

Gustavo Henrique Vieira

Análise molecular de pacientes com
síndrome de Smith-Magenis

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista – UNESP,
Campus de Botucatu para obtenção do título
de Doutor em Ciências Biológicas – Área de
Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Co-orientador: Anand Kumar Srivastava

Botucatu – SP

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Vieira, Gustavo Henrique.

Análise molecular de pacientes com síndrome de Smith-Magenis /
Gustavo Henrique Vieira. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2009

Orientador: Danilo Moretti-Ferreira

Co-orientador: Anand K. Srivastava

Capes: 20205007

1. Síndromes - Aspectos moleculares.

Palavras-chave: Genética; Microarranjo; Reação em Cadeia da Polimerase;
Síndrome; Smith-Magenis; Variação no número de cópias

Dedicatória

Dedico este trabalho...

À minha mãe, Vilma, por ser minha eterna companheira e amiga e pelo exemplo de dignidade, honestidade e solidariedade.

Ao meu pai Edvar, por ser meu amigo e companheiro mais precioso e por ensinar os meus mais importantes valores.

À minha irmã querida, Camila, por ser exemplo de perseverança, alegria e amor à vida.

A toda minha família.

Ofereço este trabalho a todas as famílias de portadores de síndrome genética e especialmente a aqueles que fizeram parte deste trabalho.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Campus de Botucatu e todo seu corpo docente e funcionários.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, sua direção, corpo docente e funcionários.

Ao Departamento de Genética e todos seus funcionários, por disponibilizar sua estrutura para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: área de concentração: Genética.

Ao Serviço de Aconselhamento Genético e todos seus funcionários e colaboradores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, tanto durante o desenvolvimento do projeto no Brasil quanto nos Estados Unidos da América.

Ao Greenwood Genetic Center e todos seus colaboradores.

Ao Prof. Adj. Dr. Danilo Moretti-Ferreira, pela orientação, ensinamentos e amizade. Pelas discussões e pela paciência durante a transmissão de suas experiências.

Ao Dr. Anand Srivastava pela orientação durante a condução deste trabalho nos EUA e por me mostrar uma nova maneira de olhar para ciência.

Ao Dr. Charles Schwartz pela ajuda científica durante o período nos EUA.

Ao Msc. Carlos Eduardo Frigério Domingues, irmão e companheiro de laboratório, pelas inúmeras discussões que muito contribuíram para a construção desta tese.

Ao Msc. Bruno Faulin Gamba, companheiro durante o desenvolvimento deste trabalho, pelos momentos agradáveis durante as viagens de coleta, pela ajuda na revisão dos prontuários clínicos e pela amizade e companheirismo.

À Deise Helena de Souza e Daniel Rocha de Carvalho pela ajuda em momentos importantes deste trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, pela ajuda na parte burocrática da tese.

Aos inúmeros médicos e serviços que confirmam parte do diagnóstico de seus pacientes a nós.

A Lynn Rimsky, Melissa Cook, Fatima Abidi, Joy Norris, Andrea Licata, Linda Holloway, Sara Sowell e Jayson Rodriguez pela ajuda na parte metodológica, Julianne Collins pela ajuda na parte estatística, Cindy Skinner e Matt Darmer pela ajuda na organização das amostras e Richa Koul, Luigi Boccutto e Heather McCartney em inúmeros momentos, que além de ajudarem na parte científica fizeram minha passagem pelos EUA ficar mais agradável. Obrigado a todos vocês meus amigos.

A Uilian de Andreis, meu irmão e futuro compadre, por estar presente em todos os momentos.

A toda minha família pela ajuda psicológica durante várias fases deste trabalho, sem eles possivelmente este trabalho não seria realizado.

A Larissa Doddi, Larissa Lumi, Layla Galindo, Henrique Roffato, Camila Marconi, Marina Guerra, Breila Oliveira, Juliana Mazzuchelli, Rosana Bicudo, Rodrigo Quiezi e todos meus amigos e companheiros de pós-graduação que, em momentos de convivência e de troca de experiências, proporcionaram ajuda psicológica e “insights” que foram utilizados em algum momento dos quatro anos de desenvolvimento deste trabalho.

Índice

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Características Epidemiológicas	04
1.2. Características Clínicas	04
1.2.1. Desenvolvimento do paciente com SMS	05
1.2.2. O Fenótipo Comportamental	09
1.2.3. O Distúrbio de Sono	11
1.2.4. Perfil cognitivo e atraso de fala e linguagem	13
1.3. Etiologia da SMS	13
1.3.1. Genes na região cromossômica 17p11.2	16
1.4. Variação do número de cópias no genoma Humano	22
1.4.1. Mecanismos de Origem de CNVs	23
1.5. Correlação Fenótipo/Genótipo na SMS	27
1.6. Diagnóstico da SMS	27
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Casuística	36
3.2. Aspectos éticos	37
3.3. Grupos amostrais	37
3.3.1. Critérios de inclusão	38
3.3.2. Critérios de exclusão	38
3.3.3. Avaliação clínica	39
3.4. Análises Laboratoriais	40
3.4.1. Obtenção de amostra biológica	40
3.4.2. Análises Citogenéticas	40
3.4.2.1. Hibridização in situ por fluorescência (FISH)	40
3.4.3. Análises moleculares	41
3.4.3.1. Obtenção do DNA genômico	41
3.4.3.2. Análise de CNVs por microarranjo (aCGH)	41

3.4.3.3. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	43
3.4.3.4. Análise dos éxons dos gene <i>RAII</i> através do sequenciamento direto	45
3.4.4. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	49
Artigo científico 1. Detection of classical 17p11.2 deletions, an atypical deletion and <i>RAII</i> alterations in suspected cases of Smith-Magenis syndrome	50
<i>Introduction</i>	51
<i>Material and Methods</i>	52
<i>Results</i>	53
<i>Discussion</i>	60
<i>References</i>	66
Artigo científico 2. Differential Diagnosis of Smith-Magenis syndrome: 1p36 deletion syndrome	69
5. CONCLUSÃO	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXOS	102
<i>Ofício de aprovação do Comitê de ética em Pesquisa, FMB – UNESP</i>	103
<i>Termo de consentimento livre e esclarecido</i>	104
<i>Ficha de avaliação de pacientes com suspeita clínica de SMS</i>	106

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características clínicas mais frequentes de acordo com o período de desenvolvimento do indivíduo com SMS.	08
Tabela 2. Características do fenótipo comportamental na SMS.	11
Tabela 3. Características do distúrbio de sono na SMS	12
Tabela 4. Mutações no gene <i>RAI1</i>	16
Tabela 5. Genes codificantes de proteínas localizados na região 17p11.2 e suas correlações no OMIM.	19
Tabela 6. Síndromes com diagnóstico diferencial para SMS.	29
Tabela 7. Iniciadores utilizados na reação de PCR quantitativa	44
Tabela 8. Programa utilizado para a reação de PCR quantitativa.	45
Tabela 9. Iniciadores utilizados para a realização das PCRs pré-sequenciamento.	46
Tabela 10. Programa utilizado para a reação de PCR pré-sequenciamento	47
Tabela 11. Programa utilizado para a reação de sequenciamento.	47
Artigo científico 1 – Inglês	
Table 1. Clinical features of SMS and SMS-like groups.	55
Table 2. 17p11.2 copy number variation identified in the SMS cohort.	59
Suppl. Table 1. Allelic frequencies of SNPs identified in the coding region of <i>RAI1</i>	66
Suppl. Table 2. <i>In silico</i> predictions of pathogenicity for mutations described in this study	66
Artigo científico 2– Inglês	
Table 1. Clinical features of patient SAG7559 showing an overlap between SMS and 1p36 phenotypes	72

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos tipos de deleção envolvendo a SMS.	14
Figura 2. Representação esquemática do gene <i>RAI1</i> e da proteína traduzida por ele	15
Figura 3. Genes presentes na região cromossômica 17p11.2p12 e sua associação com demais afecções.	17
Figura 4. Representação esquemática mostrando NAHR	23
Figura 5. Representação esquemática mostrando NHEJ	25
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo FoSTeS.	26
Figura 7. Representação esquemática da região 17p11.2.	30
Figura 8. Fluxograma utilizado neste projeto para realização do diagnóstico da SMS	31
Figura 9. Metodologia utilizada para a análise de CNVs por microarranjos.	43
Artigo científico 1 – Inglês	
Figure 1. Comparative facial phenotype	54
Figure 2. Array CGH profiles of chromosome 17	57
Figure 3. Analysis by quantitative real-time PCR at 6 cases with classical SMS deletion	58
Figure 6. Sequencing chromatograms showing the point mutation of <i>RAI1</i> gene	60
Artigo científico 1 – Inglês	
Figure 1. Patient SAG7559.	73
Figure 2. Array CGH profile of chromosome 1 in SAG7559	74

RESUMO

A síndrome de Smith-Magenis (SMS) foi descrita, em 1986, como uma síndrome que envolvia uma mutação na região 17p em 9 pacientes. Sua prevalência está estimada em um caso a cada 25.000 nascidos vivos. A SMS apresenta fenótipo que inclui características físicas, no desenvolvimento e comportamentais. Os sinais faciais se caracterizam por uma face larga e de forma quadrangular, braquicefalia, frontal proeminente, sinofre, fendas palpebrais alongadas para cima, ponte nasal larga, hipoplasia de face média, nariz largo e achatado, micrognatia na infância com relativa prognatia com a idade e lábio superior protruso e em 'v' invertido. Os sinais clínicos mais importantes na SMS são comportamentais que levam a autoagressão, hiperatividade e déficit de atenção. Foram estudados 31 pacientes brasileiros com suspeita diagnóstica de SMS. As análises genéticas realizadas para avaliar este grupo incluíram técnicas de citogenética molecular (FISH), aCGH, PCR quantitativa e busca por mutações na região de transcrição do gene *RAI1*. Os resultados demonstraram que mais de 90% dos casos neste estudo tinham deficiência mental, atraso no desenvolvimento da fala e comportamento de auto-injúria. Além disso, 30% (9/30) tiveram deleção ou mutação de ponto na região 17p11.2 e *RAI1* gene, sendo que 67% apresentaram uma deleção clássica (6/9), 11% tinham uma deleção atípica (1/9) e 22% (2/9) tinham uma mutação no gene *RAI1*. Foi possível determinar o ponto de quebra das deleções observadas e determinar os genes envolvidos. A deleção atípica descrita neste trabalho atingiu parte do gene *RAI1* e até o momento não havia sido descrita. Além disso, duas mutações de ponto, no exon 3 do gene foram descritas. Por fim, dentro do grupo estudado, foi diagnosticado um caso com síndrome da deleção 1p36, sendo possível a sugestão de um novo diagnóstico diferencial para a SMS. Estes resultados adicionam informações sobre a etiologia da SMS e pode facilitar o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, incluindo sondas FISH e análise de sequenciamento baseado em mutações.

ABSTRACT

The Smith-Magenis syndrome (SMS) was described in 1986 as a syndrome involving a deletion in the 17p region in 9 patients. Its prevalence is estimated at one case per 25.000 live births. The SMS has phenotype that includes physical and behavioral development. The facial features are characterized by brachycephaly, midface hypoplasia, relative prognatism, everted, "tented" upper lip and deep-set, close-spaced eyes. The most important clinical features in SMS are leading behavioral self-injury, hyperactivity and attention deficit. We studied 31 Brazilian patients with suggested diagnostic to SMS. The genetic analysis performed to evaluate this group included molecular cytogenetic techniques (FISH), aCGH, quantitative PCR and the search for mutations in the gene transcription *RAII*. Results showed that over 90% of the cases in this study had intellectual disability, delayed speech-language development, and self-injurious behavior. Furthermore, 30% had deletion or point mutation in the 17p11.2 region and *RAII* gene. Within this group, we found that 67% carried a classic deletion, 11% had an atypical deletion and 22% had a mutation in the *RAII* gene. It was possible to determine the breakpoint of the deletions observed and to determine the genes involved. The atypical deletion described reached part of the gene *RAII* and to date had not been described. In addition, two point mutations in exon 3 gene have been described. Finally, in this study group, one case was diagnosed with 1p36 deletion syndrome hinting of a possible new Differential Diagnosis for SMS. These findings add information for the etiology of SMS and may facilitate the development of new diagnostic tools, including FISH probes and sequencing-based screening for mutations.

Introdução

O primeiro relato, associando uma deleção intersticial no braço curto do cromossomo 17, foi realizado por Ann C. M. Smith, no ano de 1982, onde foram descritos dois pacientes que apresentavam fissura de palato e problemas cardíacos (Smith *et al.*, 1982). Em 1984, Patil e Bartley relatam um paciente do sexo feminino com deleção em 17p11.2, apresentando deficiência mental, hipotonia, atraso no desenvolvimento da fala, orelhas pequenas, perda auditiva, esotropia, displasia dentária e prognatismo.

Em 1986, o grupo liderado por Ellen Magenis e tendo como primeira autora Ann C.M. Smith, descreveu nove pacientes com deleção na mesma região (17p), sendo um paciente com a deleção completa da região cromossômica 17p11.2 (deleção de toda a banda cromossômica) e oito pacientes com deleção parcial (deleção de parte da banda p11.2). Os nove casos apresentavam braquicefalia, hipoplasia de face média, prognatismo, voz rouca, atraso no desenvolvimento da fala (algumas vezes associado à perda de audição), atraso do crescimento, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e problemas comportamentais. O paciente com a deleção completa da região 17p11.2 apresentava fenótipo mais grave, incluindo malformações faciais, fissura de palato, anomalias cardíacas, esqueléticas e do sistema urogenital (Smith *et al.*, 1986).

Em 1986, Stratton *et al.* descreveram mais seis pacientes com fenótipo parecido aos descritos anteriormente por Smith *et al.* (1986) e com deleção da região 17p11.2, sugerindo que pacientes com este fenótipo deveriam ser submetidos à análise do cromossomo 17.

Cinco pacientes, apresentando sinais clínicos que incluíam braquicefalia e hipoplasia de face média, braquidactilia, deficiência mental e comportamento diferenciado foram descritos por Colley *et al.* (1990). Estes pacientes, além do fenótipo característico, apresentado até aquele momento, se destacavam por hiperatividade e por apresentarem distúrbio de sono como sua principal queixa clínica. Os autores referem aos casos até então

chamados de deleção 17(p11.2 p11.2), como sendo portadores de síndrome de Smith-Magenis (SMS, OMIM #182290).

A afecção foi definida como sendo uma anomalia congênita múltipla, clinicamente distinta, associada à deficiência mental, devida a uma deleção intersticial no cromossomo 17. Greenberg *et al.* (1991), realizaram análise molecular em 32 pacientes, utilizando marcadores polimórficos, localizados entre as regiões 17p11.1 e 17p13.2, associando a síndrome aos marcadores deletados na região proximal do cromossomo 17p, concluindo que a SMS é uma síndrome de genes contíguos. Neste mesmo estudo, também foi realizada a análise do fenótipo, concluindo que características clínicas como neuropatia periférica, comportamento de automutilação, distúrbios do sono ou redução do sono REM, deveriam ser consideradas na avaliação de pacientes com suspeita de SMS. Por fim, foi possível determinar a origem parental da deleção em 15 dos pacientes estudados, sendo que nove pacientes apresentaram origem paterna da deleção e seis pacientes origem materna, demonstrando assim, ausência do fenômeno de *imprinting*.

Mocla *et al.* 1993, diagnosticaram três pacientes, através de técnica de citogenética de alta resolução, apresentando como principais características clínicas, atraso no desenvolvimento da fala, hiperatividade e problemas de comportamento, braquicefalia, hipoplasia de face média e mãos pequenas e largas.

Em um estudo clínico multidisciplinar, Greenberg *et al.* (1996), analisaram 27 pacientes com SMS. Esta caracterização demonstrou que 94% dos pacientes analisados apresentavam anomalias otorrinolaringológicas, 85% anomalias oculares, 75% distúrbios de sono, sendo principalmente redução do sono REM, 68% problemas com a audição, 65% escoliose, 52% anomalias cerebrais, na sua maioria ventriculomegalia. O Coeficiente de Inteligência (QI) foi avaliado e os pacientes apresentaram valores entre 40 e 54, classificando-os assim como deficiência mental moderada.

O fenótipo comportamental da SMS foi caracterizado por Dykens *et al.* (1998) e incluía auto injúria, movimentos estereotipados e dificuldades de socialização.

1.1. Características Epidemiológicas

A SMS teve sua incidência estimada por Greenberg *et al.* (1991) em 1:25.000 nascimentos. A atual prevalência é de 1:15.000, acometendo de maneira igualitária indivíduos do sexo feminino e masculino (Smith *et al.*, 2005a). Porém, ambas as estimativas estão baseadas na população americana. Não existem estimativas realizadas na população brasileira, além disso, o Brasil apresenta um grande número de casos de deficiência mental, sem diagnóstico definido.

1.2. Características Clínicas

A SMS é uma síndrome com fenótipo reconhecível clinicamente, porém por se tratar de uma síndrome de microdeleção, o fenótipo é amplamente variável. As características faciais da síndrome são: face larga e de formato quadrado, braquicefalia, frontal proeminente, sinofre, olhos encovados, ponte nasal larga, hipoplasia de face média, micrognatia na infância, prognatia com a idade e lábio superior protruso e em “v” invertido (Smith *et al.*, 2010). Anomalias odontológicas, como agenesia de pré molares e taurodontismo já foram reportadas (Tomona *et al.*, 2006).

Os indivíduos portadores da síndrome apresentam deficiência mental de leve à moderada (Greenberg *et al.*, 1996; Udwin *et al.*, 2001) A síndrome apresenta um fenótipo comportamental, que inclui distúrbios de sono, movimentos estereotipados e comportamentos

de autoinjúria (Sarimski, 2004; Dykens & Smith, 1998; Smith *et al.*, 1998a; Gropman *et al.*, 2006; Elsea & Girirajan, 2008; Williams *et al.*, 2010).

1.2.1. Desenvolvimento do paciente com SMS

Os pacientes portadores de SMS, de acordo com o histórico neonatal, apresentam diminuição do movimento intrauterino em 50% dos casos. Os nascimentos são a termo, apresentando peso, comprimento e perímetro cefálico dentro dos padrões de normalidade (Smith & Gropman, 2005).

Durante o primeiro ano de vida, o desenvolvimento neuropsicomotor não está de acordo com os padrões de normalidade (Wolters *et al.*, 2009). O peso e comprimento se desaceleram e em aproximadamente 20% das crianças, a circunferência craniana é menor que o 3º percentil (Smith & Gropman, 2005). Nesta fase da infância foram relatados casos apresentando hipotonia, disfunção oral, infecções de ouvido médio, com pouco ou nenhum comprometimento das habilidades sociais e dos comportamentos adaptativos da criança (Wolters *et al.*, 2009). O distúrbio de sono é percebido pelos pais após o primeiro ano de vida (Duncan *et al.*, 2003).

O neonato raramente chora e, na maioria dos casos, as capacidades de balbúcio e vocalização estão comprometidas. Entre o segundo e o terceiro ano de vida, existe uma desaceleração do desenvolvimento neuropsicomotor e um grande atraso de linguagem. Aumentando também, o comprometimento dos comportamentos adaptativos (Gropman *et al.*, 2006; Wolters *et al.*, 2009).

Durante a infância, é frequente hipersensibilidade do ouvido médio. Otites ocorrem frequentemente, mais de três vezes ao ano, com risco de perda de audição em 85% dos casos. Hiperacusia é relatado em 78% dos casos (Smith *et al.*, 2007). Problemas na região da laringe

(pólipos, nódulos, edemas, paralisias das cordas vocais) e da velofaringe são frequentemente reportados e estão diretamente ligados a voz rouca descrita em alguns pacientes (60%) (Smith *et al.*, 2010). Além disso, hipercolesterolemia é detectada em mais de 50% das crianças durante a infância (Smith *et al.*, 2002).

O comprometimento da cognição é bastante evidente durante a infância, com a diminuição da capacidade de reconhecer processos sequenciais e da memória de curta duração. A memória de longa duração, geralmente é relativamente melhor, bem como a capacidade de perceber parte do todo (Udwin *et al.*, 2001; Dykens *et al.*, 1997).

O fenótipo comportamental pode ser percebido na idade escolar e se acentua com o avanço da idade. A maioria dos indivíduos demonstra falta de atenção, que pode ou não estar acompanhada de hiperatividade. O comprometimento do comportamento adaptativo se configura como sendo o maior problema para as famílias com afetados pela síndrome. Este quadro inclui comportamento explosivo e birras, impulsividade, distrabilidade, desobediência, agressões, automutilação e problemas de controle de esfínteres (Dykens & Smith, 1998). A hipótese de que o aumento do comprometimento do comportamento adaptativo esteja diretamente ligado aos distúrbios de sono foi sugerida por Shelley *et al.* (2005).

Durante a adolescência, casos com SMS, apresentam um aumento dos efeitos do distúrbio de sono (Gropman *et al.*, 2007). Além disso, os comportamentos estereotipados se tornam mais evidentes, como a onicotilomania (do inglês “onychotillomania”), que é o hábito de comer e/ou arrancar as unhas, assim como a poliembolocoilomania (do inglês “polyembolokomania”), que é a inserção de objetos em orifícios do corpo (boca, nariz, ouvido, ânus e vagina) (Finucane *et al.*, 2001).

