**Pesquisador:** Fernanda Maria Sarquis Jehee

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 1

**CAAE:** 48581115.6.1001.5138

**Instituição Proponente:** SANTA CASA DE MISERICORDIA DE BELO HORIZONTE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.255.104

#### Apresentação do Projeto:

Deficiência intelectual e malformações congênitas associadas ou não a crises convulsivas DI/MC/CC compreendem um grupo grande e extremamente heterogêneo de doenças. A compreensão da etiologia das DI/MC/CC é fundamental para orientação e aconselhamento genético das famílias, bem como para o estabelecimento de medidas preventivas. A investigação por microarray em indivíduos DI/MC com cariótipo prévio normal é capaz de detectar alterações em 5-30% dos pacientes. Alterações cromossômicas estão presentes em aproximadamente 6% dos pacientes com crises epilépticas e deficiência mental e em até 50% dos pacientes com epilepsia e malformações congênitas e dismorfismos, a chamada epilepsia síndrômica. Diversas são as tecnologias utilizadas para a detecção de alterações cromossômicas submicroscópicas em pacientes com DI/MC. Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no propósito da investigação. A triagem genômica por microarray permite a detecção de alterações de número de cópias (deleções e duplicações) em todo o genoma

**Endereço:** Rua Domingos Vieira 590

**Bairro:** Santa Efigênia

**CEP:** 30.150-240

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3238-8933

**Fax:** (31)3238-8838

**E-mail:** cep@santacasabh.org.br



Continuação do Parecer: 1.255.104

humano com um nível de resolução bem mais alto do que o cariótipo. O presente trabalho tem como objetivo geral identificar através da técnica de microarray alterações cromossômicas em pacientes com deficiência intelectual e malformações congênitas, associadas ou não às crises convulsivas. A coleta de sangue deve incluir, quando possível, o probando e seus pais; e deverá ser suficiente para as análises de MLPA e microarray. Para cada paciente serão realizados previamente testes com três kits de MLPA, dois subteloméricos (P036 e P070), um de regiões de microdeleções e microduplicações sindrômicas (P064) e um para investigação de alterações relacionadas às crises convulsivas (P343). Os pacientes com resultado alterado não serão avaliados pela técnica de microarray. O Laboratório de Genética Humana do IEP-Santa Casa já possui uma coleção de mais de 300 amostras de pacientes que foram selecionados para o projeto "Triagem de microdeleções por MLPA como primeiro teste diagnóstico em pacientes com malformação congênita e deficiência mental". Para todos estes pacientes já foi realizado o screening de microdeleções e microduplicações pela técnica de MLPA. Entre os que não apresentaram alteração, serão selecionados alguns casos para estudo por microarray.

**Objetivo da Pesquisa:**

O presente trabalho tem como objetivo geral identificar através da técnica de microarray alterações cromossômicas em pacientes com deficiência intelectual e malformações congênitas, associadas ou não às crises convulsivas

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos mínimos e aceitáveis quanto à coleta de sangue venoso. Importante benefício quanto ao aconselhamento genético inédito por esta técnica e acompanhado por profissional médico.

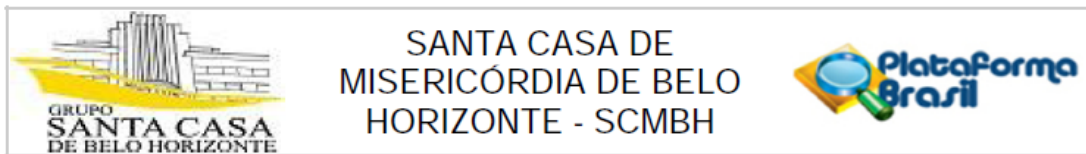
**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Relevante e inédita para nosso complexo hospitalar. Baseada em projetos anteriores e aprovados pelo mesmo grupo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em ordem.

<b>Endereço:</b> Rua Domingos Vieira 590	<b>CEP:</b> 30.150-240
<b>Bairro:</b> Santa Efigênia	<b>Município:</b> BELO HORIZONTE
<b>UF:</b> MG	<b>E-mail:</b> cep@santacasabh.org.br
<b>Telefone:</b> (31)3238-8933	<b>Fax:</b> (31)3238-8838



Continuação do Parecer: 1.255.104

**Recomendações:**

Nada a declarar

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nada a declarar.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_572633.pdf	19/08/2015 15:32:20		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	19/08/2015 15:31:14	Fernanda Maria Sarquis Jehee	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_145160 (1).pdf	17/08/2015 16:03:52		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaração pesquisa Paula Medeiros UFCG.jpg	17/08/2015 16:01:30		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo Aceite Pediatria HSC.pdf	17/08/2015 16:01:16		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo de Anuência Centrinho Bauru.pdf	17/08/2015 16:00:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Array pais.docx	17/08/2015 16:00:10		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Array menores.docx	17/08/2015 15:59:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto SNP Array para comitê de ética 17_08_2015.doc	17/08/2015 15:59:39		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Rua Domingos Vieira 590  
**Bairro:** Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3238-8933 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br

Apêndice C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Instituto de Ensino e Pesquisa – Santa Casa Belo Horizonte**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(menores de 18 anos)

*Seu (Sua) filho(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.*

Eu.....,RG.....,  
 concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho(a)  
 ..... nascido(a) em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /\_\_\_\_ ,  
 participe do estudo **“Triagem de microdeleções por MLPA como primeiro teste diagnóstico em pacientes com malformação congênita e deficiência mental”**, e esclareço que obtive todas informações necessárias.

Estou ciente de que:

1. O estudo se faz necessário para tentar definir as possíveis causas das alterações de meu filho
2. Serão feitas coletas de 5ml. de sangue do(a) meu(minha) filho(a) e de seus pais;
3. Essas coletas serão feitas apenas para este estudo e em nada influenciarão no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); não causarão nenhum problema, exceto a dor da picada da agulha no local da coleta;
4. Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
5. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), e não interferirá no atendimento ou tratamento médico;
6. Os resultados obtidos durante este projeto serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu filho sejam mencionados;
7. Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa

8. ( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa e mantereí meu telefone de contato sempre atualizado
9. ( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
10. Caso tenham sido tiradas fotografias,
11. ( ) concordo que sejam incluídas em publicações científicas e aulas para profissionais da saúde, se necessário
12. ( ) não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

**Participante:** \_\_\_\_\_

**Pesquisador Responsável pelo Projeto:**

Dra. Fernanda Sarquis Jehee (Geneticista CRBio 20.937/01-D)

(31) 3238-8093

Apêndice D: formulário para avaliação clínica.

## PROTOCOLO PARA TESTE GENÉTICO

**Registro laboratório: \_\_\_\_\_ (DNA)**

**Nome:** \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) F ( ) M Etnia \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Mãe: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_\_

Pai: \_\_\_\_\_ DN: \_\_\_\_\_ Médico responsável: \_\_\_\_\_

Hipótese diagnóstica: \_\_\_\_\_

Teste a ser realizado: \_\_\_\_\_

Documentação fotográfica de paciente: Sim ( ) Não ( )

**Data da coleta:** \_\_\_\_\_

Data da extração: \_\_\_\_\_ Concentração/Qualidade \_\_\_\_\_

**Coleta de familiares:** ( ) não ( ) sim **Data da coleta:** \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Parentesco \_\_\_\_\_

Registro \_\_\_\_\_

Data da extração: \_\_\_\_\_ Concentração/Qualidade \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Parentesco \_\_\_\_\_

Registro \_\_\_\_\_

Data da extração: \_\_\_\_\_ Concentração/Qualidade \_\_\_\_\_

**GESTAÇÃO E PARTO****Pré-Natal:**

Intercorrências:

Uso de Medicamentos:

**Parto:**

Peso : CN:

PC:

**Idade Gestacional:**

Apgar:

Sofrimento fetal: Sim ( ) Não ( )

Alta ( ) dias

Intercorrências:

**DNPM :** Sustentou a cabeça:

Sentou:

Andou:

Falou:

Controle de esfíncter:

Escola:

**EXAME FÍSICO:****Data:****Idade:**

Peso:

Estatura:

PC:

Puberdade:

**Dismorfismos faciais:**

Não ( ) Sim ( )

Olhos: \_\_\_\_\_ Nariz: \_\_\_\_\_

Boca: \_\_\_\_\_ Orelhas: \_\_\_\_\_

PESCOÇO: \_\_\_\_\_ Outros: \_\_\_\_\_

**Anomalias Congênitas:**

SNC: \_\_\_\_\_

Cardíaca: \_\_\_\_\_

Abdome: \_\_\_\_\_

Renal: \_\_\_\_\_

Genitália: \_\_\_\_\_

Esquelética: \_\_\_\_\_

Pele: \_\_\_\_\_

**OBSERVAÇÕES**





*Research Note*

## Array-CGH analysis in patients with intellectual disability and/or congenital malformations in Brazil

G.S. Vianna<sup>1</sup>, P.F.V. Medeiros<sup>2</sup>, A.F. Alves<sup>2</sup>, T.O. Silva<sup>2</sup> and F.S. Jehee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brasil

Corresponding author: F.S. Jehee

E-mail: fernanda@jehee.com.br

Genet. Mol. Res. 15 (1): gmr.15017769

Received October 1, 2015

Accepted November 18, 2015

Published February 19, 2016

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017769>

**ABSTRACT.** In several patients, intellectual disability and/or congenital malformation may be attributed to chromosomal changes. In this study, we conducted an array-CGH test of 200 patients from the Northeast of Brazil with intellectual disability and/or congenital malformation. Blood samples were collected from the proband and from their parents when possible. DNA was extracted and investigated using the array-CGH test. Findings were evaluated for the pathogenicity in databases of benign and pathogenic changes (ISCA, UCSC, DGV, and DECIPHER). Forty-seven copy number variations (CNVs) were identified in 43/200 (21.5%) patients, including 25/98 (25.5%) in males and 22/102 (21.57%) in females. We considered 33 of these to be clinically significant, reaching a diagnosis rate of 16.5%. The sizes of the CNVs varied from 102 kb to 24 Mb in deletions and from 115 kb to 140 Mb in duplications. In 10/47 (21.3%) patients, the rearrangement involved a sex chromosome. Thirty-nine patients had one chromosomal aberration, while 2 concomitant abnormalities were detected in 4 patients.