Nos casos de SMS adultos, algumas características faciais são mantidas (hipoplasia de face média e prognatismo) e a escoliose pode se tornar mais acentuada. Com avanço para a

senilidade, estes indivíduos podem apresentar continuidade do fenótipo comportamental (Smith *et al.*, 2004). O comportamento de agressividade e auto-injúria se mantém, mas estes indivíduos são descritos como mais calmos. A expectativa de vida é a mesma que um indivíduo sem a síndrome, sendo descritos casos com até 88 anos de idade (Smith *et al.*, 2010).

Tabela 1. Características clínicas mais frequentes de acordo com o período de desenvolvimento do indivíduo com SMS.*

Período do desenvolvimento	Características clínicas
Pré e neonatal	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição do movimento fetal • Nascimento a termo com peso, comprimento e perímetro cefálicos normais • Peso, comprimento e perímetro cefálico não progridem com o desenvolvimento • Face: hipoplasia de face média, nariz pequeno e arrebitado, Lábio superior espesso, micrognatia. • Dificuldade para sugar e engolir, refluxo gastro-esofágico • Hiporreflexia, hipotonia • Choro raro e frequentemente rouco
Infância	<ul style="list-style-type: none"> • Hipotonia generalizada • Comprometimento da função oral-motora • Anormalidades de ouvido médio • Início de problemas comportamentais • Os problemas de sono normalmente começam no 9º mês de vida, porém é percebido entre 12 e 18 meses de vida.
Período escolar	<ul style="list-style-type: none"> • Anomalias oculares (estrabismo, miopia, anormalidades na íris, micro córnea) • Escoliose moderada • Baixa estatura, mãos e pés pequenos. • Otites frequentes, anormalidades na laringe (pólipos, nódulos, edemas e paralisia das cordas vocais) • Mobilidade da língua e dos lábios comprometida • Sinusites • Atraso de fala • Falta de atenção (pode estar acompanhada de hiperatividade) • Comportamento: Birras, busca de atenção, impulsividade, distrabilidade, desobediência, agressão automutilação, onicotilomania, poliembolocoilomania, auto-abraço, lambe as mãos quando folheia página
Adolescência	<ul style="list-style-type: none"> • Hipoplasia de face média • Prognatismo relativo • Frontal proeminente e com sinofre • Sobrancelhas grossas • Puberdade, geralmente no momento correto, porém ocorrências de precocidade já foram relatadas. • Distúrbio de sono e comportamento (Onicotilomania, poliembolocoilomania) podem se acentuar
Adulto	<ul style="list-style-type: none"> • Face grosseira: hipoplasia de face média, prognatismo relativo (resultando em um queixo pontudo) • Sinusite crônica • Escoliose se acentua • Comportamento persiste, mas é notada uma relativa calma • Relatos de casos com 88 anos de idade

* (Smith *et al.*, 2010)

1.2.2. O Fenótipo Comportamental

O termo fenótipo comportamental foi introduzido pela primeira vez por William Nyhan (1972) ao focar sua atenção no comportamento de automutilação presentes nos meninos com déficit de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (doença de Lesch-Nyhan) descrevendo que, “o comportamento é endógeno e não exógeno”, e que os afetados tinham um padrão incomum e singular de comportamento. Harris *et al.* (1987), após avaliarem crianças afetadas pela síndrome de Prader-Willi com hiperfagia e Lesch-Nyhan com automutilação, propõem que o fenótipo comportamental abrange transtornos de comportamento não aprendidos, ou seja, que não são determinados por fatores educacionais ou do meio ambiente do paciente (exógeno).

Desta forma, a ideia é que o fenótipo de muitas condições não se restringe às características físicas e à predisposição a certos problemas médicos, (cardiopatia, malformação renal, etc) como também abrange e, principalmente, inclui o comportamento (Dykens, 2000). O fenótipo comportamental envolve a alta probabilidade de um indivíduo, com uma afecção genética reconhecível, vir a exibir um padrão característico de comprometimento do seu desenvolvimento e do comportamento comparado àqueles que não são portadores (Dykens, 1995).

As características comportamentais, em casos de portadores de SMS, incluem movimentos peculiares, comportamentos estereotipados, hiperatividade e dificuldades no processamento sensorial (Dykens & Smith, 1998; Gropman *et al.*, 2006; Dykens *et al.*, 1997; Hicks *et al.*, 2008; Finucane & Jaeger, 1997; Finucane *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009).

O movimento estereotipado que se reporta como específico para a SMS é o de alto-abraço ou “*spasmodic upper-body squeeze*”, que se traduz como movimento de abraçar-se,

principalmente em circunstância de excitação, quando muito alegres ou contrariados. Este pode ser de dois tipos: colocar os braços ao redor do tórax ou apertar as mãos com os dedos entrelaçados na altura do peito ou do queixo (Finucane *et al.*, 1994). O outro movimento estereotipado apontado como marcador diagnóstico é descrito como “*hand licking and page flipping*” que traduzimos como lambar repetitivamente os dedos a como se folheassem páginas (ou até colocar vários dedos dentro da boca) (Smith *et al.*, 1998a). Estes movimentos incomuns e repetitivos chamaram a atenção dos cuidadores dos afetados, antes mesmo da confirmação diagnóstica da SMS.

Os principais tipos de comportamentos de auto-injúria relatados nos afetados são: morder as mãos, poliembolocoilomania e onicotilomania, muitas vezes requerendo atenção vigorosa dos cuidadores. Em seu estudo de revisão, Shelley *et al.* (2005) mostraram uma frequência de 96.6% destes comportamentos de auto-injúria nos pacientes estudados. Ambos os comportamentos estão relacionados à redução de sensibilidade que se acredita ocorrer nos afetados e que estão mais presentes ao final da infância, e na adolescência (Smith *et al.*, 2004).

Alguns outros aspectos singulares são: uma necessidade insaciável de atenção individualizada dos adultos (principalmente o professor na sala de aula) e uma fascinação exagerada por mexer em equipamentos eletrônicos (incluindo computadores, gravadores, etc.) (Smith *et al.*, 1998a).

Padrões característicos no perfil cognitivo e de linguagem dos pacientes com a SMS, também são comparados e detalhados em diferentes estudos (Dykens, 2000).

Tabela 2. Características do fenótipo comportamental na SMS.

Fenótipo Comportamental	Frequência (%)	Referência
Hiperatividade	74	(Williams <i>et al.</i> , 2010)
Auto-abraço	63	(Williams <i>et al.</i> , 2010)
Lamber os dedos ao virar páginas	90	(Dykens <i>et al.</i> , 1997)
Auto-injúria	96,6	(Williams <i>et al.</i> , 2010)
Onicotilomania	55,2	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Mãos	48,3	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Pés	34,5	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Poliembolocoilomania	25-85	(Elsea & Girirajan, 2008)
Orelhas	31	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Nariz	17,2	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Reto	3,5	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Vagina	21,1	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Bater a cabeça	55,2	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Se estapear	62,1	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Puxar os cabelos	34,5	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)
Morder a mão	93,1	(Finucane <i>et al.</i> , 2001)

1.2.3. O Distúrbio de Sono

O distúrbio de sono, apresentado pelos pacientes com SMS, foi reportado em 62% dos casos descritos por Greeberg *et al.* (1991), em mais de 90% dos casos com deleção e em 100% dos casos com mutação no gene *RAII*, em estudo Elsea & Girirajan (2008) e em 88% dos casos com deleção ou mutações no gene *RAII* e 97% dos casos de SMS-like (sem alterações na região 17p11.2), em estudo de Williams *et al.* (2010).

O distúrbio se caracteriza por dificuldades de pegar no sono, dificuldades de continuar dormindo e por acordar frequentemente durante a noite (Greenberg *et al.*, 1991), além disso,

são reportadas sonolência e a necessidade de períodos de sono durante o dia (Smith *et al.*, 1998b; De Leersnyder *et al.*, 2001a)

Em estudo realizado por De Leersnyder *et al.* (2001a) com 20 crianças com SMS, concluíram que o distúrbio de sono em SMS é decorrente de uma inversão do ciclo circadiano e a cinética de liberação de melatonina pela glândula pineal se apresenta alterada, porém não na quantidade de hormônio liberado. Desta forma, o estudo sugere que não sejam utilizados tratamentos como a administração de melatonina ao indivíduo e que sejam utilizados tratamentos alternativos, como terapia com luz.

Outros estudos buscaram entender e mensurar o distúrbio de sono na SMS (De Leersnyder *et al.*, 2001b; Cornelissen *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005b; Boudreau *et al.*, 2009). Cornelissen *et al.* (2003) concluíram que não há uma inversão completa do ciclo da melatonina em pacientes do SMS, porém há uma alteração de 9,6 horas em sua liberação pela glândula. Assim, o ápice da concentração sérica da melatonina que em indivíduos normais ocorre por volta das 3 horas da manhã, em indivíduos com SMS ocorre por volta das 13 horas.

Chik *et al.* (2010), testaram a hipótese de se utilizar os níveis de melatonina na saliva de pacientes com suspeita de SMS, para auxiliar o diagnóstico. Porém, seus resultados não foram suficientes para distinguir a pacientes com SMS de pacientes com outras condições clínicas.

Tabela 3. Características do distúrbio de sono na SMS.*

	Frequência (%)
Total de tempo de sono menor que 7 horas	54
Anormalidades no sono REM	73
Acordar espontaneamente durante a noite	86
Sonolência diurna > 10 min. (TLMS)	50
Ciclo da melatonina invertido	93

* segundo (Boudreau *et al.*, 2009)

1.2.4. Perfil cognitivo e atraso de fala e linguagem

Os estudos que avaliam e caracterizam o perfil cognitivo e atraso de fala e linguagem na SMS são escassos. Distúrbio de aprendizagem, com dificuldades de leitura e escrita são relatados por Udwin *et al.* (2001). Estudos relataram pacientes com diminuição da memória de curta duração, memória de longa duração relativamente fortalecida, da mesma maneira que a capacidade de manter o foco visual e clusura (capacidade de perceber o todo pela parte) (Smith *et al.*, 2010; Dykens *et al.*, 1997).

Atraso de fala e linguagem ocorre em 90% dos casos com a deleção clássica de SMS e em 70% dos casos com mutações no *RAII*. Elsea & Girirajan (2008) sugerem que as avaliações de fala e linguagem nos pacientes de SMS são necessárias para aperfeiçoar o processo de comunicação funcional do paciente e para o desenvolvimento de estratégias de intervenção mais eficientes.

1.3. Etiologia da SMS

A SMS é uma afecção que tem como etiologia a haploinsuficiência da região 17p11.2, contendo o gene *RAII* ou mutações no gene *RAII* (Smith *et al.*, 1986; Slager *et al.*, 2003; Vlangos *et al.*, 2003)

Aproximadamente 90% dos casos de SMS apresentam a deleção, enquanto o restante (10%) apresenta a mutação no gene *RAII* (Elsea & Girirajan, 2008). Microdeleções são causadas por irregularidades nos mecanismos de recombinação genômica, no caso de SMS, mediadas por elementos repetitivos chamados LCR (*Low-Copy number Repeats*). Chen *et al.*, 1995, identificaram três regiões repetitivas (LCRs) responsáveis pela microdeleção da região 17p11.2. Estas repetições são um substrato para os mecanismos de recombinação

intercromossômicos e são denominadas SMS-REP proximal, SMS-REP medial e SMS-REP distal, no caso da SMS. Em 70% dos casos de SMS, ocorre uma recombinação não alélica dos homólogos (NAHR) de maneira desigual entre as SMS-REPs proximal e distal, gerando uma microdeleção de aproximadamente 3,7Mb. Nos 30% restantes podem ocorrer recombinações alternativas entre os SMS-REPs (distal x medial), gerando microdeleções menores, além disso, elementos repetitivos menores como os elementos *Alu*, que são ricos em sequência AT, podem atuar como substratos de recombinação. Ademais, mecanismos não homólogos, podem gerar deleções de tamanhos atípicos (Shaw *et al.*, 2004; Shaw & Lupski, 2005).

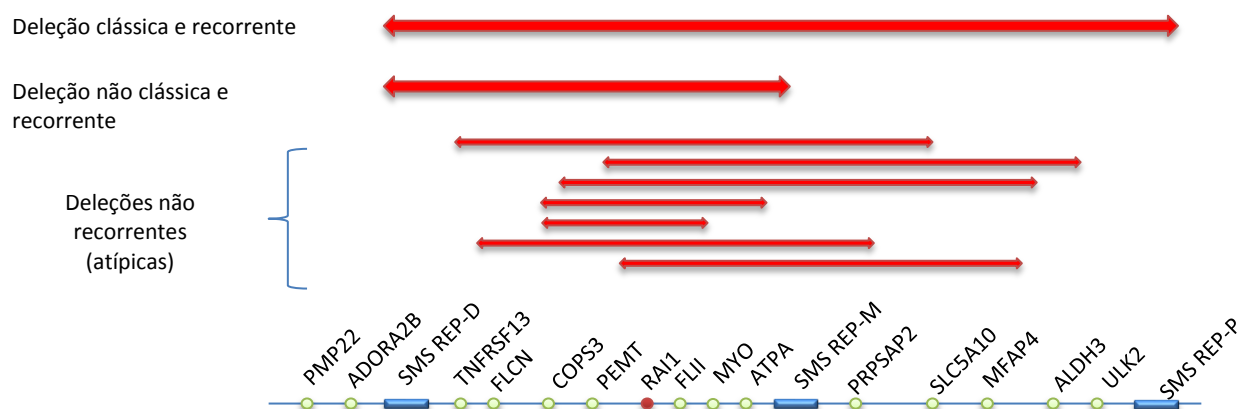


Figura 1. Representação esquemática dos tipos de deleção envolvendo a SMS (Lupski, 2007).

O gene *Rai1* foi primeiramente estudado em células cancerígenas de camundongos. A proteína que é traduzida pelo gene *RAI1* esta possivelmente ligada à diferenciação celular, segundo Slager *et al.* (2003).

Girirajan *et al.* (2009) sugerem que a função do gene *RAI1* esteja ligada ao controle de diversos processos biológicos e a interrupção deste controle, pela haploinsuficiência do gene, gera o fenótipo observado na SMS.

O transcrito primário do gene *RAI1* é formado de seis éxons, gerando um RNAm de ~8,5kb e uma proteína de 1906 aminoácidos (ID - ENST00000353383). Outros oito

transcritos podem ser observados. A proteína traduzida contém, entre seus domínios, Sinais de Ligação Celular (NLS), regiões de poli-glutaminas e poli-serinas e um *C-terminal homeodomain (PHD) / zinc finger domain*. Portanto, estes domínios indicam que as funções da proteína estejam ligadas a mecanismos que envolvem crescimento e a regulação dos processos de desenvolvimento do comportamento neural (Elsea & Girirajan, 2008).

Todas as mutações envolvendo o gene *RAII*, foram descritas no éxon 3 do gene, sendo que nove delas alteram o quadro de leitura no RNAm (*frameshift*) gerando um códon de parada precocemente e uma proteína com um número de aminoácidos menor que o esperado. Outras três mutações promovem a substituição de aminoácidos (*missense*) e apenas uma promove a substituição do aminoácido por um códon de parada no local da substituição (*nonsense*), totalizando assim 14 mutações descritas no gene *RAII* (Figura 2 e Tabela 4).

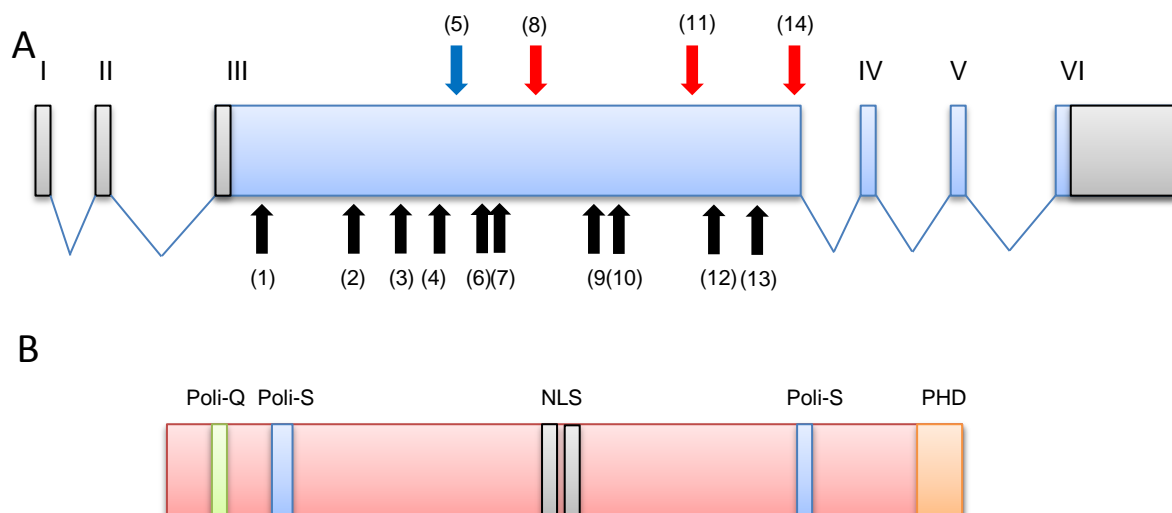


Figura 2. Representação esquemática do gene *RAII* e da proteína traduzida por ele. (A) gene *RAII* (transcrito *RAII-001*) as setas indicam as 14 mutações descritas no gene (tabela 4): seta azul, mutação *nonsense*; seta vermelha, mutações *missense* e setas pretas, mutações *frameshift*. (B) proteína traduzida pelo gene *RAII*, em destaque regiões de poli-glutaminas(Q), poli-serinas (S), o sinal de localização celular (NLS) e *Zinc finger C-terminal* (PHD).

Tabela 4. Mutações no gene *RAII*

Número de referência	Nº figura 2	Mutação	Mudança na proteína	Referência
CD054409	1	253del19	<i>Frameshift</i>	Girirajan et al., 2005
CD063605	2	1119delC	<i>Frameshift</i>	Girirajan et al., 2006
CD030745	3	1449delC	<i>Frameshift</i>	Slager et al., 2003
CG035309	4	2773del29	<i>Frameshift</i>	Slager et al., 2003
CM043561	5	C2878T	Arg-Term	Bi et al., 2004
CI043730	6	3103insC	<i>Frameshift</i>	Bi et al., 2004
CD065784	7	3103delC	<i>Frameshift</i>	Bi et al., 2006
CM065434	8	A3634G	Ser-Gly	Bi et al., 2006
CD054410	9	3801delC	<i>Frameshift</i>	Girirajan et al., 2005
CD056839	10	4649delC	<i>Frameshift</i>	Girirajan et al., 2006
CM054095	11	A4685G	Gln-Arg	Girirajan et al., 2005
CD056840	12	4933delGCCG	<i>Frameshift</i>	Girirajan et al. 2006
CD030746	13	5265delC	<i>Frameshift</i>	Slager et al., 2003
CM054094	14	G5423A	Ser-Asn	Girirajan et al. 2005

*Segundo (Elsea & Girirajan, 2008).

1.3.1. Genes na região cromossômica 17p11.

A região cromossômica 17p11.2 possui 51 genes que codificam proteínas, muitas destas proteínas ainda sem função conhecida. Alguns dos genes desta região cromossômica foram associados a outras condições como a síndrome de Sjogren-Larson, por exemplo, além do gene *RAII* que até o momento é o principal gene associado com SMS (Gropman *et al.*, 2007). A figura 3 mostra os genes presente na região 17p11.2p12 e sua associação com demais afecções.

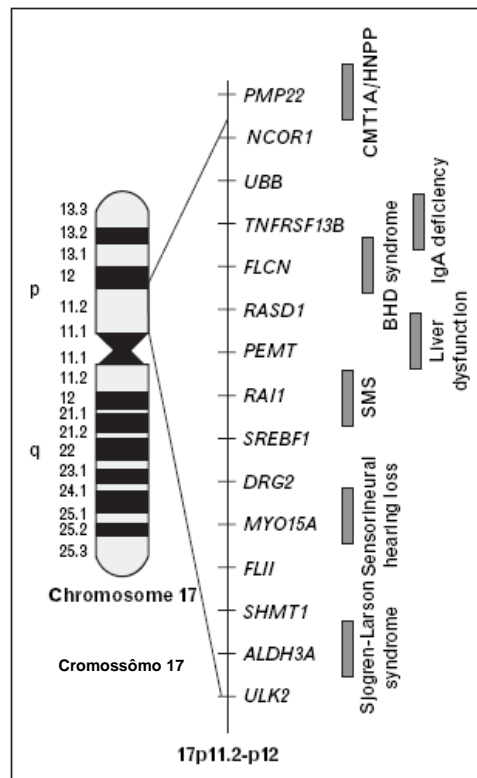


Figura 3. Genes presentes na região cromossômica 17p11.2p12 e sua associação com demais afecções. Note que o gene *RAI1* é o principal gene relacionado à SMS (Gropman *et al.*, 2007).

O gene *FLCN*, responsável pela síndrome de Birt-Hogg-Dube (OMIM #135150), quando apresenta uma mutação dominante causa o início de tumores renais e de pele (Baba *et al.*, 2006; Pittet *et al.*, 2006). Outro relato demonstra que a deleção do gene *TNFRSF13B* pode diminuir os níveis de IgA (OMIM #604907) nos pacientes com SMS (Rachid *et al.*, 2006). O locus *ALDH3A*, mapeado próximo ao gene *RAI1*, causa a síndrome neurocutânea Sjogren-Larsson (OMIM #270200), este fato pode estar associado com a ocorrência de pele seca em pacientes com SMS (Gropman *et al.*, 2007). Além destes relatos, esteatose e alterações hepáticas em pacientes com SMS podem ser atribuídas ao gene *PEMT*, já que polimorfismos neste gene foram associados com esteatose não alcoólica por Song *et al.*, (2005). *PMP22* é outro gene presente em 17p11.2 que codifica uma proteína integrante de membrana, um componente importante da mielina no sistema nervoso periférico. Mutações

neste gene estão associadas à síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (OMIM #118220) e outras neuropatias hereditárias.