Ten of 47 CNVs (21.3%) were > 5Mb in size. Fifteen patients had CNVs related to known syndromes. This research highlights the contribution of submicroscopic chromosomal changes to the etiology of intellectual disability and/or congenital malformation, particularly the implication of chromosomal abnormalities detected using an array-CGH test, with a high rate of 16.5%. Thus, our results support the use of array-CGH replacing standard karyotype as the first-tier cytogenetic diagnostic test for patients with multiple congenital anomalies and/or intellectual disability.

**Key words:** Array-CGH; Congenital malformation; Intellectual disability; Northeastern Brazilian patients

## INTRODUCTION

Epidemiological studies suggest that intellectual disability (ID) affects 2-3% of the general population worldwide and may occur with or without multiple congenital anomalies (MCA) (Rauch et al., 2006; Galasso et al., 2010; Pani et al., 2010; Ropers, 2010).

Over the past 50 years, conventional karyotyping has been successfully used to identify chromosomal abnormalities. Karyotype has the advantage of surveying the entire genome at once, but the resolution of cytogenetic analysis is limited to approximately 5-10 Mb. In the past 20 years, new molecular techniques have been introduced and smaller structural variations among submicroscopic changes so-called copy number variations (CNVs) can only be identified through molecular approaches, such as fluorescent *in situ* hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification and microarray techniques.

The microarray technique, introduced in 2003 to investigate genome-wide chromosome imbalances in patients with ID and/or MCA, can detect up to 99% of all chromosomal changes (Vissers et al., 2003; Hochstenbach et al., 2009).

Because of its high diagnostic yield, effectiveness and health-care possibilities, array-based screen for CNVs was recommended in 2010 by the American College of Medical Genetics and Genomics as the preferred first clinical genetic diagnostic test for patients with developmental delay, ID or MCA (Newman et al., 2007; Wordsworth et al., 2007; Gijsbers et al., 2009; Manning et al., 2010; Miller et al., 2010; Regier et al., 2010; South and Brothman, 2011; Bartnik et al., 2014). In addition, microarray analyses provide accurate diagnosis in approximately twice as many cases as classical karyotyping and fluorescent *in situ* hybridization (Gijsbers et al., 2009; Hochstenbach et al., 2009; Ahn et al., 2010; Miller et al., 2010). In recent years, approximately 15-20% of ID cases are caused by submicroscopic CNVs (Zahir and Friedman, 2007; Gijsbers et al., 2009).

In Brazilian studies, genome changes investigated by array techniques have been detected in up to 25% of patients with idiopathic syndromic ID (Krepischi-Santos et al., 2006; Hochstenbach et al., 2011).

Here, we present a pioneering study of array-CGH in a group of Northeastern Brazilian patients with ID and/or MCA with no etiological diagnosis.

## MATERIAL AND METHODS

From April 2010 to July 2014, a total of 200 patients were referred for genetic diagnosis by medical genetic centers from the Northeastern states of Brazil. Our total group consisted of

98 (49%) males and 102 (51%) females. Inclusion criterion was ID without a defined etiology, associated or not with MCAs.

### Sample collection and DNA extraction

Blood samples were collected from the patients and their parents, when available. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a salting-out method according to standard protocols.

### Array-CGH

Investigation was performed using array-CGH with 44 K (N = 1), 60 K (N = 180), and 180 K (N = 19) oligo-chips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). DNA digestion, labeling, and hybridization were performed following the manufacturer instructions.

### Analysis and CNV classification

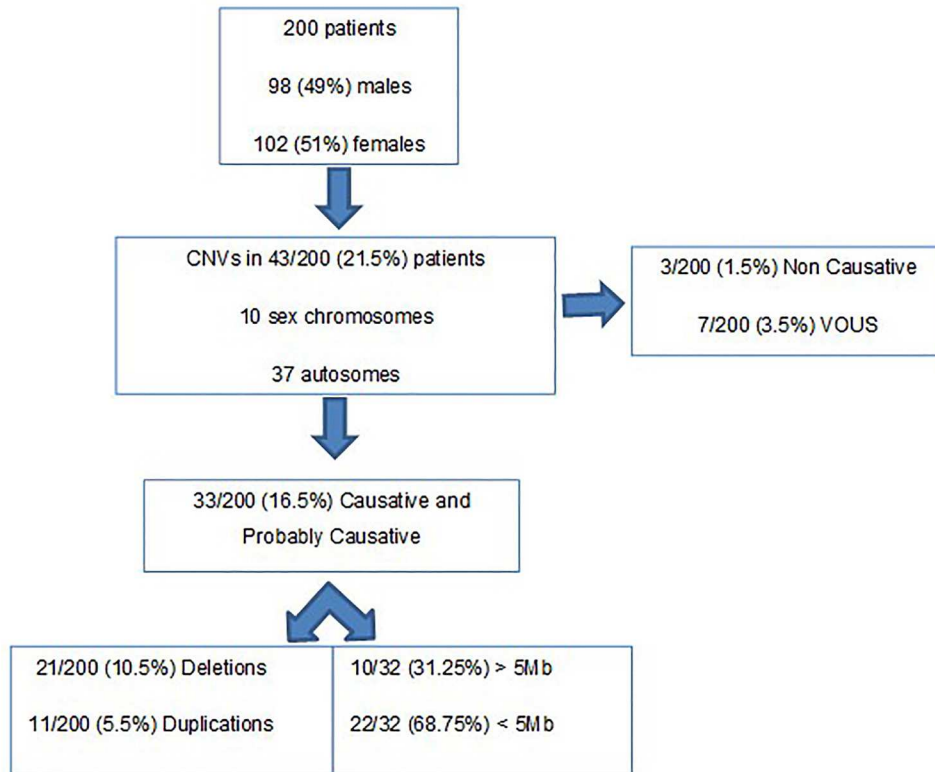
All chromosomal abnormalities identified, including deletions and duplications of at least 3 adjacent probes or of a minimum region of 300 kb, were compared with genomic variants described in databases of benign and pathogenic changes to define their possible pathogenicity (DGV <http://projects.tcag.ca/variation/>, UCSC Genome Browser <http://www.genome.ucsc.edu/>, ISCA <https://www.iscaconsortium.org/>, and DECIPHER <http://decipher.sanger.ac.uk/>). Furthermore, gene content was also evaluated using databases such as the NCBI Gene Database, GeneCards, and OMIM.

CNVs were classified as described by Miller et al. (2010) and were classified into 4 groups: I) causatives, when associated with known microdeletion/microduplication syndromes; II) probably causative, when the CNV was not previously associated with known microdeletion/microduplication syndromes, but contained genes known to cause a syndrome of a clear phenotype (Ahn et al., 2013) or because similar CNVs were already described in patients from other studies; III) non-causative (benign); IV) VOUS, variants of unknown clinical significance.

## RESULTS

Samples from 200 children with ID and/or MCA were analyzed. CNVs were identified in 43/200 (21.5%) patients (Figure 1); 25/98 (25.5%) males and 22/102 (21.57%) females. The CNVs included a total of 27 deletions and 20 duplications. In 10/47 (21.3%) patients, the rearrangement involved a sex chromosome. Thirty-nine patients (19.5%) had a chromosomal aberration, whereas 2 concomitant abnormalities (i.e., 1 duplication and 1 deletion) were detected in 4 patients (2%). Ten of 47 CNVs (21.3%) were >5 Mb in size.

A total of 33 causative or probably causative CNVs were detected (16.5%). Among these, microdeletion/microduplications related to known syndromes were identified in 15 patients (7.5%). These syndromes included: chromosome 16p11.2 deletion syndrome; Miller-Dieker lissencephaly syndrome; chromosome 14q11-q22 deletion syndrome; CHARGE syndrome; chromosome 1q41-q42 deletion syndrome; Williams-Beuren syndrome (two 2 cases); Ritscher-Schinzel syndrome; chromosome 7q11.23 duplication syndrome; chromosome 15q13.3 deletion syndrome; Wolf-Hirschhorn syndrome; neurofibromatosis; ichthyosis; and Klinefelter syndrome (Table 1).



**Figure 1.** Flow diagram showing the number of patients studied and their respective CNVs.

**Table 1.** Array-CGH results of 15 Brazilian patients with causative CNVs associated with known microdeletion/microduplication syndromes (group I).