O gene *FLII* codifica uma proteína com domínio de ligação da actina e um N-terminal rico em leucina, domínio da interação entre proteínas. A proteína codificada tem funções na organização estrutural dos músculos, papel este semelhante à proteína da drosófila envolvidos na embriogênese e na organização estrutural do músculo de vôos indiretos (Pruitt *et al.*, 2007).

O gene *UBB* codifica ubiquitina, uma das proteínas mais conservadas, a qual é necessária para as reações ATP-dependentes, degradação de proteínas intracelulares não-lisossomais e de proteínas anormais. A ubiquitina liga-se covalentemente à proteínas com a função de degradá-las e também liga-se à histona H2A em regiões ativamente transcritas, porém nesta proteína, acredita-se que sua função esteja ligada a regulação da expressão gênica. Por conseguinte, formas errôneas dessa proteína têm sido observadas em pacientes com doença de Alzheimer e em portadores da síndrome de Down (Pruitt *et al.*, 2007). Andrieux *et al.*, (2007) analisaram 30 pacientes com SMS, diagnosticados pela técnica de FISH, e relataram um caso com uma grande deleção (12Mb) que incluía o gene *UBB*, entre os sinais clássicos da SMS o paciente apresentava fissura de palato o que indicava que esse gene poderia ser um bom candidato para fissura de palato não sindrômica.

O gene mais estudado e relacionado à SMS é o gene *RAI1*. A proteína codificada por esse gene inclui um domínio N-terminal polimórfico, muito semelhante ao seu homólogo do rato. Este gene foi associado a vários tipos de transtornos neurológicos. Estudo realizado por Girirajan *et al.*,(2009) mostraram que o papel deste gene na SMS está relacionado a diversas anomalias apresentadas pelos pacientes, mas que a gravidade do fenótipo é devido à

influência de outros genes presentes na região 17p11.2. Os 51 genes presentes na região 17p11.2 são mostrados na tabela 5.

Tabela 5. Genes codificantes de proteínas localizados na região 17p11.2 e suas correlações no OMIM.

Gene	Descrição	OMIM
<i>TBC1D27</i>	<i>TBC1 domain family, member 27</i>	Sem correlações
<i>TNFRSF13B</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B</i>	Imunodeficiência de IgA
<i>MPRIP</i>	<i>myosin phosphatase Rho interacting protein</i>	Controla a formação de fibras vasculares elásticas através da interação com a Miosina Fosfatase
<i>PLD6</i>	<i>phospholipase D family, member 6</i>	Sem correlações
<i>FLCN</i>	<i>folliculin</i>	Pode estar envolvido com energia e/ou nutrientes necessárias para as vias de sinalização mTOR através da AMPK
<i>COPS3</i>	<i>COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 3 (Arabidopsis)</i>	Embriogênese e diferenciação celular
<i>NT5M</i>	<i>5',3'-nucleotidase, mitochondrial</i>	Controla a síntese de DNA mitocondrial
<i>MED9</i>	<i>mediator complex subunit 9</i>	Ativação da RNA polymerase II através da interação dieta com fatores de transcrição
<i>RASD1</i>	<i>RAS, dexamethasone-induced 1</i>	Relacionado com o ciclo circadiano
<i>PEMT</i>	<i>phosphatidylethanolamine N-methyltransferase</i>	Controla processos intracelulares
<i>RAI1</i>	<i>retinoic acid induced 1</i>	SMS
<i>SMCR5</i>	<i>Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 5 (non-protein coding)</i>	Sem correlação
<i>SREBF1</i>	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>	Em ratos, a administração sistêmica do peptídeo interferência INSIG1 impediu a ativação SRE1, reduziu substancialmente os danos neuronais, e os resultados comportamentais melhoraram
<i>TOMIL2</i>	<i>target of myb1-like 2 (chicken)</i>	Agregação endossomal
<i>LRRC48</i>	<i>leucine rich repeat containing 48</i>	Sem correlações

Tabela 5. Genes codificantes de proteínas localizados na região 17p11.2 e suas correlações no OMIM. (continuação)

Gene	Descrição	OMIM
<i>ATPAF2</i>	<i>ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2</i>	Sinais dismórficos e atraso do desenvolvimento
<i>C17orf39</i>	<i>chromosome 17 open reading frame 39</i>	Sem correlações
<i>DRG2</i>	<i>developmentally regulated GTP binding protein 2</i>	Sem correlações
<i>MYO15A</i>	<i>myosin XVA</i>	Surdez
<i>ALKBH5</i>	<i>alkB, alkylation repair homolog 5 (E. coli)</i>	Sem correlações
<i>LLGL1</i>	<i>lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila)</i>	Auto-renovação de neuroblasto
<i>FLII</i>	<i>flightless I homolog (Drosophila)</i>	Em camundongos, mutações recessivas causaram morte do embrião
<i>SMCR7</i>	<i>Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 7</i>	Sem correlações
<i>TOP3A</i>	<i>topoisomerase (DNA) III alpha</i>	Embriogênese precoce
<i>SMCR8</i>	<i>Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 8</i>	Sem correlações
<i>SHMT1</i>	<i>serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)</i>	Crescimento celular
<i>EVPLL</i>	<i>envoplakin-like</i>	Sem correlações
<i>LGALS9C</i>	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 9C</i>	Sem correlações
<i>FAM106A</i>	<i>family with sequence similarity 106, member A</i>	Sem correlações
<i>CCDC144B</i>	<i>coiled-coil domain containing 144B</i>	Sem correlações
<i>TBC1D28</i>	<i>TBC1 domain family, member 28</i>	Sem correlações
<i>ZNF286B</i>	<i>zinc finger protein 286B</i>	Sem correlações
<i>TRIM16L</i>	<i>tripartite motif-containing 16-like</i>	Sem correlações

Tabela 5. Genes codificantes de proteínas localizados na região 17p11.2 e suas correlações no OMIM. (continuação)

Gene	Descrição	OMIM
<i>FBXW10</i>	<i>F-box and WD repeat domain containing 10</i>	Ubiquitinação
<i>FAM18B</i>	<i>family with sequence similarity 18, member B</i>	Sem correlações
<i>PRPSAP2</i>	<i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2</i>	Substrato primário e controle para a síntese de purinas, pirimidinas, histidina e triptofanos
<i>SLC5A10</i>	<i>solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 10</i>	Sem correlações
<i>FAM83G</i>	<i>family with sequence similarity 83, member G</i>	Sem correlações
<i>GRAP</i>	<i>GRB2-related adaptor protein</i>	Sinalização para vias de sinalização de proteínas RAS
<i>EPN2</i>	<i>epsin 2</i>	Sem correlações
<i>B9D1</i>	<i>B9 protein domain 1</i>	Sem correlações
<i>MAPK7</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 7</i>	Integridade dos vasos sanguíneos
<i>MFAP4</i>	<i>microfibrillar-associated protein 4</i>	Adesão e interação celular
<i>RNF112</i>	<i>ring finger protein 112</i>	Sem correlações
<i>SLC47A1</i>	<i>solute carrier family 47, member 1</i>	Equilíbrio eletrolítico
<i>ALDH3A2</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2</i>	Síndrome de Sjogren-Larsson
<i>SLC47A2</i>	<i>solute carrier family 47, member 2</i>	Excreção de eletrólitos tóxicos a célula
<i>ALDH3A1</i>	<i>aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1</i>	Sem correlações
<i>ULK2</i>	<i>unc-51-like kinase 2 (C. elegans)</i>	Associado com o desenvolvimento neural
<i>AKAP10</i>	<i>A kinase (PRKA) anchor protein 10</i>	Risco de morte súbita cardíaca
<i>CYTSB</i>	<i>cytospin B</i>	Sem correlações

*Segundo (The NCBI handbook)

1.4. Variação do número de cópias no genoma humano

Com o aumento do desempenho dos métodos de análise molecular do genoma, foi possível identificar uma nova variação no genoma humano, a Variação do Número de Cópias ou CNVs. Inicialmente chamado de Polimorfismos do Número de Cópias (CNP), por Sebat *et al.* (2004) e por variação do número de cópias em alto escala (LCVs), por Sebat *et al.* (2004), CNVs são rearranjos desbalanceados, definidos como segmentos de DNA, maiores que 100pb de extensão que estão presentes em diferentes números de cópias entre os indivíduos (1-5 cópias) (Oldridge *et al.*, 2010). Atualmente, estimam-se, as CNVs, ocupem aproximadamente 30% do genoma humano (Zhang *et al.*, 2009). Cerca de 58.000 CNVs já foram descritas e cerca de 5.000 (8%) estão ligadas a alguns tipos de fenótipos mendelianos: dominante, como a SMS, recessivos, como a beta-talassemia, ligado ao cromossomo X, como a hemofilia A e doenças complexas, como a doença de Alzheimer (Schwaab *et al.*, 1995a; Schwaab *et al.*, 1995b; Favier *et al.*, 2000; Thein *et al.*, 1990; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006; Potocki *et al.*, 2000). Entretanto a extensão, frequência e a total caracterização de variações comuns no genoma, ainda não são conhecidas (Oldridge *et al.*, 2010).

As síndromes ou doenças associadas à CNVs são conhecidas como Síndromes de Genes Contíguos, Doenças Genômicas ou Doenças da Arquitetura Genômica. Doenças Genômicas, são causadas por uma alteração do genoma que pode gerar perda ou ganho, total ou parcial, de genes, com consequências no fenótipo clínico. Estas alterações incluem deleções, duplicações, inversões, translocações e cromossomos marcadores (Lupski, 1998).

1.4.1. Mecanismos de Origem de CNVs

Existem quatro mecanismos conhecidos que geram CNVs, são eles: Recombinação Homóloga Não Alélica (*NonAllelic Homologous Recombination*, NAHR), União Terminal Não Homóloga (*Nonhomologous End-Joining*, NHEJ), Modelo de troca de forquilha de replicação (*Fork Stalling and Template Switching*, FoSTeS) e a Retrotransposição de elementos 1 (*LI retrotransposition*).

A NAHR é causada pelo pareamento errôneo e posterior recombinação entre regiões cromossômicas homólogas. O substrato, para este evento de recombinação, são regiões repetitivas chamados de repetições com baixo número de cópias (*Low Copies Repeats*, LCRs) e apresentam entre 10 e 400 Kb de tamanho. O processo de recombinação é dependente do tamanho das repetições, do grau de identidade, da distâncias entre as LCRs e da orientação dos fragmentos. Além disso, para que o processo ocorra, deve haver o compartilhamento de regiões de altíssimo grau de similaridade entre as LCRs, chamados segmentos mínimos com identidade de sequências perfeita (Minimal Efficient Processing Segments - MEPS) (Gu & Lupski, 2008). Quando o alinhamento destas sequências ocorre de maneira errada temos a ocorrência de CNVs (Figura 4)

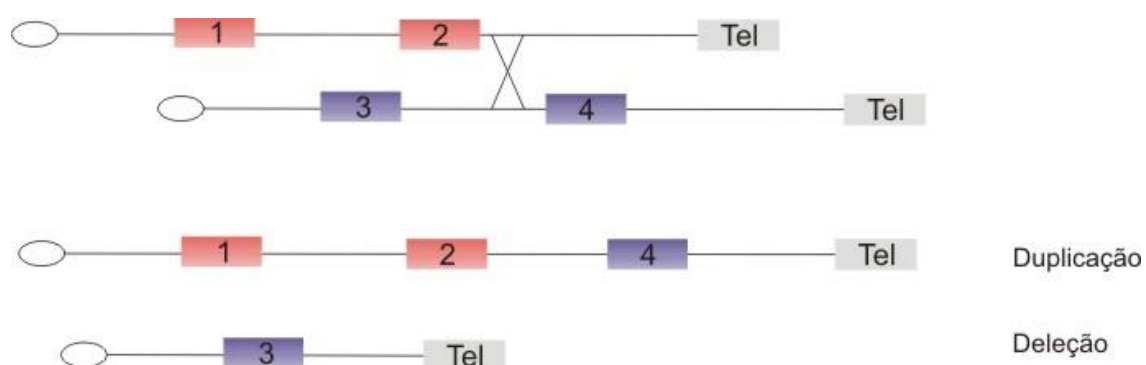


Figura 4. Representação esquemática mostrando NAHR. O pareamento ocorre de maneira errada entre as regiões que apresentam homologia, LCRs, podendo acarretar na ocorrência de uma deleção ou de uma duplicação (EichlerLab, 2006).

O NHEJ (*Nonhomologous End-Joining*) é um dos mais frequentes mecanismos utilizados pela célula eucariota para o reparo de quebras de dupla fita (Double Strand Breaks – DSB). Normalmente, as células humanas utilizam do mecanismo de NHEJ, para reparar quebras “fisiológicas”, recombinações e quebras de dupla fita patológicas, causadas por radiação ionizante ou algumas formas reativas de oxigênio. Além disso, NHEJ é considerado o mais frequente mecanismo causador de translocação cromossômica em células cancerosas.

O processo de NHEJ ocorre em quatro etapas: detecção das DSB, realização de uma “ponte” molecular entre as terminações da quebra, modificação das terminações para que ocorra a compatibilização e ligação e por fim a ligação das fitas. O NHEJ não é dependente de regiões de alta similaridade, como LCRs ou MEPS, porém algumas translocações e deleções não clássicas do cromossomo 17p tem em seus pontos de quebra LCRs, isso demonstra que apesar de não ser necessárias para a ocorrência de NHEJ, LCRs podem estimular o processo (Stankiewicz *et al.*, 2003a). A localização, no genoma, de onde ocorreu o processo de NHEJ, só é possível pelo fato haver a inserção ou a deleção de poucos nucleotídeos, para que ocorra a compatibilização das extremidades das fitas, esse fato deixa uma “cicatriz” no genoma permitindo assim a análise. Desta forma, quebras consecutivas e junções indevidas, podem resultar em deleções e modificar a estrutura genômica.

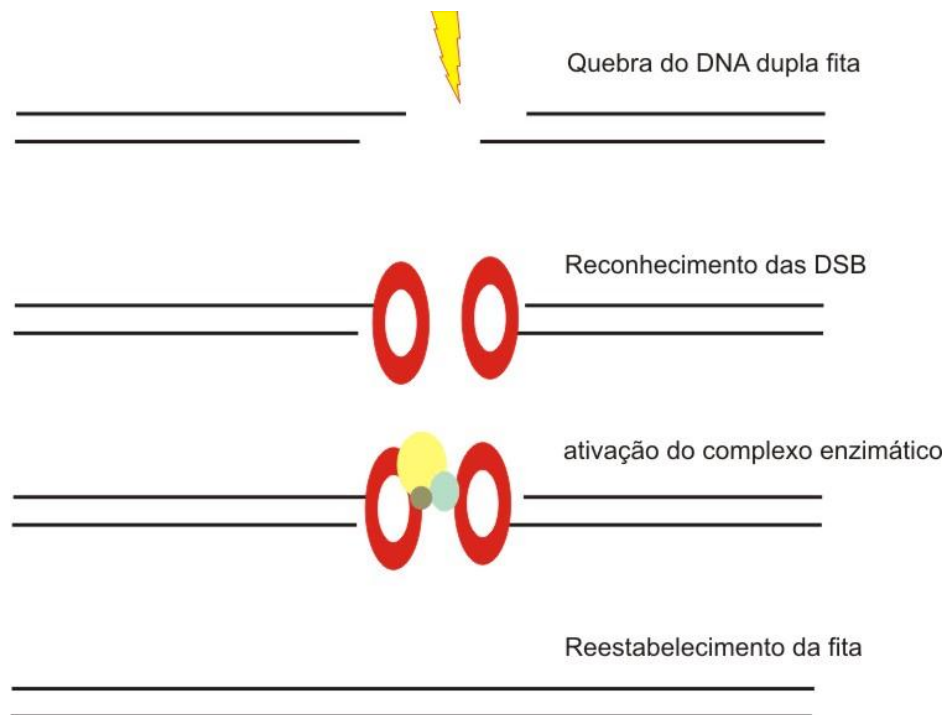


Figura 5. Representação esquemática mostrando NHEJ.

O mecanismo FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*), diferentemente do NAHR e NHEJ, tem como base a replicação do DNA e também pode gerar rearranjos genômicos. O processo dá origem a rearranjos complexos com poucos pares de base de identidade. O processo foi estudado em regiões de triplicação, deleção e segmentos não alterados do gene *PLP1*. De acordo com o modelo proposto por Lee *et al.* (2007), a nova fita que está sendo sintetizada, no processo de duplicação, pode se desprender do DNA molde e invadir uma outra forquilha de replicação, continuando sua síntese de maneira errônea. O processo é dependente de regiões de micro-homologia entre as fitas (poucos pares de base), além disso, o FoSTeS podem ocorrer em sequência gerando alterações múltiplas e em série (Zhang *et al.*, 2009). Representação esquemática dos mecanismos FoSTeS é mostrada na figura 5.

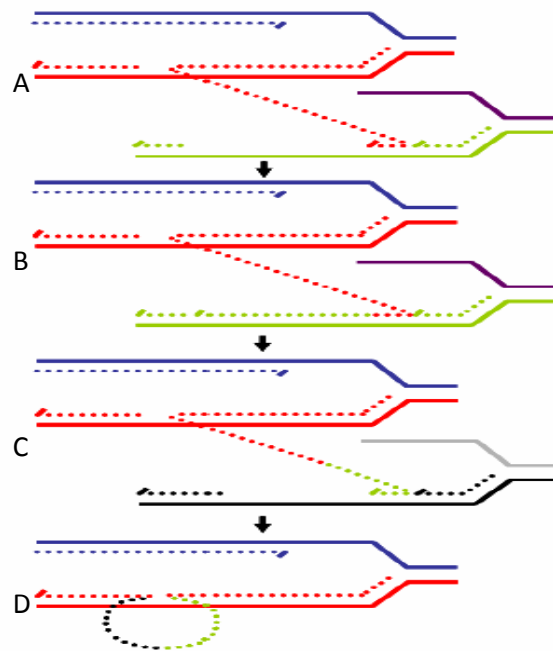


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo FoSTeS. (A) Após a parada da forquilha de replicação a cadeia “atrasada” (pontilhado vermelho) se desacopla da cadeia original e se anela com a segunda forquilha (pontilhado verde) através de micro homologia; (B) seguindo a extensão do novo “iniciador” o DNA é sintetizado; (C) após o desacoplamento, pode haver ainda a invasão de uma terceira fita (pontilhado preto); (D) retomada a replicação na forquilha original (Lee *et al.*, 2007).

Além dos três processos descritos (NAHR, NHEJ e FoSTeS), CNVs podem ocorrer pela inserção de elementos L1. Esses elementos são os únicos *transposons* no genoma humano que apresentam atividade autônoma e cobrem cerca de 16% de todo o DNA genômico (Goodier & Kazazian, 2008). Além disso, no momento da transposição, os elementos L1, podem ser inseridos em regiões gênicas, estes elementos também são responsáveis pela mobilização de elementos *Alu* e elementos SVA (SINE-R, VNTR). Xing *et al.* (2009) utilizaram análises computacionais e verificaram que cerca de 10% de inserções e deleções estão ligadas a algum tipo de elemento transponível, seja L1, *Alu* ou SVA.

As deleções recorrentes da SMS, sejam elas clássicas (~4Mb) ou menores, envolvendo a região SMS crítica (1,1Mb) são geradas por NAHR. Outras deleções, não

recorrentes são gerados por mecanismos não dependentes de homologia (Stankiewicz *et al.*, 2003b).

1.5. Correlação Fenótipo/Genótipo na SMS

Não há distinção fenotípica entre os pacientes que apresentam grandes ou pequenas deleções na região cromossômica 17p11.2 (Potocki *et al.*, 2003). Pacientes com mutação no gene *RAI1* diferem de pacientes com deleção por apresentar obesidade, e por não apresentar baixa estatura ou anomalias do sistema de órgãos (Slager *et al.*, 2003; Bi *et al.*, 2004; Girirajan *et al.*, 2005). Todos os outros sinais clínicos, associados à SMS, estavam presentes em pacientes que apresentavam mutações no gene *RAI1*.

Pacientes que apresentam o diagnóstico clínico de SMS, mas não apresentam deleções no cromossomo 17p11.2 ou mutações no gene *RAI1*, são denominados SMS-like. Williams *et al.* (2010), analisaram 52 pacientes SMS-like. Clinicamente estes pacientes se diferenciavam dos pacientes com mutação (del17p11.2 ou gene *RAI1* mutado), por apresentarem maior frequência de comportamentos estereotipados e convulsões; e em menor frequência, anomalias craniofaciais e oculares, infecções de ouvido, fissura de lábio e palato, voz rouca, alterações cardíacas, problemas digestivos, baixa estatura e braquidactilia.