Patient	Gender	Resolution	Locus (Hg 18)	Size	Associated syndrome/OMIM
1	M	60 k	array 1q41q42 (221.105.086-222.351.150)x1	1.3 Mb	1q41q42 Deletion syndrome (MIM ID #612530)
2	F	60 k	array 4p16.3-p16.1 (62.320-6.698.980)x1/array 12p13.33-p13.32 (100.698-10.177.433)x3	6.6 Mb/10 Mb	Wolf- Hirschhorn syndrome (MIM ID #194190)
3	F	60 k	array 7q11.23 (72.652.411-74.136.224)x1	1.5 Mb	Williams-Beuren syndrome (MIM ID #194050)
4	F	60 k	array 7q11.23 (72.404.248-73.831.333)x1	1.4 Mb	Williams-Beuren syndrome (MIM ID #194050)
5	M	60 k	array 7q11.23 (72.382.783-73.777.467)x3	1.5 Mb	7q11.23 Duplication syndrome (MIM ID #609757)
6	F	60 k	array 8q12.1-q12.2 (61.282.418-61.831.475)x1	549 kb	CHARGE syndrome (MIM ID #214800)
7	F	180 k	array 8q24.13 (126.051.391-126.389.649)x3	338 kb	Ritscher-Schinzel syndrome (MIM ID #220210)
8	M	60 k	array 14q12-q13.3 (31.097.626-36.478.503)x1	5.4 Mb	14q11-q22 Deletion syndrome (MIM ID #613457)
9	M	60 k	array 15q13.2-q13.3 (28.742.018-30.231.385)x1	1.48 Mb	15q13.3 Microdeletion syndrome (MIM ID #612001)
10	F	60 k	array 16p11.2 (29.581.468-30.098.094)x1	500 kb	16p11.2 Deletion syndrome (MIM ID #611913)
11	M	60 k	array 2q13 (110.219.763-110.322.064)x1/ array 17p13.3 (867.382-1.592.841)x1	725 kb/ 102 kb	Miller-Dieker syndrome (MIM ID #247200)
12	M	60 k	array 16p12.1 (21.907.260-22.315.593)x1	~400 kb	Recurrent 16p12.1 microdeletion (MIM ID #136570)
13	M	60 k	array 17q11.2 (26.057.789-27.351.206)x1	~1.3 Mb	Neurofibromatosis (MIM ID #162200)
14	M	60 k	array Xp22.31 (110.777.959-111.374.876)x1/ array 7q31.1 (110777959-111374876)x1	~1.5 Mb/ 700 kb	Ichthyosis (MIM ID #308100)
15	M	60 k	array Xp22.33-q28 (701-154.832.671)x2	XXY	Klinefelter syndrome (MIM ID #312300)

In 18 patients (9%), we detected probably causative CNVs that had not previously been associated with any known syndrome (Table 2).

**Table 2.** Array-CGH results of 18 Brazilian patients with probably-causative CNVs, not previously associated with known microdeletion/microduplication syndromes (group II).

Patient	Gender	Resolution	Locus (Hg 18)	Size
16	F	44 k	array 2p25.3 (20.141-2.071.858)x1	~2 Mb
17	M	60 k	array 7q21.11 (79.320.563-84.313.060)x1	4.9 Mb
18	M	60 k	array 9q34.11 (130.097.894-132.378.474)x1	2.2 Mb
19	M	60 k	array 11q13.1 (63.365.945-64.625.636)x1	~1.27 Mb
20	F	60 k	array 13q21.33-q22.3 (67.907.119-77.776.997)x1	9.8 Mb
21	F	180 k	array 14q32.31-q32.33 (102.717.528-107.287.649)x3	4.5 Mb
22	F	60 k	array 15q11.2-q13.1 (18.946.017-26.830.949)x3	8 Mb
23	F	60 k	array 15q26.3 (97.606.456-100.201.002)x1	2.6 Mb
24	M	60 k	array 16q11.2-q22.3 (45.058.116-70.424.463)x3	25 Mb
25	F	60 k	array 17p13.3 (2.340.484-2.516.432)x1	175 kb
26	M	60 k	array 18p11.32-p11.21 (145.520-14.071.934)x1	13.9 Mb
27	M	60 k	array 18q21.2 - q23 (51.915.019-76.083.258)x1	~24 Mb
28	F	60 k	array 18q12.3-q22 (38.288.660-67.206.375)x3	~30 Mb
29	F	60 k	array 22q11.22-11.23 (21.386.362-23.318.602)x3	~1.9 Mb
30	M	60 k	array Xq13.2-q13.3 (73.422.371-74.266.467)x2	~800 kb
31	M	60 k	array Xq24 (118.593.371-118.725.211)x1	130 kb
32	M	60 k	array Xp22.31 (8.393.893-8.649.904)x2	~250 kb
33	F	60 k	array Xq27.2-q28 (140.565.997-154.886.088)x1/ array Xp22.33-q27. (701-140.385.067)x~3	14 Mb /140 Mb

## DISCUSSION

Several studies have shown that it is essential for patients with ID and/or MCA to obtain a definitive diagnosis to receive early medical interventions, better clinical management (Coulter et al., 2011; Riggs et al., 2014), and proper genetic counseling (Pina-Neto, 2008).

In this study, we identified CNVs in 43 of 200 patients (21.5%), 33 of which were considered to be clinically significant, bringing the causative diagnosis rate to 16.5%.