1.6. Diagnóstico da SMS

O diagnóstico da SMS tem início em uma suspeita clínico que se sustenta por características faciais, fenótipo comportamental e distúrbio do sono, e esta suspeita é confirmada somente com a detecção de uma alteração na região p11.2 do cromossomo 17 ou de mutações no gene *RAI1*. O fenótipo comportamental na SMS é único e em conjunto com o

distúrbio de sono, voz rouca, características de mãos e pés, excelente memória de longa duração, habilidade e foco em computadores, algumas cicatrizes características do comportamento de auto-injúria, associados com a face sugestiva para SMS são pistas importantes para a realização do diagnóstico. O diagnóstico diferencial deve ser feito com síndrome da deleção 9q34, síndrome de Down, síndrome de Williams, síndrome de Prader-Willi, síndrome da deleção 22q11.2 e síndrome de Sotos (Tabela 6) (Elsea & Girirajan, 2008).

A confirmação do diagnóstico pode ser realizada através da detecção da deleção 17p11.2, através de citogenética clássica, citogenética molecular ou métodos de genética molecular (Elsea & Girirajan, 2008). É possível através de análise citogenética utilizando bandamento G, com 550 bandas ou mais, de resolução, detectar a deleção de tamanho mais frequente de ~4Mb de extensão (70% dos casos). Além disso, a utilização de Hibridação *in situ* com Fluorescência (FISH), utilizando uma sonda específica com alvo para o gene *RAI1*, é eficiente e o método mais utilizado (Elsea & Girirajan, 2008; Vlangos *et al.*, 2005).

Porém, métodos utilizando DNA são mais rápidos, tem maior custo benefício e podem ser utilizados em grande quantidade de pacientes ao mesmo tempo. Além disso, MLPA ou qPCR podem identificar deleções menores e em resolução maior que a FISH ou o bandamento G (Truong *et al.*, 2008).

Tabela 6. Síndromes com diagnóstico diferencial para SMS*.

Síndrome	OMIM	Principais Sinais clínicos	Genes
Síndrome da deleção 9q34	#610253	Deficiência mental, Braquicefalia, Hiplopasia de face média, hipertelorismo, sinofre, prognatismo, hiponia, problemas cardíacos, perda de audição, distúrbio de sono, distúrbio obsessivo compulsivo, movimentos estereotipados	<i>EHMT1</i>
Síndrome de Down	#190685	Deficiência mental, hipotonia, baixa estatura, braquicefalia, fissuras palpebrais inclinadas para cima, alterações cardíacas, braquidactilia, orelhas pequenas, apnéa obstrutiva do sono	<i>DSCR1</i> , <i>DSCR2</i> , <i>DSCR3</i> , <i>DSCR4</i>
Síndrome de Williams	#194050	Deficiência mental, face característica, estenose aortica supra-avalvular, baixa estatura, personalidade sociável.	<i>ELN</i> , <i>LIMK1</i> , <i>CYLN2</i> , <i>GTF2IRD1</i> , <i>GTF2I</i>
Síndrome de Prader-Willi	#176270	Deficiência mental, atraso de fala e motor, braquicefalia, lábios em “v” invertido, hipotonia, baixa estatura, hiperfagia, hipoplasia genital, auto injúria e comportamento obsessivo-compulsivo	<i>SNRPN</i> , <i>Necdin</i>
Síndrome da deleção 22q11.2	#188400	Alterações cardíacas, insuficiência velofaríngea, atraso neuropsicomotor, imunodeficiência, hipocalcemia, perda de audição, anomalias esqueléticas	<i>TBX1</i>
Síndrome de Sotos	#117550	Deficiência mental, hipotonia, atraso neuropsicomotor, dificuldades de alimentação, alta estatura, macrocefalia, frontal proeminente, fissura palpebrais inclinadas para baixo, convulsões, escoliose e deficiências cardíacas e renais	<i>NSD1</i>

* (Elsea & Girirajan, 2008).

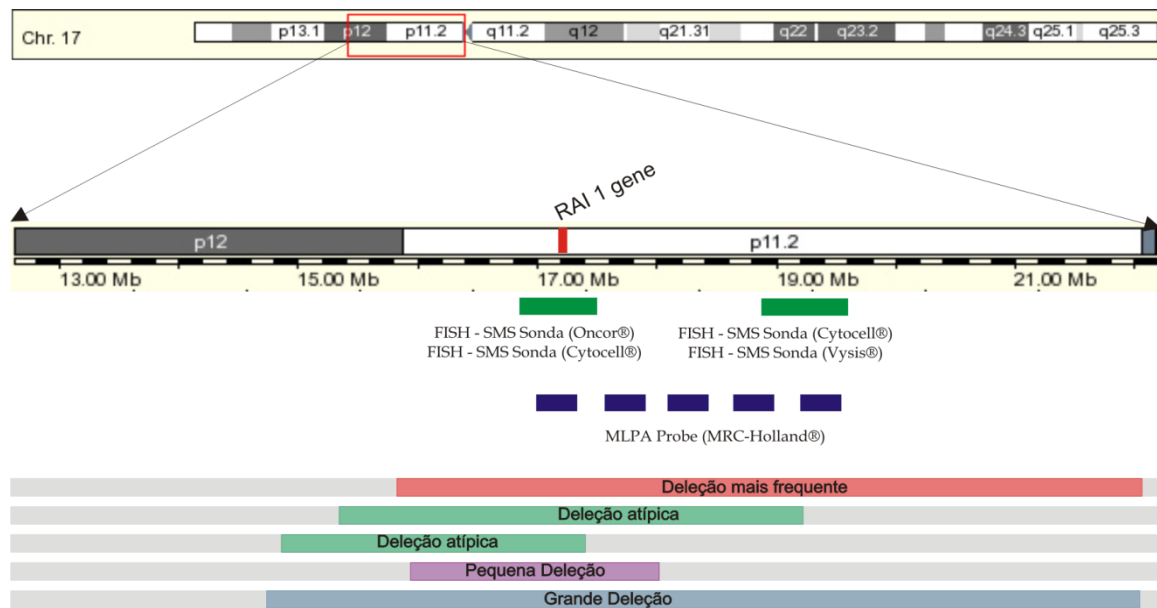


Figura 7. Representação esquemática da região 17p11.2. Localização das sondas utilizadas para a realização dos métodos de FISH e MLPA.

Caso a deleção não seja detectada (~10% dos casos) deve-se realizar o sequenciamento do gene *RAI1*. Todas as mutações descritas estão localizadas no éxon 3 do gene (Stenson *et al.*, 2009a; Stenson *et al.*, 2009b).

Em casos em que a deleção na região 17p11.2 ou mutações no gene *RAI1* não são encontradas, sugere-se a realização de aCGH, com o objetivo de detectar deleções atípicas que podem estar presentes em 20 a 25% dos casos.

A figura 7 representa um fluxograma dos caminhos a ser seguidos para o diagnóstico dos pacientes suspeitos de portarem SMS.

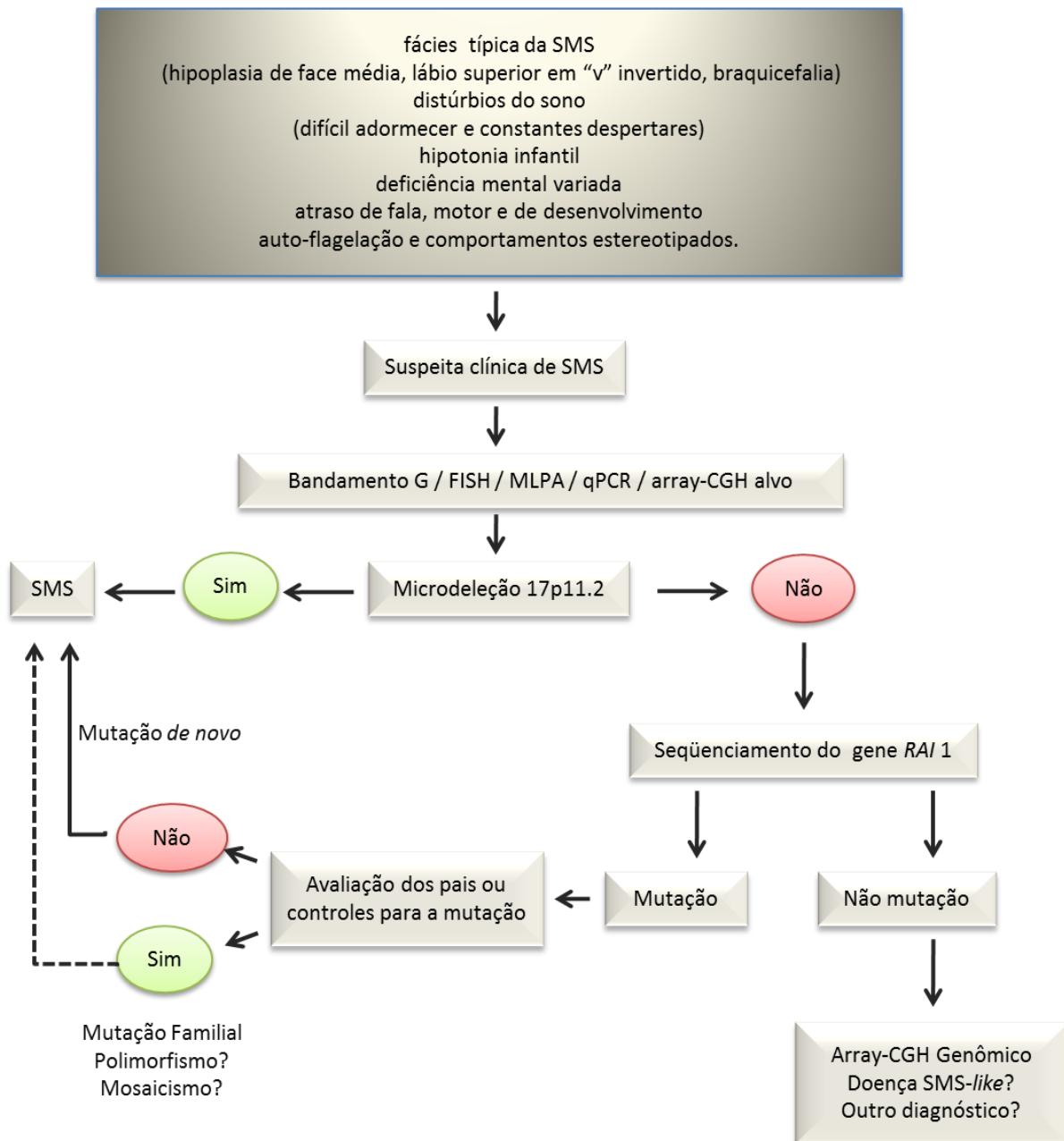


Figura 8. Fluxograma utilizado neste projeto para realização do diagnóstico da SMS (Elsea & Girirajan, 2008).

Objetivos

Apesar da SMS, ter sido descrita há aproximadamente três décadas, e sua etiologia ligada a deleção da região 17p11.2 e à mutações no gene *RAI1*, um grande número de pacientes com características clínicas muito similares, denominados de SMS-*like*, levam a crer que existem outros mecanismos ou regiões genômicas associadas a este fenótipo. Desta forma este estudo teve como objetivos:

Objetivos primários

1. Realizar a caracterização molecular da deleção, na região 17p11.2, de pacientes com SMS, que apresentavam diagnóstico clínico e laboratorial (FISH);
2. Realizar o sequenciamento do gene *RAI1*, em busca de mutações de ponto e/ou pequenas inserções/deleções, nos pacientes que apresentavam suspeita clínica de SMS, porém não apresentavam deleção na região 17p11.2(FISH);
3. Realizar análise molecular, no genoma completo do paciente, através de aCGH, em busca de deleções atípicas; nos casos que não foram verificados deleções na região 17p11.2 e mutações em *RAI1*.
4. Realizar caracterização clínica dos casos do grupo amostral com diagnóstico clínico de SMS;
5. Realizar correlação genótipo/fenótipo entre pacientes com deleções de tamanho clássico, deleções de tamanho atípico, mutações no gene *RAI1* e casos SMS-*like*.

Objetivos secundários

1. Caracterizar as deleções quanto aos mecanismos que as geraram;
2. Identificar dentro do grupo amostral, casos com suspeita diagnóstica de SMS, porém associados com regiões genômicas, que não 17p11.2;

Materiais e Métodos

3.1. Casuística

Para a realização deste estudo foram avaliados 48 pacientes brasileiros com suspeita diagnóstica de síndrome de Smith-Magenis. Os pacientes foram recrutados através de três ações:

- a partir do livro de registro dos atendimentos ambulatoriais do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG-IBB-UNESP), sendo selecionados os casos com diagnóstico clínico de SMS;
- através da divulgação da SMS por palestras e envio de folhetos explicativos para as Associações de Pais e Amigos Excepcionais (APAE) do Estado de São Paulo.
- Divulgação do projeto de pesquisa entre os geneticistas e outros centros para que encaminhassem pacientes com suspeita diagnóstica da SMS ao SAG-IBB-UNESP.

Desta forma, os pacientes com suspeita da SMS foram convocados pelos centros participantes do estudo e convidados a participar da pesquisa. Na concordância do responsável pelo paciente com a pesquisa, foi assinado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo 02). Para a avaliação clínica e triagem dos casos encaminhados foi utilizada a ficha clínica padrão para diagnóstico clínico da SMS do SAG-IBB-UNESP (Anexo 3), fotografados e convidados a comparecer a instituição sede para avaliação clínica e realização do cariótipo por bandamento GTG e FISH. Para os pacientes de outros estados ou quando não havia possibilidade da presença do paciente na instituição sede, foi enviado ao SAG-IBB-UNESP amostra biológica, foto e todos os dados de avaliação clínica disponíveis.

3.2. Aspectos éticos

O projeto da pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (OF. 447/2007-CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP-SP (Anexo 01).

Todos os responsáveis pelos pacientes foram informados dos objetivos do projeto e quando aceitavam participar do mesmo assinavam o TCLE em duas vias. Uma via ficou com os responsáveis e a outra se encontra no prontuário do paciente arquivado no SAG.

Uma vez que as características faciais são componentes essenciais ao diagnóstico clínico, foi solicitada a autorização dos responsáveis, para publicação das fotografias do paciente, sem a colocação de tarja sobre os olhos.

3.3. Grupos amostrais

Desta forma selecionamos 48 pacientes, dos quais 31 foram incluídos no estudo. O motivo para a exclusão de 17 pacientes foi devido à falta de dados para o preenchimento dos critérios de inclusão (item 3.3.1).

Todos os pacientes incluídos foram submetidos a exames citogenéticos por bandamento GTG e por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) para os genes *RAI1* e *FLII*. Foi coletado material para exames genéticos moleculares, sendo que uma amostra biológica dos seus pais também foi coletada, com o objetivo de estudar a herança de uma possível mutação ou excluir a possibilidade de qualquer alteração ser um polimorfismo populacional.

3.3.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo todos os pacientes que apresentavam suspeita clínica de SMS. Entre os sinais clínicos observados e que indicavam um fenótipo sugestivo estavam face típica de SMS (hipoplasia de face média, lábio superior em “v”invertido e braquicefalia), distúrbios de sono (difícil de adormecer e constantes despertares), hipotonia infantil, deficiência mental de grau variável, atrasos de fala, motor e de desenvolvimento, autoflagelação e movimentos estereotipados.

3.3.2. Critérios de exclusão

Critérios de exclusão foram considerados para não incluir no grupo amostral aqueles pacientes com outras causas genéticas, multifatoriais ou ambientais mais evidentes que provocaram a deficiência mental do paciente. Desta forma, foram excluídos do estudo, pacientes que apresentassem:

- outra doença genética suspeitada ou diagnosticada na avaliação genético-clínica.
- malformação grave de sistema nervoso central.
- histórico ou injúria peri-natal ou quadro clínico compatível com paralisia cerebral.
- não ser possível ter informações seguras para preencher os critérios de inclusão.

Para os pacientes que não preencheram os critérios de inclusão ou que tiveram algum dos critérios de exclusão para esta pesquisa, foi oferecida a continuidade no atendimento ambulatorial de rotina do SAG-IBB-UNESP e/ou em outros serviços de genética envolvidos na mesma pesquisa.

3.3.3. Avaliação clínica

Os pacientes selecionados foram avaliados pelo geneticista clínico dos respectivos serviços, e foi preenchida uma ficha padrão do SAG-IBB-UNESP de anamnese genético-clínica, e uma ficha resumo de SMS (Anexo 03). Para documentação de cada caso, todos os pacientes foram fotografados - face (frente e perfil), mãos e pés. Os sinais e sintomas da SMS foram tabulados como presente (+), ausente (-) ou não disponível (nd).

Os dados antropométricos obtidos dos pacientes foram comparados com as tabelas de peso e estatura do “*National Center for Health Statistics*” (2000), considerando-se como limite inferior da normalidade o percentil 5 e superior o percentil 95. Dentre os dados de nascimento foram requeridos: a idade gestacional e a adequação do peso de nascimento para a idade gestacional. Definiu-se como prematuro quando a idade gestacional foi menor que 37 semanas, segundo critério adotado pela Organização Mundial da Saúde. A adequação do peso ao nascimento para a idade gestacional baseou-se na tabela de (Alexander *et al.*, 1996), tendo como limite mínimo da normalidade o percentil 10.

3.4 Análises Laboratoriais

3.4.1 Obtenção de amostra biológica

Para a realização das análises laboratoriais foram coletados 9 ml de sangue periférico em dois tubos: 1º tubo contendo anticoagulante EDTA a 6% (frasco Vacuette® EDTA 3ml) e 2º tubo contendo anticoagulante heparina sódica 25.000 UI (frasco Vacuette® Heparina 6ml) de cada paciente bem como de seus genitores. Os tubos foram mantidos sob refrigeração (4°C) até o início das análises.

3.4.2 Análises Citogenéticas

A análise por citogenética convencional e molecular foi realizada no Laboratório de Citogenética do SAG-IBB-UNESP. O FISH foi utilizado como o primeiro teste laboratorial para confirmação da SMS.

3.4.2.1. Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) para as sondas comerciais seguiu os protocolos padrão que acompanham cada produto. Neste estudo foram utilizadas duas sondas comerciais da CYTOCELL® para a região crítica da SMS.

A sonda CYTOCELL® para o gene *FLII* possui 80Kb e flanqueia a região distal e proximal do gene *FLII* (Campbell *et al.*, 1997), o qual mostra-se deletado na maioria dos pacientes (Chen *et al.*, 1995); já a sonda para o gene *RAII* possui 160Kb e flanqueia a região distal do gene *RAII*, esta sonda encontra-se no marcador D17S258 (figura 6).

3.4.3. Análises moleculares

3.4.3.1 Obtenção do DNA genômico

O DNA foi extraído, de uma alíquota (1ml) do tubo contendo 3ml de sangue com EDTA, com o kit comercial de extração Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega). Este protocolo segue os seguintes passos: lise das hemácias; lise dos leucócitos; precipitação salina das proteínas nucleares e citoplasmáticas seguido da precipitação do DNA genômico com isopropanol a 100%; o DNA foi lavado com etanol a 70% e, depois de secagem a temperatura ambiente, hidratação do *pellet* de DNA em 100µL de tampão TE (Tris-HCl / EDTA) e incubação em banho-maria por 60 minutos a 65°C.

As amostras de DNA foram quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotômetro (*ND-100 Spectrophotometer* da NanoDrop[®]). Neste processo utilizou-se 1,5µL da amostra. Uma alíquota do material foi diluída em água deionizada para uma concentração final de 100ng/µL e volume final de 100ul (solução de trabalho), o restante da solução original foi armazenado em freezer a temperatura de -20°C.

3.4.3.2 Análise de CNVs por microarranjo (aCGH)

Foram realizadas análises de microarranjo de alta densidade de SNPs e sondas para análise de CNVs, avaliando variação do número de cópias no genoma completo dos 32 casos com suspeita de SMS.

O sistema utilizado foi o Affymetrix[®] Genome Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0, que apresenta no total cerca de 1.8 milhões de marcadores molecular, sendo 906.600 Polimorfismos de Nucleotide Único (SNPs) e 946.000 sondas para a detecção de CNVs. O protocolo padrão que acompanha apresenta sete procedimentos até o escaneamento do

chip: digestão do DNA genômico, ligação com os terminadores Nsp e Sty, amplificação dos fragmentos, fragmentação dos produtos de PCR, marcação, hibridização e lavagem.

O DNA genômico total (500 ng – 10ul a 50ng/ul de concentração) foi digerido com enzimas de restrição NSP I e Sty I. Estas enzimas de restrição geram terminações com quatro nucleotídeos livres (*overhang*) permitindo a ligação de adaptadores. Todos os fragmentos resultantes da digestão de enzimas de restrição, independentemente do tamanho, são substratos para a ligação do adaptador. Um iniciador, contendo a sequência de adaptador foi usado para amplificar os fragmentos por PCR e as condições de PCR foram otimizadas para amplificar fragmentos de preferência, na faixa de tamanho de 200 a 1100 pb. Os produtos de PCR foram purificados usando pérolas de poliestireno. O DNA amplificado foi então fragmentado utilizando-se DNAase I. Após a fragmentação são esperados sequência menores que 180 estas sequências então foram marcadas utilizando-se a enzima desoxinucleotideo terminal transferase (TdT). Por fim, as sequências foram hibridizadas na matriz (GeneChip[®]).

O processo que antecedeu o escaneamento dos chips foi a lavagem e coloração. Para isso foi utilizado a GeneChip[®] Fluidics Station 450 (Affymetrix[®]), onde foram utilizados tampões adstringentes e não adstringentes, além de uma solução de anticorpo anti-estreptavidina. Para a coloração é utilizada uma solução de estreptavidina-ficoeritrina. O escaneamento dos Chips foi realizado na estação de trabalho GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix[®]).

As análises de variações de números de cópias foram realizadas utilizando-se o algoritmo estatístico *Birdseed v2*, através do o programa Affymetrix[®] Genotyping Console[™] Version 4.0.

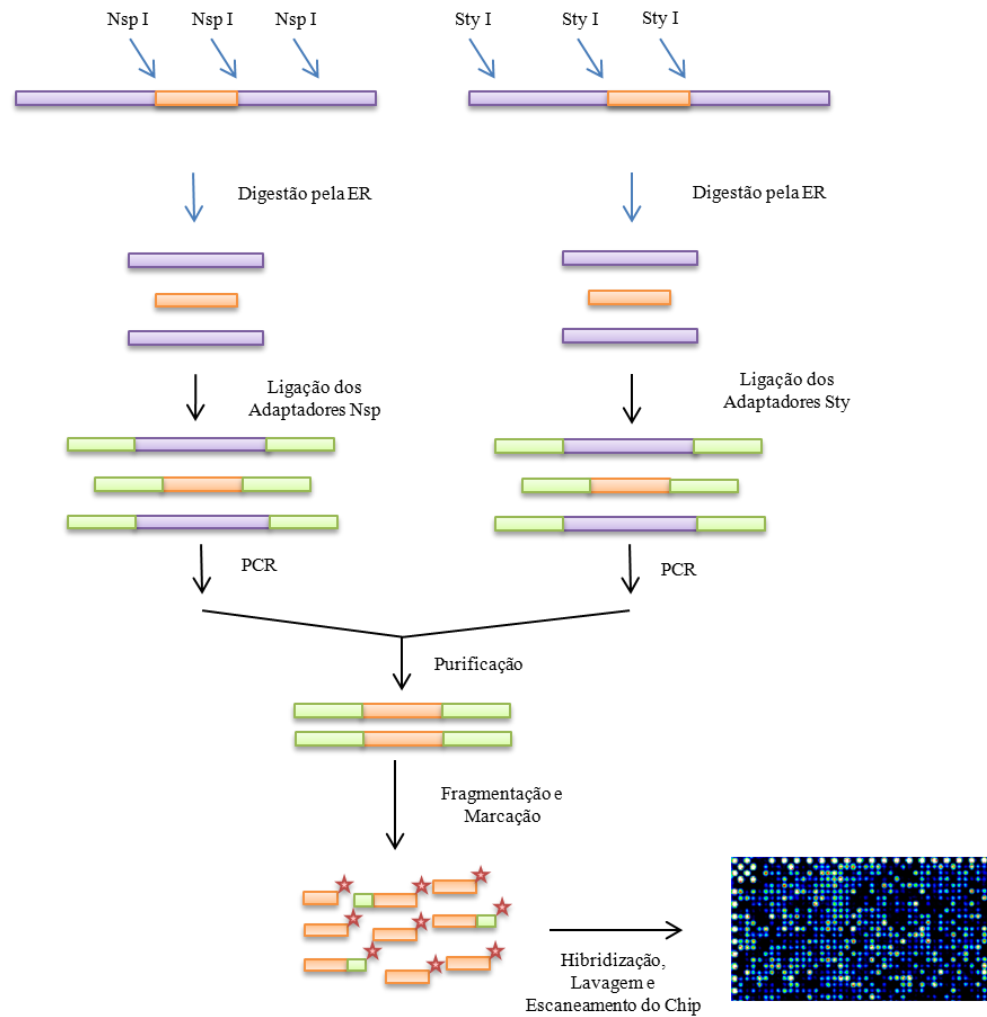


Figura 9 . Metodologia utilizada para a análise de CNVs por microarranjos.

3.4.3.3 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As análises utilizando q-PCR foram realizadas com o objetivo de confirmar CNVs potencialmente patológicas. Para estas análises foram desenvolvidos iniciadores específicos para as regiões dos éxons 2 e 3 do gene *RAI1* e para a região do gene *HES5* na região cromossômica 1p36. Além disso, foi desenvolvido iniciadores para o gene da β -actina, como o objetivo deste gene ser o gene de referência das análises. A sequências dos

iniciadores são demonstrada na (tabela 7). Foi utilizado o programa on-line PrimerQuest (IDT - <<http://www.idtdna.com/>>) para o desenvolvimento dos iniciadores.

Cada reação foi realizada com volume final de 20ul, contendo 10ul de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,4ul de cada iniciador (10uM), 4,2ul de água livre de nucleases e 5ul de DNA genômico (15ng/ul). Todas as reações foram realizadas em triplicata. Foi utilizado o equipamento CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) de acordo com o programa descrito na tabela 8, uma etapa para a realização de uma curva de dissociação foi incluída. Para análise dos resultados e determinação da quantificação relativa (ΔC_t), foi utilizado o programa CFX Manager Software (versão 1.6).

Tabela 7. Iniciadores utilizados na reação de PCR quantitativa

Iniciador *	Sequencia <i>Forward</i>	Sequencia <i>reverse</i>
1	TTCATCTGGCCACCGCGTTCT	CGTCTGGCCGTCTCCCTTT
2	AGCCTGAAATCCGCCTCAAGTACA	AACAGTGCATATGGTGGTGAACGC
3	AGGACTACAGCGAAGGCTACTCGT	CTGGAAGTGGTACAGCAGCTTCTA
4	GCGTGACATTAAGGAGAAG	GAAGGAAGGCTGGAAGAG

- 1 – gene *RAII* exon 2 – produto 91bp; 2 – gene *RAII* exon 3 – produto 125bp; 4 - gene *HSE5* (1p36) – produto 104bp; 4 – gene β -actina – produto 172 pb

Tabela 8. Programa utilizado para a reação de PCR quantitativa.

Etapa do processo de PCR	Temperatura/Tempo	
Desnaturação inicial	95°C / 10min	
Desnaturação	95°C / 15seg	40X
Pareamento	56° C/ 30seg	Leitura da placa ao final de cada ciclo
Extensão	72°C/ 30seg	
	95°C/ 1min	
	55°C/ 1 min	
		Rampa 0.5°C
Curva de dissociação	55-95° / 10 seg	Leitura da placa ao final de cada ciclo

3.4.3.4 Análise dos éxons dos gene *RAII* através do seqüenciamento direto

A análise dos éxons dos gene *RAII* através de seqüenciamento direto foi realizada em 25 casos com suspeita clínica de SMS e que não foi detectada a deleção da região cromossômica 17p11.2 . Esta análise seguiu as seguintes etapas:

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da PCR foram desenvolvidos iniciadores específicos que flanqueiam os éxons de 1 a 6 do gene *RAII*. Para o éxon 3 do gene foi necessário o desenvolvimento de 14 pares de iniciadores, devido ao tamanho do éxon. Desta forma foram utilizados 19 pares iniciadores específicos (Tabela 9). Foi utilizado o programa on-line PrimerQuest (IDT - <<http://www.idtdna.com/>>) para o desenvolvimento dos iniciadores.

Tabela 9. Iniciadores utilizados para a realização das PCRs pré-sequenciamento.

Iniciador	Sequencia Forward	Sequencia Reverse	Produto (pb)
1			502
2	TTGCAAGCGGCTGGCGAGAG	CTGCAGCCCCGGACTCC	302
3a	CCTTCCCTCCCTCCCTCCCTTCC	CACCCCTGCAGGTAGTGGCTG	468
3b	CGCTATGCTGGTGAGGAGAGCC	CCGACTGGTAGGCATGAAGATTC	484
3c	CCATGACAGGCCGCTGACTGC	CAGGGAGCTTGTCCCTTCTGAAG	533
3d	CTGACCACAGCCACTTCATGCC	CACGGACTCGGGCTTGGCCTTCG	500
3e	CAGCTTCCTCTACTGCAACCAG	GCGAAGGCCACGGAAGGGTCTTC	504
3f	GCCCGACTCCTTGCAGCTGGAC	CCGGTCAGCCTTGGCCACCTCGG	508
3g	GGACTTCAAGCAGGAGGAGGTGG	CAGAGAGGCGTCCGAGGTGGTG	493
3h	CACATGAAGCCAGGTGAAGAGG	CTGGAGGCAGCCTTGGGTGAG	482
3i	CGTTCTCTCACGGCCCTGAGTG	GCCACTGGCGTTGCTGCTGCTGC	588
3j	GCGCTCAAAAGGAAGTCGGCC	CCACATTTACCAGGCCTTCTTCC	496
3k	CCCTTTCCGACAAAGACCGTGG	GTGTGGCCTGGCTGTTTCTGTG	508
3l	GGAGGAGCTGGGCCTGGCCTC	CAAGTGCATCGTGGAGGAGAGG	514
3m	CCTGGCCACACTCCCTGGAGG	CTGCCGGAGCCTCCTTGCTGCAC	497
3n	TGTGCAGCTGCCGCCACT	ACTCTGCAGATTGTCCCGAGA	468
4	GCACACACCACCAACCCTCACT	AATGCCTCATTTCATGTCC	508
5	GGAGTGGAGTGGAGTGTGGAGG	GGACTGTGAAGGAGGTGCGAGG	302
6	GTCAATAAAGATAACAACGATTG	GCACATGGTTGGGCTGTGTCAAC	445

Cada reação de PCR foi realizada com volume final de 20µl, contendo 1ul de DNA (100ng/ul), 2ul de desoxinucleotídeos 2,5mM (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 0,5ul de cada iniciador específico (10mM), e 0,5ul *Go Taq Hot Start Polymerase* (Promega). As amplificações *in vitro* foram realizadas de acordo com o programa descrito na tabela 10. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 2,0%, na condição de corrida de 150 volts por 30 minutos, corado com brometo de etídio e analisado sob luz ultravioleta. Além disso, foi utilizado um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb como referência.

Tabela 10. Programa utilizado para a reação de PCR pré-sequenciamento

Etapa da reação	Temperatura/Tempo	
Desnaturação inicial	95°C / 5min	
Desnaturação	95°C/15seg	
Pareamento	60° C/15seg	35X
Extensão	72°C/1min	
Extensão final	72°C/7min	

Para a remoção dos reagentes não utilizados no final da PCR, foi utilizado ExoSAP-IT, que foi adicionado na reação na proporção de 2ul a cada 5ul de reação. A reação foi encubada a 37° por 15 minutos para a degradação dos reagentes pela Exonuclease I, presente no ExoSAP-IT, e posteriormente foi aquecida a 80°C por 15 minutos para a inativação da enzima.

Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada com o volume final de 10ul, contendo 5ul de água ultrapura e livre de nucleases, 1 ul de 5x *BD sequencing buffer*, 1ul de *BigDye® Terminator (v3.1)*, 1ul de iniciador “reverse” e 2 ul de produto de PCR. O programa da reação de sequenciamento esta descrito na tabela 11.

Tabela 11. Programa utilizado para a reação de sequenciamento.

Etapa da reação	Temperatura/Tempo	
Desnaturação inicial	96°C / 7min	
Desnaturação	96°C/10seg	
Pareamento	50° C/5seg	25X
Extensão	60°C/1min e 15 seg	

Para a remoção dos reagentes não utilizados no final da reação de sequenciamento, foi utilizado a *Performa*[®] *DTR V3 96-well short plate* (EdgeBio).

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático *96-capillary 3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems) seguindo protocolo padrão do fabricante. Para a montagem e análise de sequencia foi utilizado o programa SeqMan 5.08 (DNASTar Inc.).

3.4.4. Análise estatística

Para analisar as possíveis correlações entre os dados clínicos e os dados de análise molecular, foi realizado tratamento estatístico dos resultados utilizando teste *t* de Student não pareado e teste exato de Fisher.

Resultados

Com os dados obtidos pelas análises clínicas, citogenéticas e de genética molecular, foram escritos dois artigos científicos e enviados para publicação, descritos a seguir (a formatação dos artigos seguem as instruções de cada revista):

Artigo científico 1

Revista: *European Journal of Human Genetics*

Fator de Impacto:3.564

Formato da publicação: *Article*

Detection of classical 17p11.2 deletions, an atypical deletion and *RAI1* alterations in suspected cases of Smith-Magenis syndrome

Gustavo H Vieira^{1,2}, Jayson D Rodriguez¹, Bruno F Gamba², Daniel R de Carvalho², Andréia D Rezende³, Suely R Santos⁴, Deise H. de Souza², Barbara R DuPont^{1,5}, Danilo Moretti-Ferreira^{*,2} and Anand K Srivastava^{*,1,5}

¹J.C. Self Research Institute of Human Genetics, Greenwood Genetic Center, Greenwood, SC, USA; ²Department of Genetics, University of São Paulo State, Botucatu, SP – Brazil; ³Institute for Integrative Medicine Professor Fernando Figueira – IMIP, Recife, PE, Brazil; ⁴Department of Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio de Janeiro State, Rio de Janeiro, RJ – Brazil; ⁵Department of Genetics & Biochemistry, Clemson University, Clemson, SC, USA

#Correspondence should be addressed to Dr. Anand K. Srivastava, J.C. Self Research Institute of Human Genetics, Greenwood Genetic Center, 113 Gregor Mendel Circle, Greenwood, SC 29646, USA. Tel. 1 864 388 1806; Fax: 1 864 388 1808; E-mail: anand@ggc.org or Dr. Danilo Moretti-Ferreira, Department of Genetics, São Paulo State University, Botucatu, SP – Brazil; E-mail: sag@fmb.unesp.br.

Abstract

Smith-Magenis syndrome (SMS) is a complex disorder whose clinical features include mild to severe intellectual disability with speech delay, growth failure, brachycephaly, flat midface, short broad hands, and behavioral problems. SMS is typically caused by a large deletion on 17p11.2 that encompasses multiple genes including the retinoic acid-induced 1, *RAI1*, gene or a mutation in the *RAI1* gene. Here we have evaluated 30 patients with suspected SMS and identified SMS-associated classical 17p11.2 deletions in six patients, an atypical deletion of approximately 139 kb that partially deletes the *RAI1* gene in one patient, and *RAI1* gene nonsynonymous alterations in two patients. Clinical features of patients with or without 17p11.2 deletions and mutations involving the *RAI1* gene were compared to identify phenotypes that may be useful in diagnosing patients with SMS.

Keywords

Smith-Magenis Syndrome; 17p11.2; *RAI1*; arrayCGH; mutation; Deletion

Introduction

Smith-Magenis syndrome (SMS, MIM 182290) is a multiple congenital anomalies and intellectual disability syndrome associated with an interstitial deletion of chromosome 17p11.2. The incidence of SMS is estimated to be approximately 1:15,000-1:25,000 births.¹ Smith-Magenis syndrome is most commonly characterized by a variable degree of intellectual disability including speech and motor delay, craniofacial and skeletal anomalies, sleep disturbance, self-injurious and attention-seeking behaviors.^{1,2} Facial features include brachycephaly, midface hypoplasia, "tented" upper lip, relative prognathism with age, brachydactyly, short stature, short/broad hands, deep-set and close-spaced eyes.^{3,4} Sleep disturbance is

present in 88% of SMS cases and is characterized by difficulty getting to sleep, frequent nocturnal awakenings, early sleep offset and daytime sleepiness with a need for daytime naps.^{6,7} The behavioral phenotype includes onychotillomania, polyembolokomania, “hand licking and page flipping”, “self-hugging” and hyperactivity.⁵ SMS clinical features overlap with other intellectual disability syndromes such as Prader-Willi, Williams and Down syndromes, which often complicates its clinical diagnosis.

A majority, approximately 90%, of SMS patients have a deletion of chromosome 17p11.2 that includes the *RAI1* gene. The classical SMS deletions span approximately 3.5 Mb of 17p11.2 and are present in approximately 70% of affected individuals. Atypical (smaller or larger) deletions including the 17p11.2 band occur in approximately 20% of other affected individuals.^{8,9} Mutations in the *RAI1* gene have been observed in approximately 10% of all reported SMS cases.⁶

We have analyzed 30 patients of Brazilian origin that were clinically suspected to have SMS. Fluorescence in situ Hybridization (FISH) analyses revealed six patients with a classical 17p11.2 deletion. Using arrayCGH analyses, we mapped the approximate locations of the deletion boundaries in these six patients and identified an atypical small deletion of approximately 139 kb that included exons 1 and 2 of the *RAI1* gene in one additional patient. Mutation screening of the coding region of the *RAI1* gene in the remaining patients identified two patients with novel heterozygous nonsynonymous alterations of unknown significance.

Material and methods

Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

Metaphase chromosome spreads were obtained from lymphoblasts from patients using conventional methods. FISH was performed using commercial probes with the *RAI1* gene (catalog # LPU019, Cytocell, USA) as the target. The probe was 160

kb in size and flanks the distal region of the *RAI1* gene (D17S258). Metaphase analyses were performed using a fluorescence microscope (Leitz DM RBE - LEICA®).

Whole genome array CGH and quantitative PCR

Genomic DNA was purified using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, California, USA). Patient DNA was labeled, hybridized to an Affymetrix® Genome Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 array, and washed according to the manufacturer's protocol. Data quality was assessed using the Birdseed v2 algorithm. Signal intensity and copy number status for each probe set was extracted using Affymetrix® Genotyping Console™ Version 4.0 software. Changes in copy number were confirmed by quantitative PCR (qPCR) using iQ SYBR Green Supermix on a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®) as previously described.¹⁰ Data were analyzed with CFX Manager Software (Bio-Rad®).

Mutation screening

The entire coding region and up to 100bp of flanking intronic sequences of the *RAI1* gene were amplified by standard PCR. Amplified products were treated with ExoSAP-IT® (USB Corporation), bidirectionally sequenced by the Sanger method using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and separated on an ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). Primer sequences and reaction mixes are available upon request. Sequences were analyzed with DNASTAR SeqMan II software (Madison, WI).

Results

Clinical characterization of patients with suspected Smith-Magenis syndrome

We have analyzed a cohort of 30 Brazilian patients with clinical features suspected of SMS. These patients have some of the features typically seen in patients with

SMS. For example, typical facies (brachycephaly, midface hypoplasia, "tented" upper lip), intellectual disability, sleep disturbance, hypotonia, speech delay and characteristic SMS behaviors (self-injury, self-hugging, aggression).

Of thirty patients clinically and molecularly evaluated, six had classical deletions, one had an atypical deletion, and two showed nonsynonymous alterations in the *RAI1* gene. These 9 cases were classified as the SMS group, whose clinical features are described individually in the Supplemental Text. The other 21 cases were classified as an SMS-like group, as previously suggested (Williams et al. 2010), as they showed some clinical features of SMS, but no chromosome 17p11.2 deletion or a *RAI1* mutation.

All cases showed some intellectual disability and behavior disturbance, with self-injurious behavior and hyperactivity most frequently noted. Clinical features are summarized in Table 1. Facial phenotypes of patients with a classical deletion, an atypical deletion, and an *RAI1* point mutation and from the SMS-like group are shown in Figure 1.



Figure 1 Facial features of patients with (A) a classical deletion (SAG6052), (B) an atypical deletion (SAG7567), (C) a nonsynonymous variant, p.R1217Q (SAG4739), and (D) a patient from the SMS-like group, with no known alteration.

Table1. Clinical Features of SMS and SMS-like groups.

	17p11.2 Classical Deletion, n=6 (a)	17p11.2 Small Deletion, n=1 (b)	RAI1 Mutation, n=2 (c)	SMS ¹ (a+b+c)	SMS-like ²
Age average	16.16	28.00	8.30	14.7	13.4
Gender	3M/3F	1M	2M	6M/3F	9M/12F
Craniofacial					
Brachycephaly	4/6	0/1	1/2	5/9	8/21
Midface hypoplasia	5/5	0/1	1/1	5/7	15/21
Broad, square-shaped face	6/6	1/1	1/2	8/9	12/18
Deep-set, close-spaced eyes	5/6	0/1	1/2	6/9	11/21
Everted, "tenting" upper lip	6/6	0/1	2/2	8/9	15/21
Relative prognathism with age	5/5	0/1	2/2	7/8	12/21
Dental anomalies	4/4	0/1	2/2	6/8	7/15
Skeletal					
Short broad hands	5/5	1/1	2/2	8/8	8/19
Brachydactyly	4/4	----	0/1	4/5	1/11
Short stature	5/6	0/1	1/2	6/9	7/18
Scoliosis	2/6	1/1	0/1	3/8	9/21
Neurological					
Cognitive impairment/developmental delay	6/6	1/1	2/2	9/9	20/21
Speech delay	6/6	0/1	2/2	8/9	19/20
Motor delay	4/4	----	2/2	6/6	9/9
Infantile hypotonia	3/5	0/1	2/2	5/8	16/20
Sleep disturbance	4/5	1/1	2/2	7/8	15/18
Oral sensorimotor dysfunction	3/3	0/1	1/1	4/5	8/11
Hyporeflexia	1/5	0/1	0/1	1/7	5/16
Epilepsia	2/6	0/1	1/2	3/9	10/17
Generalized complacency/lethargy (infancy)	4/4	0/1	1/1	5/6	9/14
Behavior					
Self-hug	5/6	0/1	2/2	7/9	13/21
Onychotillomania	3/5	1/1	2/2	6/8	15/20
Polyembolokoilomania	4/5	0/1	2/2	6/8	8/19
Head banging/face slapping	0/1	1/1	2/2	3/4	6/9
Hand biting	3/4	0/1	2/2	5/7	7/10
Attention seeking	4/4	1/1	1/1	6/6	11/13
Aggressive behavior	5/5	1/1	2/2	8/8	17/20
Lick and flip	2/4	1/1	2/2	5/7	8/15
Self-injurious behaviors	6/6	1/1	2/2	9/9	18/20
Hyperactivity	3/3	1/1	2/2	6/6	4/4
Other Features					
Hearing loss	2/5	----	----	2/5	3/10
Myopia	1/1	----	----	1/1	1/5
Strabismus	3/3	----	----	3/3	0/1
Iris abnormalities	3/3	----	----	3/3	0/6
History of constipation	2/4	1/1	0/1	3/6	9/16
Inverted circadian rhythm of melatonin	0/1	1/1	1/1	2/3	6/9
Velopharyngeal insufficiency	1/1	0/1	----	1/2	1/7
Cardiac defects	0/5	0/1	0/1	0/7	6/14
Renal/urinary tract abnormalities	1/2	0/1	----	1/3	2/6
Cleft lip/palate	0/5	----	0/2	0/7	0/16
Hypogonadism (in males)	1/2	----	1/1	2/3	0/7
Obesity	2/4	0/1	0/2	2/7	3/16

¹del17p11.2 or RAI1 mutation, ²no deletion or point mutation

FISH, whole genome arrayCGH and qPCR analyses

FISH analysis using commercial probes with the *RAI1* gene as the target revealed six patients with deletions at chromosome 17p11.2 (data not shown). Whole genome arrayCGH was performed to determine the size and breakpoints of the deletions. The arrayCGH analysis confirmed all six 17p11.2 deletions and determined that the deletions were approximately 3.61 Mb-3.67 Mb in sizes (Figure 2A). Additionally, an atypical deletion of 139 kb was identified in one patient (Figure 2B). This deletion included the 5' end of the *RAI1* gene and apparently resulted in the partial loss of the *RAI1* gene (Figure 2B). The coordinates and sizes of all seven deletions are shown in Table 2. Of the 30 patients studied, 7 (23%) had a deletion that included all or part of the *RAI1* gene.