This is the first report of a group of patients from Northeastern Brazil with ID and/or MCA using array-CGH to detect CNVs. Although the selection criteria for array-CGH investigations are highly variable, similar reports in the Brazilian population showed approximately the same detection rate of pathological CNVs. Among 95 Brazilian syndromic patients, Krepischi-Santos et al. (2006) accounted for 17% of CNVs to be causally related to abnormal phenotypes. Pereira et al. (2014) detected 22% of pathogenic CNVs in 15 patients from Central Brazil who had IDs.

In our study, among the 33 causative and probably causative CNVs (Tables 1 and 2), only 8 patients (4%), who had CNVs larger than 5 Mb that could have been detected by karyotype, had this test been offered previously. Thus, the remaining 25 patients would be undiagnosed after conventional cytogenetics, indicating the major contribution of array-CGH for diagnosing these patients.

Interestingly, Klinefelter syndrome was not clinically suspected. This patient was referred at 10 years old, in the prepubertal stage, when hypogonadism had not been characterized. Although his height was in 90th percentile, the parents complained of poor school performance, attention deficit hyperactivity disorder, and bipolar disorder. In this scenario, Klinefelter syndrome was not clinically suspected. Because of the patient's age, it was not possible to diagnose hypogonadism. The unique features related to Klinefelter observed in this patient were height in the 90th percentile and poor school performance. The main feature of this patient was ID and psychiatric disorder.

Patient 33 had a karyotype revealing an extra rearranged X chromosome, suggesting a 47,XXX. However, the clinical phenotype was not completely compatible with the described features of triple X females (Butnariu et al., 2013). The array-CGH test was essential for defining the break points and showed that although she indeed had 3 copies of *SHOX* (Xp22.33), which may explain her high stature (180 cm), she had only 1 copy of *FOP1* (Xq28), a gene related to premature ovarian failure, which may have caused her hypogonadism hypogonadotropic (Rosa et al., 2008).

Eighteen CNVs were classified as probably causative (Table 2). Although they are not related to any previously described syndrome, typically a gene within the CNV is related to a similar phenotype. For example, patient 25 showed a 175-kb interstitial deletion in 17p13.3, which only covers the *LIS1* gene (MIM ID #601545). This likely explains the patient's clinical phenotype (Dobyns et al., 1993; Neer et al., 1993). Patient 31 showed a 130-kb interstitial deletion in Xq24, to which *UBE2A* is mapped (MIM ID #312180). Genomic deletions or point mutations in *UBE2A* have been described in individuals with ID and dysmorphic facial features (Budny et al., 2010). Patient 32 showed a 250-kb interstitial duplication in Xq22.31 involving *KAL1* (MIM ID #300836), which causes ID and MCA in patients when duplicated (Sowińska-Seidler et al., 2015).

Some CNVs were also classified as probably causative because they have been described in other patients with similar clinical characteristics. For example, patients 16, 21, and 24 had a terminal deletion at 2p25.3 (Stevens et al., 2011; Bonaglia et al., 2014; Doco-Fenzy et al., 2014), a terminal duplication at 14q32.31-q32.33, and an interstitial deletion of 500 kb at 16p11.2, respectively.

Among the CNVs classified as causative (N = 33), a greater number of deletions than duplications (22 vs 11) was observed. As previously described by Menten et al. (2006), this observation can be explained in a few ways: there is a greater chance that some duplications are missed technically, duplications generally cause a milder phenotype leading to a selection bias, and the biological frequency of a deletion event is higher than that of a duplication event. Similarly, at the chromosomal level, chromosomal trisomies or supernumerary marker chromosomes are better tolerated than autosomal monosomies (Liehr et al., 2011).

CNVs detected in patients 34, 35, and 36 were classified as non-causative (Table 3) because there have been several descriptions of other patients with variations in the same chromosomal segment in databases, and in some cases, the variations were inherited from a normal parent.

**Table 3.** Array-CGH results of the 3 Brazilian patients with non-causative CNVs - benign (group III).

Patient	Gender	Resolution	Locus (Hg 18)/ inheritance	Size
34	F	60 k	array 6q11.1 (62.354.703-62.935.334)x3/mat	~1 Mb
35	F	60 k	array 9p24.3 (194.090-371.572)x3/mat	177 kb
36	M	60 k	array 15q26.3 (99.753.088-100.080.964)x3/mat	~480 kb

For instance, *DOCK8* (MIM ID #611432) maps within the 177-kb interstitial duplication in 9p24.3 in patient 35. While deletions of the same region have been described in patients with ID (Griggs et al., 2008; Di Gregorio et al., 2014), the effect of duplication of *DOCK8* has not been elucidated. Mental disabilities have been described in patients with duplications in the same genomic segment, but in all cases the duplication was inherited from an unaffected parent. Furthermore, the DGV database reports the occurrence of duplication in this segment in individuals in the general population. Therefore, this variant may contribute to the patient's clinical status; however, the presence of the variant in an unaffected individual clearly indicates that this finding is not sufficient to explain the clinical manifestations, and thus this CNV was classified as not-causative.