Table 2. 17p11.2 copy number variation identified in the SMS cohort.

Case n°	Start (bp)	End (bp)	Size (Mb)
SAG6339	16658950	20336467	3.67
SAG7131	16714862	20325512	3.61
SAG7132	16676257	20325512	3.64
SAG7571	16712991	20336467	3.62
SAG5120	16697860	20325512	3.62
SAG6052	16714862	20336467	3.62
SAG7567	17507060	17645576	0.14

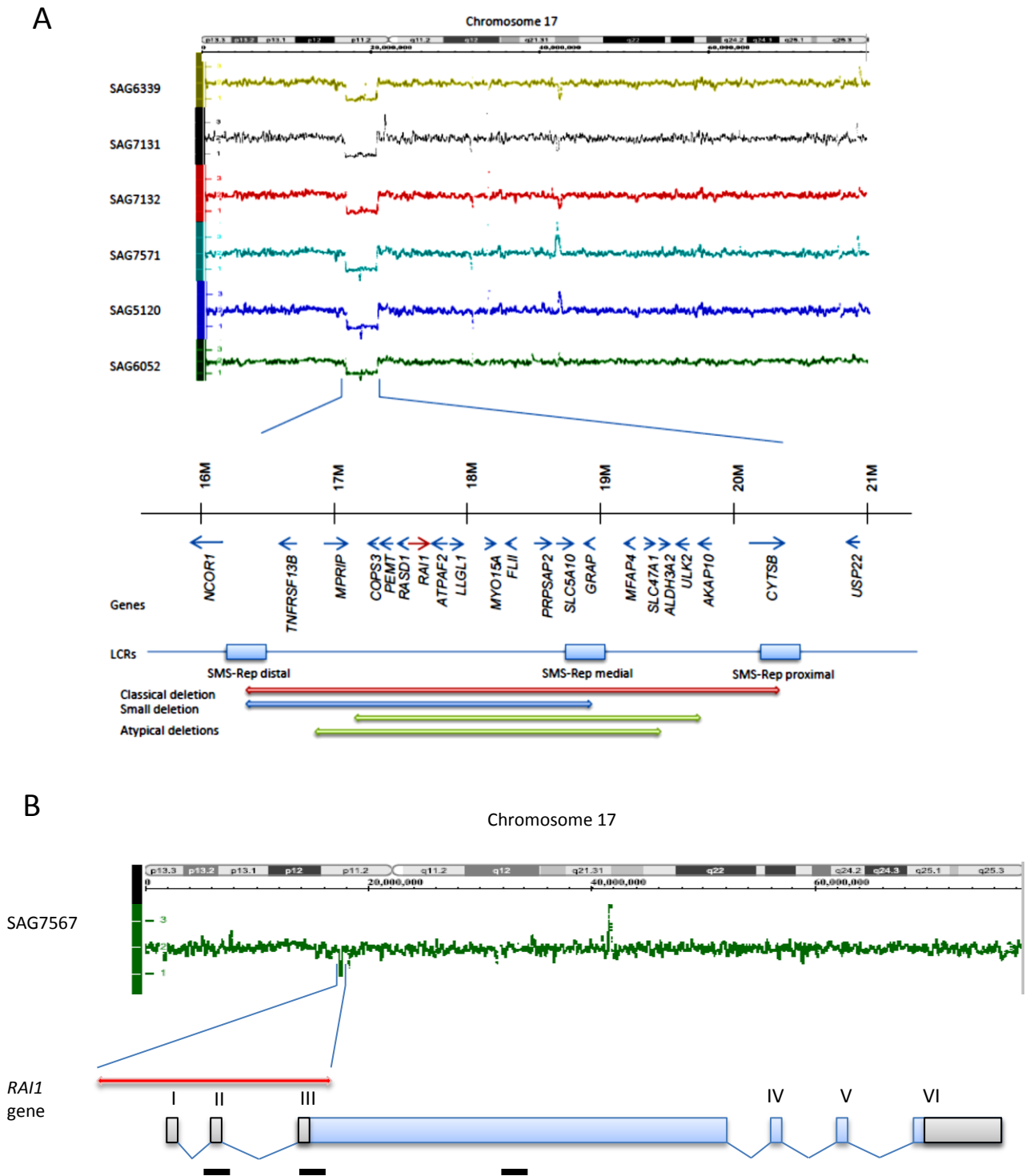


Figure 2 (A) Array CGH profiles of chromosome 17 in 6 patients with the classical deletion of SMS and schematic representation of chromosome 17p11.2. Representative gene content of the 17p11.2 deletion is shown. The *RAI1* gene is indicated by a red arrow. Other deletions involving the 17p11.2 region described by Elsea and Girirajan³ are shown below. **(B)** Array CGH profile of Chromosome 17 in SAG7567 and schematic representation of the *RAI1* gene transcript. Black bars indicate qPCR amplicons used for confirmation of deletions found by arrayCGH.

In order to confirm the results obtained by arrayCGH and to identify any additional smaller deletions, all of the SMS group and the SMS-like group of patients were analyzed by qPCR using an amplicon specific to the *RAI1* gene. Quantitative PCR and arrayCGH results were consistent (Figure 3A) for all six patients with classical SMS deletions. Interestingly, in the case of the atypical microdeletion, the results obtained by arrayCGH suggested the deletion ends at or near exon 3 of the *RAI1* gene. However, using primers for the initial and medial portions of exon 3, qPCR determined that exon 3 was not deleted (data not shown). Furthermore additional qPCR with exon 2 primers confirmed the presence of a *de novo* heterozygous deletion in this patient (Figure 3B).

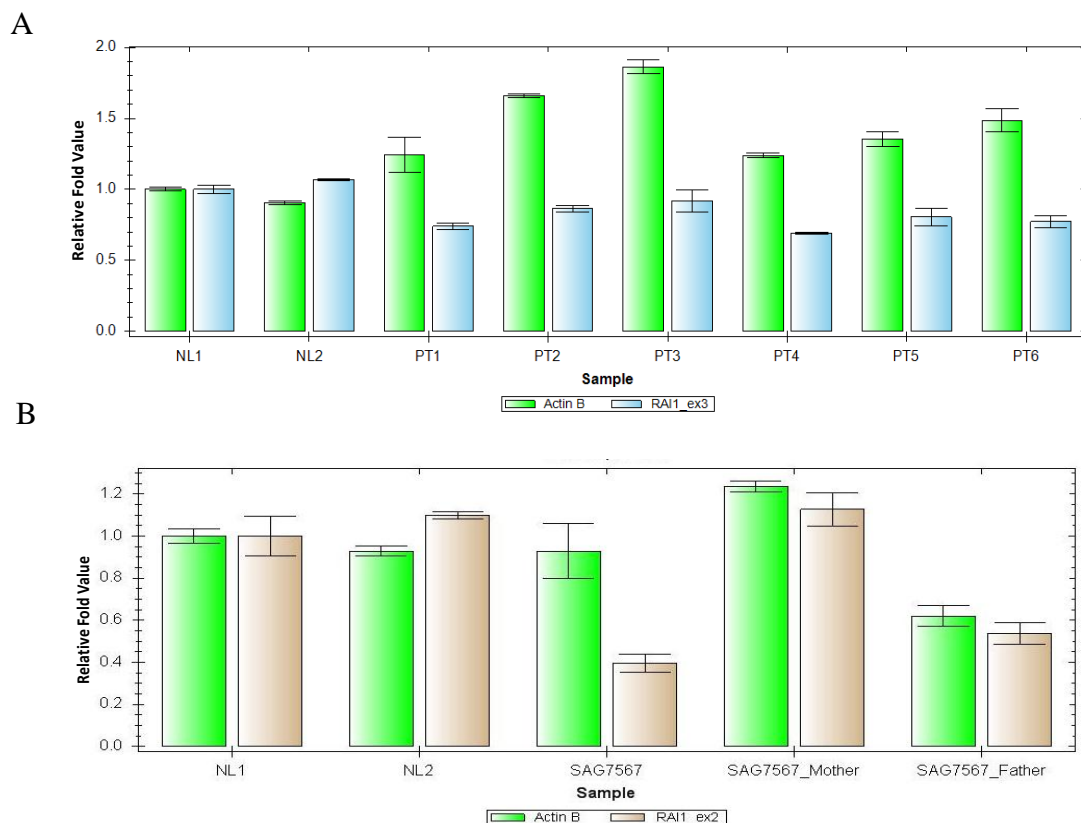


Figure 3 (A) Analysis by qPCR, which confirmed the occurrence of deletion of exon 3 of the *RAI1* gene in six cases of SMS: PT1 (SAG6339) PT2 (SAG7131), PT3 (SAG7132), PT4 (SAG7571), PT5 (SAG5120), PT6 (SAG6052), along with normal controls (NL1 and NL2). (B) Analysis by quantitative real-time PCR, which confirmed the occurrence of deletion of exon 2 of the *RAI1* gene in one case of SMS. The parental samples do not carry the deletion, shown with two normal controls (NL1 and NL2).

***RAI1* gene mutation screening in patients with no 17p11.2 deletion**

Using direct sequencing of the coding region of the *RAI1* gene, we identified two heterozygous nonsynonymous variants in exon 3 of the gene (Figure 4). In patient SAG4736, a c.3651G>A alteration is predicted to causes an amino acid change from a glutamine to an arginine at position 1217 (Figure 4A). In patient SAG6888, a c.4167A>G alteration is predicted to cause an arginine to a glutamine substitution at position 1389 (Figure 4B). We also identified a new SNP (c.1143C>T; p.A3881V) and several previously reported SNPs; allele frequencies of these SNPs in this cohort are shown in Supplemental Table 1.

The two residues involved in the alterations were found to be highly conserved (Figure 4C). Both alterations were absent in 150 control samples including 50 normal Brazilian controls. The pathogenicity of these two alterations remains to be determined and thus these are considered variants of unknown significance. Bioinformatic analyses were performed using PolyPhen, Shift, PMut and Panther. The findings are summarized in Supplemental Table 2.

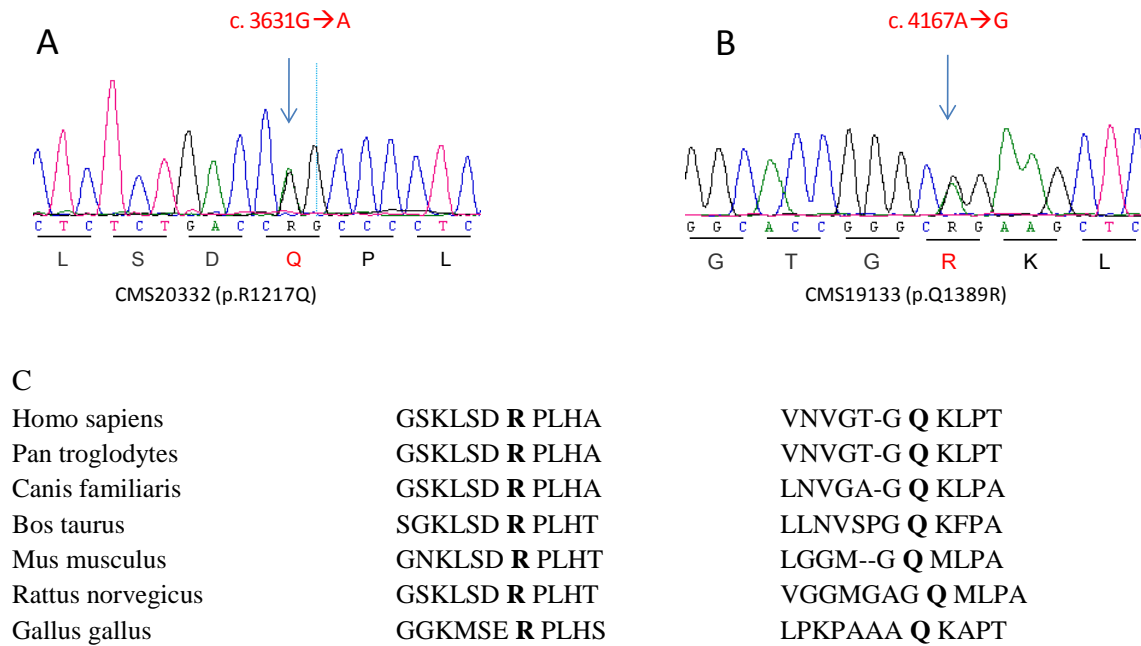


Figure 4 Automated sequence chromatograms showing *RAI1* variants in patients. Triplet codon (underlined) and translated amino acids are shown. The two *RAI1* gene heterozygous variations, (A) a c.3631G>A (p.R1217Q) in patient SAG4739 and (B) a c.4167A>G (p.Q1389R) in patient SAG6888 are shown. (C) Alignment of selected region of Human *RAI1* showing residues (in bold types) altered in patients that are conserved in other mammals.

Discussion

Smith-Magenis syndrome is a contiguous gene deletion syndrome associated with multiple physical anomalies, intellectual disability, sleep disturbance and stereotypical behaviors. This combination of traits is associated with a heterozygous deletion at chromosome 17p11.2. The clinical and molecular analyses were performed to evaluate 30 patients suspected of having SMS. The evaluated cases had a broad range of phenotypes, with some characteristics typical of SMS (Table 1). More than 90% of the cases in this study had intellectual disability, delayed speech-language development, and self-injurious behavior. Our findings showed that 30% (9 / 30) had a deletion in the 17p11.2 region or a point mutation in the *RAI1* gene. Within this group, we found that 66% carried a classic deletion (6/9), 11% had an atypical deletion (1/9) and 22% (2/9) had a missense alteration

in the *RAI1* gene. These data are similar to the proportion previously described by Vlangos et al.⁹

When patients are separated into groups of SMS (9 patients) or SMS-like individuals (21 patients), there were no statistical differences apparent in the distributions of age or gender (data not shown). When craniofacial and skeletal features were analyzed, only the features “small and broad hands” and “brachydactyly” were more frequent in the SMS group. There were no significant statistical differences between groups in the frequency of otorhinolaryngological, neurological and behavioral features. Iris abnormalities were reported in 30% of patients and it was the only feature with a significant statistical difference (between SMS and SMS-like groupings) among those less frequently reported in patients with SMS. In the study by Williams and co workers,¹¹ ocular anomalies and brachydactyly also showed significant statistical differences.

The analysis of the clinical data corroborated the idea that there are very similar phenotypes among patients with a 17p11.2 deletion and those with a mutation in the *RAI1* gene. However, differences described by Williams et al.¹¹ such as stereotypical behavior, seizures, craniofacial anomalies, ear infections, cleft lip and palate, hoarse voice, cardiac defects, digestive problems and short stature were not noted in this study.¹¹

In this study, a case was found with an atypical deletion who did not have the facial appearance or behavior frequently described in SMS. Normally, the primary transcript of the *RAI1* gene is transcribed from exons 3, 4, 5 and part of exon 6. This atypical *de novo* deletion caused a loss of the noncoding exon 2, but not of the coding exons. Interestingly, the deleted region is relatively rich in CpG islands¹² and thus an impact on transcription regulation of the *RAI1* gene is speculated. Unfortunately, analyses to examine the *RAI1* gene transcript were not possible

since cultured cells from the patient were not available. In our knowledge this is the first report of a partial deletion of the *RAI1* gene in SMS group of patients.

In the six cases that showed a classic SMS deletion, the breakpoints were recurrent and coincided with the regions described as proximal SMS-REP and distal SMS-REP.¹³ This fact supports the idea that, in these classic cases, the deletion mechanism may be the erroneous alignment of Low Copy Repeats (LCR), generating a deleterious non-allelic homologous recombination.

Finally, we screened for mutations in exons 3, 4, 5 and the coding portion of exon 6 (primary transcript) of the *RAI1* gene in 24 patients. These were the 23 cases in which no deletions were found in the 17p11.2 region plus the single case which showed a partial deletion of the *RAI1* gene. There are currently 14 reported mutations that have been described in the *RAI1* gene.¹⁴⁻¹⁸ We have identified two additional nonsynonymous variants (R1217Q, Q1389R). The alterations are not located in *RAI1* functional domains, but the substituted amino acids have different physical characteristics. One variant, p.Q1389R, was predicted to be pathological or damaging. However, bioinformatic analyses (Supplemental Table 2) did not suggest unequivocally pathological nature for variant p.R1217Q. Further analyses of both variants in ethnically matched normal controls are warranted.

We conclude that phenotypic similarity exists among cases with deletions in the 17p11.2 region or mutations in the *RAI1* gene (SMS group) and cases with only a few features of the SMS phenotype (SMS-like group). Our findings add information towards the etiology of SMS and may facilitate a better diagnosis of SMS.

Acknowledgments

We are grateful to the patient and the parents for participation in this study. We thank Cindy Skinner, Lynn Dukes-Rimsky, Raewyn Lowe, Julianne Collins and Carlos Eduardo Frigério

Domingues for providing assistance at various stages of this study. We thank Sarah H Elsea for sharing RAI1 gene primer sequences. The study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical School, São Paulo State University/UNESP, Brazil and was supported in part by a grant from NICHD to AKS, funds from SC Department of Disabilities and Special Needs and a fund from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) foundation, Brazil to GHV.

Supplemental Text

SAG6339: The patient is a 12 years 10 months old male with brachycephaly, midface hypoplasia, deep-set and close-spaced eyes, ocular abnormalities (iris), synophrys, everted and "tented" upper lip, relative prognathism, short/broad hands, brachydactyly and short stature. Neurological features included developmental, speech and motor delays and hypotonia. The behavioral phenotype was characterized by aggression, self-injury (hand biting, polyembolokoilamania and onychotillomania), "self-hugging", attention-seeking and hyperactivity.

SAG7131: The patient is a 12 years 10 months male with brachycephaly, midface hypoplasia, broad and square-shaped face, deep-set and close-spaced eyes with iris abnormalities and strabismus, synophrys, everted and "tented" upper lip, dental abnormalities, short/broad hands, short stature and obesity. Neurological features included developmental and speech delay, generalized lethargy, oral sensorimotor dysfunction and sleep disturbance. The behavioral phenotype was characterized by aggression, self-injury, "self-hugging", attention-seeking and hyperactivity. Digestive problems and renal tract abnormalities are also reported in this patient.

SAG7132: The patient is a 13 years 4 months old female with midface hypoplasia, broad and square-shaped-face, eye abnormalities, synophrys, middle ear and laryngeal abnormalities, everted and "tented" upper lip, dental abnormalities, relative prognathism, short/broad hands, brachydactyly and short

stature. The patient's neurological features included developmental, speech and motor delays, generalized lethargy, oral sensorimotor dysfunction, history of constipation and sleep disturbance. The behavioral phenotype was characterized by aggression, self-injury (hand biting, polyembolokoilomania), "self-hugging", and attention-seeking.

SAG7571: The patient is a 10 years 10 months old female with midface hypoplasia, broad and square-shaped face, deep-set and close-spaced eyes, everted and "tented" upper lip, dental abnormalities, relative prognathism, short/broad hands, short stature and scoliosis. Neurological features included developmental and speech delays, generalized lethargy, hearing loss and sleep disturbance. The behavioral phenotype was characterized by self-injury behavior.

SAG5120: The patient is a 20 years 7 months old female with brachycephaly, midface hypoplasia, broad and square-shaped face, deep-set and closed-spaced eyes with iris abnormalities and strabismus, everted and "tented" upper lip, relative prognathism, short/broad hands, brachydactyly, short stature, scoliosis, ear infections, velopharyngeal insufficiency and obesity. Neurological features included developmental, speech and motor delays, generalized lethargy, hyporeflexia, seizures, history of constipation, oral sensorimotor dysfunction and sleep disturbance. The behavioral phenotype was characterized by aggression, self-injury (hand biting, onychotillomania and polyembolokoilomania), "self-hugging", attention-seeking and hyperactivity.

SAG6052: The patient is a 19-year-old male with brachycephaly, midface hypoplasia, relative prognathism, broad and square-shaped face, deep-set and close-spaced eyes with abnormalities (myopia and strabismus), everted and "tented" upper lip, dental abnormalities, ear abnormalities, short/broad hands, brachydactyly, short stature and hypogonadism. Neurological features included developmental, speech and motor delays and generalized lethargy. The behavioral

phenotype was characterized by aggression, self-injury (onychotillomania and polyembolokoilomania) and “self-hugging”.

SAG7567: The patient is a 28-year-old male with broad and square-shaped face, short/broad hands, scoliosis, cognitive impairment, developmental delay, history of constipation, sleep disturbance with an inverted circadian secretion pattern of melatonin and obesity. The behavioral phenotype was characterized by self-injury only.

SAG6888: The patient is a 5-year-old male with brachycephaly, midface hypoplasia, relative prognathism, broad and square-shaped face, deep-set and closed-spaced eyes with abnormalities, everted and “tented” upper lip, dental abnormalities, short/ broad hands, short stature, middle ear and laryngeal anomalies, hoarse voice and hypogonadism. Neurological features included developmental, speech and motor delays, generalized lethargy, and sleep disturbance with inverted circadian secretion pattern of melatonin. The behavioral phenotype was characterized by aggression and self-injury (polyembolokoilomania and onychotillomania).

SAG4739: The patient is an 11-year-old male with everted and “tented” upper lip, relative prognathism, short/broad hands and ear infections. Neurological features included developmental, speech and motor delays, hypotonia, sleep disturbance and seizures. His behavioral phenotype was characterized by aggression, self-injury (onychotillomania and polyembolokoilomania), attention-seeking and hyperactivity.

Supplemental Table 1. Allelic Frequencies of SNPs identified in the coding region of *RAI1*.

Ref SNP	<i>RAI1</i> exon	Alleles (ancestral/variation)	A/A	A/B	B/B
rs61999281	3	G/A	0.896		0.103
rs3803763	3	G/C	0.137	0.655	0.206
rs35068024	3	GC/DEL	0.586		0.413
rs34083643	3	G/del	0.172	0.482	0.344
rs71944489	3	GCA/DEL	0.551		0.448
rs11649804	3	C/A	0.310	0.551	0.137
rs8067439	3	G/A	0.206	0.482	0.275
rs4925112	3	T/C	0.689		0.275
rs32686634	3	C/T	0.758		0.241
rs3818717	4	T/C	0.482	0.413	0.103
c.1143 C>T	3	C/T	0.986		0.013

(A – ancestral / B – variation)

Supplemental Table 2. *In silico* predictions of pathogenicity for mutations described in this study.

Database	c.3651G→A (R1217Q)	c.4167A→G (Q1389R)
Panther	Probably damaging	Probably damaging
PolyPhen	Predicted to be benign	Probably damaging
Pmut	Pathological	Pathological
SIFT	Affect Protein Function	Affect Protein Function

References

- Greenberg F, Guzzetta V, Montes de Oca-Luna R *et al*: Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet* 1991; **49**:1207-1218.
- Smith ACM, Magenis RE, Elsea SH: Overview of Smith-Magenis Syndrome. *J Assoc Genet Technol* 2005; 31: 163-167.
- Elsea SH, Girirajan S: Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**:412-421.
- Smith ACM, Boyd K, Elsea SH *et al*: Smith-Magenis Syndrome. In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2010.

5. Dykens EM, Finucane BM, Gayley C: Brief report: cognitive and behavioral profiles in persons with Smith-Magenis syndrome. *J Autism Dev Disord* 1997; **27**: 203-11.
6. De Leersnyder H, de Blois MC, Vekemans M *et al*: beta(1)-adrenergic antagonists improve sleep and behavioural disturbances in a circadian disorder, Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet* 2001; **38**: 586-590.
7. Smith AC, Dykens E, Greenberg F. Sleep disturbance in Smith-Magenis syndrome (del 17 p11.2). *Am J Med Genet* 1998; **81**:186-191.
8. Potocki L, Shaw CJ, Stankiewicz P *et al*: Variability in clinical phenotype despite common chromosomal deletion in Smith-Magenis syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *Genet Med* 2003; **5**: 430-434.
9. Vlangos CN, Yim DK, Elsea SH: Refinement of the Smith-Magenis syndrome critical region to approximately 950kb and assessment of 17p11.2 deletions. Are all deletions created equally? *Mol Genet Metab* 2003; **79**: 134-141.
10. Griggs BL, Ladd S, Decker A *et al*: Identification of ectodysplasin-A receptor gene deletion at 2q12.2 and a potential autosomal MR locus. *Eur J Hum Genet* 2009;**17**: 30-36.
11. Williams SR, Girirajan S, Tegay D *et al*: Array comparative genomic hybridisation of 52 subjects with a Smith-Magenis-like phenotype: identification of dosage sensitive loci also associated with schizophrenia, autism, and developmental delay. *J Med Genet* 2010; **47**: 223-229.
12. Toulouse A, Rochefort D, Roussel J *et al*: Molecular cloning and characterization of human RAI1, a gene associated with schizophrenia. *Genomics* 2003; **82**: 162-171.
13. Ji Y, Eichler EE, Schwartz S *et al*: Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 2000; **10**: 597-610.
14. Slager RE, Newton TL, Vlangos CN *et al*: Mutations in *RAI1* associated with Smith-Magenis syndrome. *Nat Genet* 2003; **33**: 466-468.
15. Bi W, Saifi GM, Shaw CJ *et al*: Mutations of RAI1, a PHD-containing protein, in nondeletion patients with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet* 2004; **115**: 515-524.
16. Bi W, Saifi GM, Girirajan S *et al*: *RAI1* point mutations, CAG repeat variation, and SNP analysis in non-deletion Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A* 2006; **140**: 2454-2463.

17. Girirajan S, Elsas LJ, Devriendt K *et al*: *RAI1* variations in Smith-Magenis syndrome patients without 17p11.2 deletions. *J Med Genet* 2005; **42**: 820-828.

18. Girirajan S, Vlangos CN, Szomju BB *et al*: Genotype-phenotype correlation in Smith-Magenis syndrome: evidence that multiple genes in 17p11.2 contribute to the clinical spectrum. *Genet Med* 2006; **8**: 417-427.

Artigo científico 2

Jornal sugerido: *American Journal of Medical Genetics – Part A*

Fator de impacto: 2.404

Formato da publicação: *Research Letter*

Differential Diagnosis of Smith-Magenis syndrome: 1p36 deletion syndrome

Gustavo H. Vieira,^{1,2} Jayson D. Rodriguez,¹ Raquel Boy,³ Isaias Soares de Paiva³
Barbara R. DuPont,^{1,4} Danilo Moretti-Ferreira,^{2,*} Anand K. Srivastava^{1,4,*}

¹J. C. Self Research Institute of Human Genetics, Greenwood Genetic Center, Greenwood, South Carolina, USA

²Department of Genetics, University of São Paulo State, Botucatu, SP – Brazil

³Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Department of Genetics & Biochemistry, Clemson University, Clemson, SC, USA

Keywords: Smith-Magenis Syndrome; 1p36; *RAI1*; Deletion; ArrayCGH

*Correspondence to: Dr. Anand K. Srivastava, J.C. Self Research Institute of Human Genetics, Greenwood Genetic Center, 113 Gregor Mendel Circle, Greenwood, SC 29646, USA. E-mail: anand@ggc.org or Dr. Danilo Moretti-Ferreira, Department of Genetics, University of São Paulo State, Botucatu, SP – Brazil; E-mail: sag@fmb.unesp.br.

TO THE EDITOR:

Smith–Magenis syndrome (SMS; MIM 182290) is a complex disorder with an estimated incidence of approximately 1:15,000–25,000 births (Greenberg et al. 1991). The syndrome is typically caused by a large deletion on 17p11.2 that encompasses multiple genes including the retinoic acid-induced 1, *RAI1*, gene or a mutation in the *RAI1* gene (Vlangos et al. 2003; Slager et al. 2003). The phenotype associated with SMS is characterized by a specific combination of clinical features including variable intellectual disability, sleep disturbance, craniofacial and skeletal anomalies, self-injurious and attention-seeking behaviors, and speech and motor delay (Elsea and Girirajan 2008; Smith et al. 2005; Smith et al. 2010). SMS is often under-diagnosed as its clinical features overlap with other intellectual disability syndromes such as Prader-Willi, Williams, Down syndromes and 1p36 deletion syndrome.

The 1p36 deletion syndrome was described in 1997 by Shapira et al. It has an estimated frequency of 1 in 5,000-10,000 births and is caused by monosomy at chromosome 1p36 (Shapira et al. 1997; Shaffer and Lupski 2000). The phenotype associated with this contiguous gene deletion syndrome is characterized by intellectual disability, hypotonia, distinctive facies (deep set eyes, prominent chin, flat nasal bridge and asymmetric ears), and growth retardation. The size of the deletion and the location of breakpoints vary in each family and seem to be correlated with the phenotype (Heilstedt et al. 2003; Yu et al. 2003; Tsuyusaki et al. 2010).

Recently, monosomy of 1p36.32-p36.33 was detected in a patient with Smith-Magenis-like phenotype without a deletion or mutation of the *RAI1* gene (Williams et al. 2010). The patient with the 1p36 deletion reportedly had sleep difficulties, learning and behavioral problems as well as short stature, obesity, prognathism, dental abnormalities, brachydactyly, scoliosis, eye abnormalities, chronic ear and

respiratory infections, and self-injurious behavior. SMS and 1p36 deletion syndrome show an overlap of some clinical features, such as midface hypoplasia, deep-set eyes, intellectual disability, speech delay, infantile, hypotonia and behavior problems. There is no literature correlation between sleep disorders commonly noted in SMS cases and the 1p36 deletion. A comparison between SMS features and 1p36 deletion syndrome features is shown (Table 1).

We present a female case (SAG7559) (Figure 1) with a 1p36 deletion whose clinical features are consistent with SMS, but lacked 17p11.2 deletion or a mutation in the *RAI1* gene (data not shown). This study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu Medical School, São Paulo State University/UNESP, Brazil.

The patient is a 15-year-old female, born at term after an uncomplicated pregnancy to healthy, no consanguineous parents. Her birth weight was 3,180 g (50th percentile) and birth length was 50 cm (50th percentile). Her head circumference was not recorded. The patient had dysmorphic craniofacial features, developmental delay, speech delay, infantile hypotonia, sleep disturbance, seizures, dental anomalies and behavior problems. The diagnosis of SMS in this patient was initially considered because the patient has a broad, square-shaped face, relative prognathism, microbrachycephaly, hypoplasia of the midface, deep-set and closely-spaced eyes, everted and "tented" upper lip and dental anomalies (Figure 1). The patient also has short, broad hands, recurrent ear infections, and sleep disturbances - clinical features that are usually associated with SMS. Other behavior problems have been described in cases with a 1p36 deletion, but onychotillomania and "biting the hands" - seen in this patient - are behavioral phenotypes associated with patients with SMS.

Table 1. Clinical features of patient SAG7559 showing an overlap between SMS and 1p36 phenotypes.

	Craniofacial/Skeletal	Subject of this study
SMS	Everted, "tented" upper lip	+
SMS	Broad, square-shaped face	+
SMS	Dental anomalies	+
SMS	Synophrys	+
SMS/1p36	Relative prognathism with age	+
SMS/1p36	Cleft lip/palate	-
SMS/1p36	Midface hypoplasia	+
SMS/1p36	Deep-set, closely-spaced eyes	+
SMS/1p36	Ocular/vision abnormalities	-
SMS/1p36	Microbrachycephaly	+
1p36	Large, late-closing anterior fontanel (<i>N</i> =39)	n/a
1p36	Straight eyebrows	+
1p36	Epicanthus	+
1p36	Broad nasal root/bridge	+
1p36	Posterior rotated/low-set/abnormal ears	+
1p36	Long philtrum	n/a
1p36	Pointed chin	+
Otoryngological		
SMS	Ear infections	+
SMS	Hoarse, deep voice	-
SMS	Middle ear and laryngeal anomalies	-
SMS/1p36	Ear Abnormalities	n/a
SMS	Hyperacusis	n/a
Skeletal		
SMS	Forearm abnormalities	-
SMS	Scoliosis	-
SMS/1p36	Short, broad hands	+
SMS/1p36	Short stature	-
1p36	Brachydactyly/camptodactyly	+
1p36	Short feet	+
1p36	Skeletal anomalies	n/a
Visceral		
SMS/1p36	Renal/urinary tract abnormalities	n/a
SMS/1p36	Cardiac defects	-
1p36	Noncompaction cardiomyopathy	n/a
1p36	Dilated cardiomyopathy	n/a
1p36	Gastrointestinal anomalies	-
1p36	Anal anomalies	-
Neurological		
SMS	Motor Delay	+
SMS	Sleep disturbance	+
SMS	Inverted circadian rhythm of melatonin	n/a
SMS	Oral sensorimotor dysfunction	n/a
SMS	Signs of peripheral neuropathy	n/a
SMS	History of constipation	-
SMS	Hyporeflexia	n/a
SMS/1p36	Generalized complacency/lethargy (infancy)	+
SMS/1p36	Brain abnormalities (US/CT/MRI)	-
SMS/1p36	EEG abnormal/ evident seizures	+
SMS/1p36	Seizures	+
SMS/1p36	Infantile hypotonia	+
SMS/1p36	Speech delay	+
SMS/1p36	Cognitive impairment/developmental delay	+
SMS/1p36	Visual inattention	-
1p36	Sensorineural deafness	-
Behavioral		
SMS	Self-Hug	-
SMS	Onychotillomania	+
SMS	Polyembolokoilomania	-
SMS	Attention seeking	n/a
SMS	Lick and flip	n/a
SMS	Hyperactivity	-
SMS/1p36	Head banging/Face slapping	n/a
SMS/1p36	Hand biting	+
SMS/1p36	Aggressive behavior	+
SMS/1p36	Self-injurious behaviors	-
1p36	Behavior disorders	+
SMS/1p36	Obesity	-
SMS	Hypercholesterolemia/hypertriglyceridemia	-

(+)positive (-) negative (n/a) not available

* Modified from Shapira et al. 1997; Slavotinek et al. 1999; Heilstedt et al. 2003; Battaglia et al. 2008; Smith et al. 2010.



Figure 1 Patient SAG7559. (A) Frontal and (B) lateral views of the face showing microbrachycephaly, midface hypoplasia, deep-set and closely-spaced eyes. (C) Short feet with brachydactyly. (D) Short, broad hands with camptodactyly.

We analyzed the patient DNA using whole genome arrayCGH. Patient DNA was labeled, hybridized to an Affymetrix® Genome Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 array, and washed according to the manufacturer's protocol. Signal intensity and copy number status for each probe set was extracted using Affymetrix® Genotyping Console™ Version 4.0 software. The arrayCGH analysis revealed a deletion at chromosome 1p36.32 - 1p36.33 and determined that the deletion was approximately 2.15 Mb (deletion starts at ~1794162 bp and ends at ~3948585 bp) in size (Figure 2).

The 1p36 deletion described by Williams et al. (2010) was of 0.86 Mb and included within the deletion reported here (Figure 2). Clinically, both cases have prognathism, dental anomalies, brachycephaly, recurrent ear infections, sleep

disorders and self-injurious behavior in common. Ocular abnormalities, scoliosis, and obesity are reported by Williams et al. (2010), but were not noted in our patient.

Over 30 genes are located within the deletion region described in this study (Figure 2). *HES5* may be involved in the formation and maintenance of the neural network (Ohtsuka et al. 1999). *PLCH2* has been linked to neural differentiation in mammals (D'Angelo et al. 2009). *GABRD* is considered a candidate gene responsible for seizures in the 1p36 deletion syndrome (Windpassinger et al. 2002). Our patient has seizures and has a deletion of the *GABRD* gene. In contrast, the patient with the overlapping 0.86 Mb deletion (Figure 2) has no reported seizures and is not deleted for the *GABRD* gene, thus supporting a potential role for *GABRD* in the seizure phenotype of the 1p36 deletion syndrome.

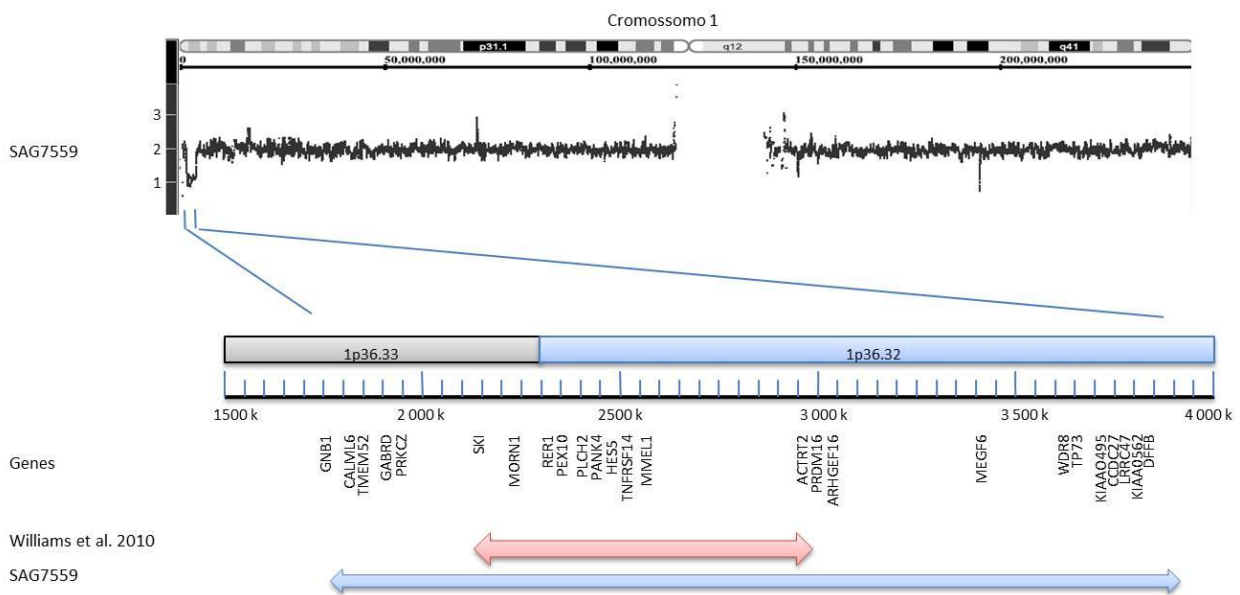


Figure 2 Array CGH profile of chromosome 1 in SAG7559: A schematic representation of chromosome 1p36 showing the deletion described by Williams et al. (2010) and the deletion described in this study. Representative gene content of 1p36.33-1p.32 is shown.

The degree of clinical variability among cases of 1p36 deletion syndrome demonstrates the difficulty of reaching a diagnosis, especially since patients with very similar phenotypes have variation in the size of the deletions (Rosenfeld et al. 2010). Our study presents a case with overlapping clinical symptoms of SMS and the 1p36 deletion syndrome. With the advent of array CGH technology, the stepwise workup of first 17p11.2 deletion testing, RAI1 gene mutation testing, then 1p36 deletion testing probably does not occur, in lieu of just doing the array CGH test, which would also detect the 1p36 deletion, as well as other cytogenetic anomalies. Therefore, a recommendation more consistent with current technology would be that patients with a clinical suspicion of SMS should have array CGH testing in order to identify the 17p11.2 deletion of SMS or chromosomal defects consistent with other overlapping intellectual disability syndromes, such as 1p36 deletion syndrome. Patients with normal array CGH results could then undergo RAI1 gene mutation analysis. Furthermore, older patients with a clinical suspicion of SMS who previously tested negative for this condition should now have an array CGH test which would detect the 1p36 deletion as well as other potentially overlapping intellectual disability syndromes.

REFERENCES

- D'Angelo CS, Gajecka M, Kim CA, Gentles AJ, Glotzbach CD, Shaffer LG, Koiffmann CP. 2009. Further delineation of nonhomologous-based recombination and evidence for subtelomeric segmental duplications in 1p36 rearrangements. *Hum Genet* 125: 551-563.
- Elsea SH, Giririrajan S. 2008. Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet* 16: 412-421.

- Greenberg F, Guzzetta V, Montes de Oca-Luna R, Magenis RE, Smith AC, Richter SF, Kondo I, Dobyns WB, Patel PI, Lupski JR. 1991. 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.
- Heilstedt HA, Ballif BC, Howard LA, Lewis RA, Stal S, Kashork CD, Bacino CA, Shapira SK, Shaffer LG. 2003. Physical map of 1p36, placement of breakpoints in monosomy 1p36, and clinical characterization of the syndrome. *Am J Hum Genet* 72: 1200-1212.
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. 1999. *Hes1* and *Hes5* as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18: 2196-2207.
- Rosenfeld JA, Crolla JA, Tomkins S, Bader P, Morrow B, Gorski J, Troxell R, Forster-Gibson C, Cilliers D, Hislop RG, Lamb A, Torchia B, Ballif BC, Shaffer LG. 2010. Refinement of causative genes in monosomy 1p36 through clinical and molecular cytogenetic characterization of small interstitial deletions. *Am J Med Genet A* 152A: 1951-1959.
- Shaffer LG, Lupski JR. 2000. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 34: 297-329.
- Shapira SK, McCaskill C, Northrup H, Spikes AS, Elder FF, Sutton VR, Korenberg JR, Greenberg F, Shaffer LG. 1997. Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet* 61: 642-650.
- Slager RE, Newton TL, Vlangos CN, Finucane B, Elsea SH. 2003. Mutations in *RAI1* associated with Smith-Magenis syndrome. *Nat Genet* 33: 466-468.
- Slavotinek A, Shaffer LG, Shapira SK. 1999. Monosomy 1p36. *J Med Genet* 36(9):657-63.