Seven CNVs (3.5%) were classified as VOUS (Table 4) because literature data or inheritance patterns did not enable clear determination of its pathogenicity. Patient 37 showed a terminal deletion in the short arm of chromosome 4, affecting band 4p16. Although this CNV overlaps with the region associated with Wolf-Hirschhorn syndrome, it is smaller than that reported in patients with the syndrome and does not appear to involve the critical region. There have been no



descriptions of patients with deletions involving only *PDE6B*, as was observed in this patient. This girl has IDs but she did not have the typical facial characteristics associated with Wolf-Hirschhorn syndrome.

**Table 4.** Array-CGH results of the six Brazilian patients with variants of unknown clinical significance (VOUS; group IV).

Patient	Gender	Resolution	Locus (Hg 18)/inheritance	Size
37	F	60 k	array 4p16 (61.352-799.952)x1/indeterminate	~800 kb
38	F	60 k	array 11q24.2 (126.467.319-126.699.302)x3/indeterminate	231 kb
39	F	60 k	array 16p13.11 (15.399.618-15.514.494)x3/indeterminate	115 kb
40	F	60 k	array 19p13.3 - p13.12 (13.471.747-14.684.081)x1/indeterminate	1.2 Mb
41	F	180 k	array Xq21.1 (80.364.877-80.653.581)x3/indeterminate	289 kb
42	M	60 k	array Xp22.31 (7.594.433-8.057.652)x2/indeterminate	~500 kb
43	M	60 k	array Xp22.31 (6.462.695-8.057.511)x2/indeterminate	~1.6 Mb

Patient 43 contained a duplication of ~1.6 Mb in Xp22.31, as reported in another patient by Faletra et al. (2012). Similarly, variants were observed both in normal individuals and in individuals with clinical conditions associated with ID. Several of the affected individuals inherited the variant from normal parents, showing that this duplication alone is not sufficient to cause the clinical condition, but may determine a predisposition to it.

Although modern molecular cytogenetic methods, including array-CGH, show great potential for identifying novel chromosomal syndromes, there are still several diagnostic challenges and unexplored questions, particularly regarding the role of CNVs in the pathogenesis of complex human genetic diseases. Variants of uncertain clinical significance should be reviewed periodically. Thus, with the description of new cases with the same CNV, it will be possible to elucidate the relationships between the variant and the patient's condition.

A high percentage of ID and MCA are caused by submicroscopic chromosomal imbalances.

Microarray molecular screening of the whole genome is increasingly thought to have clinical impact, replacing standard karyotyping as the first-tier cytogenetic diagnostic test. This may help families and their assistant physicians in reaching an accurate diagnosis, bringing closure to their postnatal search for an explanation regarding the ID and/or MCA.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais/FAPEMIG; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq; and Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte/IEP-SCBH.

## REFERENCES

Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, et al. (2013). Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol. Cytogenet.* 6: 16. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8166-6-16>

- Ahn JW, Mann K, Walsh S, Shehab M, et al. (2010). Validation and implementation of array comparative genomic hybridisation as a first line test in place of postnatal karyotyping for genome imbalance. *Mol. Cytogenet.* 3: 9. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8166-3-9>
- Bartnik M, Nowakowska B, Derwińska K, Wiśniowiecka-Kowalik B, et al. (2014). Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. *J. Appl. Genet.* 55: 125-144. <http://dx.doi.org/10.1007/s13353-013-0181-x>
- Bonaglia MC, Giorda R and Zanini S (2014). A new patient with a terminal de novo 2p25.3 deletion of 1.9 Mb associated with early-onset of obesity, intellectual disabilities and hyperkinetic disorder. *Mol. Cytogenet.* 7: 53. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8166-7-53>
- Budny B, Badura-Stronka M, Materna-Kiryluk A, Tzschach A, et al. (2010). Novel missense mutations in the ubiquitination-related gene UBE2A cause a recognizable X-linked mental retardation syndrome. *Clin. Genet.* 77: 541-551. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01429.x>
- Butnariu L, Rusu C, Caba L, Pânzaru M, et al. (2013). Genotype- phenotype correlation in trisomy X: a retrospective study of a selected group of 36 patients and review of literature. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi* 117: 714-721.
- Coulter ME, Miller DT, Harris DJ, Hawley P, et al. (2011). Chromosomal microarray testing influences medical management. *Genet. Med.* 13: 770-776. <http://dx.doi.org/10.1097/GIM.0b013e31821dd54a>
- Di Gregorio E, Savin E, Biamino E, Belligni EF, et al. (2014). Large cryptic genomic rearrangements with apparently normal karyotypes detected by array-CGH. *Mol. Cytogenet.* 7: 82. <http://dx.doi.org/10.1186/s13039-014-0082-7>
- Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R and Ledbetter DH (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *JAMA* 270: 2838-2842. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1993.03510230076039>
- Doco-Fenzy M, Leroy C, Schneider A, Petit F, et al. (2014). Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. *Eur. J. Hum. Genet.* 22: 471-479. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.189>
- Faletra F, D'Adamo AP, Santa Rocca M, Carrozzi M, et al. (2012). Does the 1.5Mb microduplication in chromosome band Xp22.31 have a pathogenetic role? New contribution and a review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A: 461-464. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.34398>
- Galasso C, Lo-Castro A, El-Malhany N and Curatolo P (2010). "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Ital. J. Pediatr.* 36: 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1824-7288-36-17>
- Gijsbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH, et al. (2009). A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur. J. Hum. Genet.* 17: 1394-1402. <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2009.74>
- Griggs BL, Ladd S, Saul RA, DuPont BR, et al. (2008). Dedicator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. *Genomics* 91: 195-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.10.011>
- Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, et al. (2009). Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur. J. Med. Genet.* 52: 161-169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2009.03.015>
- Hochstenbach R, Buijzer-Voskamp JE, Vorstman JA and Ophoff RA (2011). Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet. Genome Res.* 135: 174-202. <http://dx.doi.org/10.1159/000332928>
- Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, et al. (2006). Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet. Genome Res.* 115: 254-261. <http://dx.doi.org/10.1159/000095922>
- Liehr T, Ewers E, Hamid AB, Kosyakova N, et al. (2011). Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 842-848. <http://dx.doi.org/10.1369/0022155411412780>
- Manning M and Hudgins L; Professional Practice and Guidelines Committee (2010). Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet. Med.* 12: 742-745. <http://dx.doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181f8baad>
- Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, et al. (2006). Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J. Med. Genet.* 43: 625-633. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2005.039453>
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, et al. (2010). Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* 86: 749-764. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.04.006>
- Neer EJ, Schmidt CJ and Smith T (1993). LIS is more. *Nat. Genet.* 5: 3-4. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0993-3>
- Newman WG, Hamilton S, Ayres J, Sanghera N, et al. (2007). Array comparative genomic hybridization for diagnosis of



- developmental delay: an exploratory cost-consequences analysis. *Clin. Genet.* 71: 254-259. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00756.x>
- Pani AM, Hobart HH, Morris CA, Mervis CB, et al. (2010). Genome rearrangements detected by SNP microarrays in individuals with intellectual disability referred with possible Williams syndrome. *PLoS One* 5: e12349. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012349>
- Pereira RR, Pinto IP, Minasi LB, de Melo AV, et al. (2014). Screening for intellectual disability using high-resolution CMA technology in a retrospective cohort from Central Brazil. *PLoS One* 9: e103117. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103117>
- Pina-Neto JM (2008). Genetic counseling. *J. Pediatr. (Rio J.)* 84 (Suppl): S20-S26.
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, et al. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am. J. Med. Genet. A.* 140: 2063-2074. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.31416>
- Regier DA, Friedman JM and Marra CA (2010). Value for money? Array genomic hybridization for diagnostic testing for genetic causes of intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* 86: 765-772. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.03.009>
- Riggs ER, Wain KE, Riethmaier D, Smith-Packard B, et al. (2014). Chromosomal microarray impacts clinical management. *Clin. Genet.* 85: 147-153. <http://dx.doi.org/10.1111/cge.12107>
- Ropers HH (2010). Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 11: 161-187. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141640>
- Rosa RF, Dibi RP, Picetti JdosS, Rosa RC, et al. (2008). [Amenorrhea and X chromosome abnormalities]. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 30: 511-517.
- South ST and Brothman AR (2011). Clinical laboratory implementation of cytogenomic microarrays. *Cytogenet. Genome Res.* 135: 203-211. <http://dx.doi.org/10.1159/000331425>
- Sowińska-Seidler A, Piwecka M, Olech E, Socha M, et al. (2015). Hyperosmia, ectrodactyly, mild intellectual disability, and other defects in a male patient with an X-linked partial microduplication and overexpression of the KAL1 gene. *J. Appl. Genet.* 56: 177-184. <http://dx.doi.org/10.1007/s13353-014-0252-7>
- Stevens SJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Janssen JW, Klein Wassink-Ruiter JS, et al. (2011). MYT1L is a candidate gene for intellectual disability in patients with 2p25.3 (2pter) deletions. *Am. J. Med. Genet. A.* 155A: 2739-2745. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.34274>
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, et al. (2003). Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1261-1270. <http://dx.doi.org/10.1086/379977>
- Wordsworth S, Buchanan J, Regan R, Davison V, et al. (2007). Diagnosing idiopathic learning disability: a cost-effectiveness analysis of microarray technology in the National Health Service of the United Kingdom. *Genomic Med.* 1: 35-45. <http://dx.doi.org/10.1007/s11568-007-9005-6>
- Zahir F and Friedman JM (2007). The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clin. Genet.* 72: 271-287. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00847.x>