- Smith ACM, Magenis RE, Elsea SH. 2005. Overview of Smith-Magenis Syndrome. *J Assoc Genet Technol* 31: 163-167.
- Smith ACM, Boyd K, Elsea SH, Finucane BM, Haas-Givler B, Gropman A, Johnson KP, Lupski JR, Magenis E, Potocki L, Solomon B. 2010. Smith-Magenis Syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2001 [updated 2010 Jan 07].
- Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. 2010. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int* (Epub ahead of print).
- Vlangos CN, Yim DK, Elsea SH. 2003. Refinement of the Smith-Magenis syndrome critical region to approximately 950kb and assessment of 17p11.2 deletions. Are all deletions created equally? *Mol Genet Metab* 79: 134-141.
- Williams SR, Girirajan S, Tegay D, Nowak N, Hatchwell E, Elsea SH. 2010. Array comparative genomic hybridisation of 52 subjects with a Smith-Magenis-like phenotype: identification of dosage sensitive loci also associated with schizophrenia, autism, and developmental delay. *J Med Genet* 47: 223-229.
- Windpassinger C, Kroisel PM, Wagner K, Petek E. 2002. The human gamma-aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: Molecular characterization and tissue-specific expression. *Gene* 292:25-231.
- Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG. 2003. Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 well-characterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet* 12: 2145-2152.

Conclusão

Desde de sua caracterização em 1982 a síndrome de Smith-Magenis havia sido descrita somente em dois casos na literatura brasileira (Cabral de Almeida et al., 1989; Llerena Jr. e Cabral de Almeida, 1998). A partir de uma busca ativa por pacientes, o presente trabalho vem demonstrar que esta síndrome não é tão rara no nosso meio, e provavelmente é pouco diagnosticada devido a uma falta de maior divulgação de suas características clínicas entre profissionais de saúde.

Neste estudo buscamos caracterizar os pacientes e a etiologia da SMS para melhor entendermos os mecanismos que levam ao fenótipo da síndrome de SMS, Para isso, foi realizada uma análise de alta resolução do genoma completo do grupo amostral.

Desta forma concluímos:

1. Foi possível caracterizar molecularmente a deleção da região 17p11.2 de 7 pacientes com SMS, que apresentavam diagnóstico clínico e laboratorial (FISH).
2. Foi possível realizar a caracterização clínica de 30 pacientes do nosso grupo amostral e compara-los com os dados da literatura. Nesta comparação das características clínicas não houve diferença significativa entre os pacientes com mutação clássica da região 17p11.2 e mutação de ponto no gene *RAI1*; Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes SMS e SMS-like; Apesar de avaliarmos somente um caso com deleção atípica, este caso mostrou um fenótipo com um menos número de sinais clínicos que o restante dos casos analisados. Além disso, este achado desmostrou que é possível termos pacientes com deleções atípicas e não diagnosticados pela técnica de FISH com as sondas comerciais disponíveis;

3. No grupo amostral com hipótese diagnóstica de SMS, 30% (9/30) apresentaram alteração na região 17p11.2;
4. Seis pacientes apresentaram a deleção clássica da SMS e foi possível através da determinação dos pontos de quebra, inferir os mecanismos genômicos que as geraram;
5. Duas novas mutações no gene *RAI1* com troca de nucleotídeos foram descritas;
6. Um caso com fenótipo de SMS e deleção na região 1p36 foi descrito, sugerindo diagnóstico diferencial entre estas duas síndromes;

*Referências
Bibliográficas*

2002. The NCBI handbook. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2002 Oct. Chapter 17, The Reference Sequence (RefSeq) Project.
- Alexander GR, Himes JH, Kaufman RB, Mor J, Kogan M. 1996. A United States national reference for fetal growth. *Obstet Gynecol* 87(2):163-8.
- Allanson JE, Greenberg F, Smith AC. 1999. The face of Smith-Magenis syndrome: a subjective and objective study. *J Med Genet* 36(5):394-7.
- Al-Qudah AA, El-Khateeb MS, Abu-Hamour W, Bulos NK. 1994. Smith-Magenis syndrome; Report of two cases and review of the literature. *Ann Saudi Med* 14(5):417-9.
- Andrieux J, Villenet C, Quief S, Lignon S, Geffroy S, Roumier C, de Leersnyder H, de Blois MC, Manouvrier S, Delobel B and others. 2007. Genotype phenotype correlation of 30 patients with Smith-Magenis syndrome (SMS) using comparative genome hybridisation array: cleft palate in SMS is associated with larger deletions. *J Med Genet* 44(8):537-40.
- Baba M, Hong SB, Sharma N, Warren MB, Nickerson ML, Iwamatsu A, Esposito D, Gillette WK, Hopkins RF, 3rd, Hartley JL and others. 2006. Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42):15552-7.
- Babcock M, Yatsenko S, Hopkins J, Brenton M, Cao Q, de Jong P, Stankiewicz P, Lupski JR, Sikela JM, Morrow BE. 2007. Hominoid lineage specific amplification of low-copy repeats on 22q11.2 (LCR22s) associated with velo-cardio-facial/digeorge syndrome. *Hum Mol Genet* 16(21):2560-71.
- Babovic-Vuksanovic D, Jalal SM, Garrity JA, Robertson DM, Lindor NM. 1998. Visual impairment due to macular disciform scars in a 20-year-old man with Smith-Magenis syndrome: another ophthalmologic complication. *Am J Med Genet* 80(4):373-6.
- Barnicoat AJ, Moller HU, Palmer RW, Russell-Eggitt I, Winter RM. 1996. An unusual presentation of Smith-Magenis syndrome with iris dysgenesis. *Clin Dysmorphol* 5(2):153-8.
- Behjati F, Mullarkey M, Bergbaum A, Berry AC, Docherty Z. 1997. Chromosome deletion 17p11.2 (Smith-Magenis syndrome) in seven new patients, four of whom had been

- referred for fragile-X investigation. *Clin Genet* 51(1):71-4.
- Bergmann C, Morlot S, Ptok M. 2007. [Speech impairment and the Smith-Magenis syndrome]. *HNO* 55(8):644-6.
- Bersani G, Russo D, Limpido L, Marconi D. 2007. Mood disorder in a patient with Smith-Magenis syndrome: a case report. *Neuro Endocrinol Lett* 28(1):7-10.
- Bi W, Ohyama T, Nakamura H, Yan J, Visvanathan J, Justice MJ, Lupski JR. 2005. Inactivation of *Rai1* in mice recapitulates phenotypes observed in chromosome engineered mouse models for Smith-Magenis syndrome. *Hum Mol Genet* 14(8):983-95.
- Bi W, Saifi GM, Girirajan S, Shi X, Szomju B, Firth H, Magenis RE, Potocki L, Elsea SH, Lupski JR. 2006. *RAI1* point mutations, CAG repeat variation, and SNP analysis in non-deletion Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A* 140(22):2454-63.
- Bi W, Saifi GM, Shaw CJ, Walz K, Fonseca P, Wilson M, Potocki L, Lupski JR. 2004. Mutations of *RAI1*, a PHD-containing protein, in nondeletion patients with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet* 115(6):515-24.
- Bi W, Yan J, Stankiewicz P, Park SS, Walz K, Boerkoel CF, Potocki L, Shaffer LG, Devriendt K, Nowaczyk MJ and others. 2002. Genes in a refined Smith-Magenis syndrome critical deletion interval on chromosome 17p11.2 and the syntenic region of the mouse. *Genome Res* 12(5):713-28.
- Blanco-Barca O, Gallego-Blanco M, Ruiz-Ponte C, Barros-Angueira F, Esquete-Lopez C, Eiris-Punal J, Castro-Gago M. 2004. [Smith-Magenis syndrome: a report of two new cases and an approximation to their characteristic behavioural phenotype]. *Rev Neurol* 38(11):1038-42.
- Boddaert N, De Leersnyder H, Bourgeois M, Munnich A, Brunelle F, Zilbovicius M. 2004. Anatomical and functional brain imaging evidence of lenticulo-insular anomalies in Smith Magenis syndrome. *Neuroimage* 21(3):1021-5.
- Boudreau EA, Johnson KP, Jackman AR, Blancato J, Huizing M, Bendavid C, Jones M, Chandrasekharappa SC, Lewy AJ, Smith AC and others. 2009. Review of disrupted sleep patterns in Smith-Magenis syndrome and normal melatonin secretion in a patient with an atypical interstitial 17p11.2 deletion. *Am J Med Genet A* 149A(7):1382-91.

- Bronberg R, Ziembar M, Drut M, Goldschmidt E. 2008. [Smith-Magenis syndrome: case report and review]. *Arch Argent Pediatr* 106(2):143-6.
- Brown A, Phelan MC, Patil S, Crawford E, Rogers RC, Schwartz C. 1996. Two patients with duplication of 17p11.2: the reciprocal of the Smith-Magenis syndrome deletion? *Am J Med Genet* 63(2):373-7.
- Campbell HD, Fountain S, Young IG, Claudianos C, Hoheisel JD, Chen KS, Lupski JR. 1997. Genomic structure, evolution, and expression of human FLII, a gelsolin and leucine-rich-repeat family member: overlap with LLGL. *Genomics* 42(1):46-54.
- Carmona-Mora P, Encina CA, Canales CP, Cao L, Molina J, Kairath P, Young JI, Walz K. Functional and cellular characterization of human Retinoic Acid Induced 1 (RAI1) mutations associated with Smith-Magenis Syndrome. *BMC Mol Biol* 11:63.
- Carmona-Mora P, Molina J, Encina CA, Walz K. 2009. Mouse models of genomic syndromes as tools for understanding the basis of complex traits: an example with the smith-magenis and the potocki-lupski syndromes. *Curr Genomics* 10(4):259-68.
- Carpizo R, Martinez A, Mediavilla D, Gonzalez M, Abad A, Sanchez-Barcelo EJ. 2006. Smith-Magenis syndrome: a case report of improved sleep after treatment with beta1-adrenergic antagonists and melatonin. *J Pediatr* 149(3):409-11.
- Chaudhry AP, Schwartz C, Singh AK. 2007. Stroke after cardiac surgery in a patient with Smith-Magenis syndrome. *Tex Heart Inst J* 34(2):247-9.
- Chen KS, Gunaratne PH, Hoheisel JD, Young IG, Miklos GL, Greenberg F, Shaffer LG, Campbell HD, Lupski JR. 1995. The human homologue of the *Drosophila melanogaster* flightless-I gene (*flil*) maps within the Smith-Magenis microdeletion critical region in 17p11.2. *Am J Hum Genet* 56(1):175-82.
- Chen RM, Lupski JR, Greenberg F, Lewis RA. 1996. Ophthalmic manifestations of Smith-Magenis syndrome. *Ophthalmology* 103(7):1084-91.
- Cheung SW, Shaw CA, Scott DA, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Pursley A, Li J, Erickson R, Gropman AL and others. 2007. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am J Med Genet A* 143A(15):1679-86.
- Chevillard C, Le Paslier D, Passage E, Ougen P, Billault A, Boyer S, Mazan S, Bachellerie JP, Vignal A, Cohen D and others. 1993. Relationship between Charcot-Marie-Tooth

- 1A and Smith-Magenis regions. snU3 may be a candidate gene for the Smith-Magenis syndrome. *Hum Mol Genet* 2(8):1235-43.
- Chik CL, Rollag MD, Duncan WC, Smith AC. Diagnostic utility of daytime salivary melatonin levels in Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A* 152A(1):96-101.
- Chou IC, Tsai FJ, Yu MT, Tsai CH. 2002. Smith-Magenis syndrome with bilateral vesicoureteral reflux: a case report. *J Formos Med Assoc* 101(10):726-8.
- Clarke DJ, Boer H. 1998. Problem behaviors associated with deletion Prader-Willi, Smith-Magenis, and cri du chat syndromes. *Am J Ment Retard* 103(3):264-71.
- Colley AF, Leversha MA, Voullaire LE, Rogers JG. 1990. Five cases demonstrating the distinctive behavioural features of chromosome deletion 17(p11.2 p11.2) (Smith-Magenis syndrome). *J Paediatr Child Health* 26(1):17-21.
- Cooper PS, Lipshultz D, Matten WT, McGinnis SD, Pechous S, Romiti ML, Tao T, Valjavec-Gratian M, Sayers EW. Education resources of the National Center for Biotechnology Information. *Brief Bioinform* 11(6):563-9.
- Cornelissen G, Halberg F, Tarquini R, Perfetto F, Salti R, Laffi G, Otsuka K. 2003. Point and interval estimations of circadian melatonin ecphasia in Smith-Magenis syndrome. *Biomed Pharmacother* 57 Suppl 1:31s-34s.
- Crumley FE. 1998. Smith-Magenis syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 37(11):1131-2.
- De Leersnyder H. 2006. Inverted rhythm of melatonin secretion in Smith-Magenis syndrome: from symptoms to treatment. *Trends Endocrinol Metab* 17(7):291-8.
- De Leersnyder H, Bresson JL, de Blois MC, Souberbielle JC, Mogenet A, Delhotal-Landes B, Salefranque F, Munnich A. 2003. Beta 1-adrenergic antagonists and melatonin reset the clock and restore sleep in a circadian disorder, Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet* 40(1):74-8.
- De Leersnyder H, Claustrat B, Munnich A, Verloes A. 2006. Circadian rhythm disorder in a rare disease: Smith-Magenis syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 252(1-2):88-91.
- De Leersnyder H, De Blois MC, Bresson JL, Sidi D, Claustrat B, Munnich A. 2003. [Inversion of the circadian melatonin rhythm in Smith-Magenis syndrome]. *Rev Neurol (Paris)* 159(11 Suppl):6S21-6.

- De Leersnyder H, De Blois MC, Claustrat B, Romana S, Albrecht U, Von Kleist-Retzow JC, Delobel B, Viot G, Lyonnet S, Vekemans M and others. 2001. Inversion of the circadian rhythm of melatonin in the Smith-Magenis syndrome. *J Pediatr* 139(1):111-6.
- De Leersnyder H, de Blois MC, Vekemans M, Sidi D, Villain E, Kindermans C, Munnich A. 2001. beta(1)-adrenergic antagonists improve sleep and behavioural disturbances in a circadian disorder, Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet* 38(9):586-90.
- De Rijk-van Andel JF, Catsman-Berrevoets CE, Van Hemel JO, Hamers AJ. 1991. Clinical and chromosome studies of three patients with Smith-Magenis syndrome. *Dev Med Child Neurol* 33(4):343-7.
- Di Cicco M, Padoan R, Felisati G, Dilani D, Moretti E, Gueneri S, Selicorni A. 2001. Otorhinolaringologic manifestation of Smith-Magenis syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 59(2):147-50.
- Duncan W, Gropman A, Morse R, Krasnewich D, Smith A. 2003. Good babies sleeping poorly: Insufficient sleep in infants with Smith-Magenis syndrome. *Am J Hum Genet* 73 Suppl:A896.
- Dykens EM. 1995. Measuring behavioral phenotypes: provocations from the "new genetics". *Am J Ment Retard* 99(5):522-32.
- Dykens EM. 2000. Psychopathology in children with intellectual disability. *J Child Psychol Psychiatry* 41(4):407-17.
- Dykens EM, Finucane BM, Gayley C. 1997. Brief report: cognitive and behavioral profiles in persons with Smith-Magenis syndrome. *J Autism Dev Disord* 27(2):203-11.
- Dykens EM, Smith AC. 1998. Distinctiveness and correlates of maladaptive behaviour in children and adolescents with Smith-Magenis syndrome. *J Intellect Disabil Res* 42 (Pt 6):481-9.
- Edelman EA, Girirajan S, Finucane B, Patel PI, Lupski JR, Smith AC, Elsea SH. 2007. Gender, genotype, and phenotype differences in Smith-Magenis syndrome: a meta-analysis of 105 cases. *Clin Genet* 71(6):540-50.
- Eichler EE, Nickerson DA, Altshuler D, Bowcock AM, Brooks LD, Carter NP, Church DM, Felsenfeld A, Guyer M, Lee C and others. 2007. Completing the map of human genetic variation. *Nature* 447(7141):161-5.

- Elsa SH, Fritz E, Schoener-Scott R, Meyn MS, Patel PI. 1998. Gene for topoisomerase III maps within the Smith-Magenis syndrome critical region: analysis of cell-cycle distribution and radiation sensitivity. *Am J Med Genet* 75(1):104-8.
- Elsa SH, Girirajan S. 2008. Smith-Magenis syndrome. *Eur J Hum Genet* 16(4):412-21.
- Elsa SH, Juyal RC, Jiralerspong S, Finucane BM, Pandolfo M, Greenberg F, Baldini A, Stover P, Patel PI. 1995. Haploinsufficiency of cytosolic serine hydroxymethyltransferase in the Smith-Magenis syndrome. *Am J Hum Genet* 57(6):1342-50.
- Elsa SH, Mykytyn K, Ferrell K, Coulter KL, Das P, Dubiel W, Patel PI, Metherall JE. 1999. Hemizyosity for the COP9 signalosome subunit gene, SGN3, in the Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet* 87(4):342-8.
- Elsa SH, Purandare SM, Adell RA, Juyal RC, Davis JG, Finucane B, Magenis RE, Patel PI. 1997. Definition of the critical interval for Smith-Magenis syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 79(3-4):276-81.
- Fan YS, Farrell SA. 1994. Prenatal diagnosis of interstitial deletion of 17(p11.2p11.2) (Smith-Magenis syndrome). *Am J Med Genet* 49(2):253-4.
- Favier R, Lavergne JM, Costa JM, Caron C, Mazurier C, Viemont M, Delpech M, Valleix S. 2000. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood* 96(13):4373-5.
- Finucane B, Dirrigl KH, Simon EW. 2001. Characterization of self-injurious behaviors in children and adults with Smith-Magenis syndrome. *Am J Ment Retard* 106(1):52-8.
- Finucane BM, Jaeger ER. 1997. Smith-Magenis syndrome. *Ophthalmology* 104(5):732-3.
- Finucane BM, Jaeger ER, Kurtz MB, Weinstein M, Scott CI, Jr. 1993. Eye abnormalities in the Smith-Magenis contiguous gene deletion syndrome. *Am J Med Genet* 45(4):443-6.
- Finucane BM, Konar D, Haas-Givler B, Kurtz MB, Scott CI, Jr. 1994. The spasmodic upper-body squeeze: a characteristic behavior in Smith-Magenis syndrome. *Dev Med Child Neurol* 36(1):78-83.
- Finucane BM, Kurtz MB, Babu VR, Scott CI, Jr. 1993. Mosaicism for deletion 17p11.2 in a boy with the Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet* 45(4):447-9.

- Fischer H, Oswald HP, Duba HC, Doczy L, Simma B, Utermann G, Haas OA. 1993. Constitutional interstitial deletion of 17(p11.2) (Smith-Magenis syndrome): a clinically recognizable microdeletion syndrome. Report of two cases and review of the literature. *Klin Padiatr* 205(3):162-6.
- Foster RH, Kozachek S, Stern M, Elsea SH. Caring for the caregivers: an investigation of factors related to well-being among parents caring for a child with Smith-Magenis syndrome. *J Genet Couns* 19(2):187-98.
- Girirajan S, Elsas LJ, 2nd, Devriendt K, Elsea SH. 2005. RAI1 variations in Smith-Magenis syndrome patients without 17p11.2 deletions. *J Med Genet* 42(11):820-8.
- Girirajan S, Mendoza-Londono R, Vlangos CN, Dupuis L, Nowak NJ, Bunyan DJ, Hatchwell E, Elsea SH. 2007. Smith-Magenis syndrome and Moyamoya disease in a patient with del(17)(p11.2p13.1). *Am J Med Genet A* 143A(9):999-1008.
- Girirajan S, Truong HT, Blanchard CL, Elsea SH. 2009. A functional network module for Smith-Magenis syndrome. *Clin Genet* 75(4):364-74.
- Girirajan S, Vlangos CN, Szomju BB, Edelman E, Trevors CD, Dupuis L, Nezarati M, Bunyan DJ, Elsea SH. 2006. Genotype-phenotype correlation in Smith-Magenis syndrome: evidence that multiple genes in 17p11.2 contribute to the clinical spectrum. *Genet Med* 8(7):417-27.
- Goldman AM, Potocki L, Walz K, Lynch JK, Glaze DG, Lupski JR, Noebels JL. 2006. Epilepsy and chromosomal rearrangements in Smith-Magenis Syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *J Child Neurol* 21(2):93-8.
- Goodier JL, Kazazian HH, Jr. 2008. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 135(1):23-35.
- Greenberg F, Guzzetta V, Montes de Oca-Luna R, Magenis RE, Smith AC, Richter SF, Kondo I, Dobyns WB, Patel PI, Lupski JR. 1991. Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet* 49(6):1207-18.
- Greenberg F, Lewis RA, Potocki L, Glaze D, Parke J, Killian J, Murphy MA, Williamson D, Brown F, Dutton R and others. 1996. Multi-disciplinary clinical study of Smith-Magenis syndrome (deletion 17p11.2). *Am J Med Genet* 62(3):247-54.
- Gropman AL, Duncan WC, Smith AC. 2006. Neurologic and developmental features of the

- Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Pediatr Neurol* 34(5):337-50.
- Gropman AL, Elsea S, Duncan WC, Jr., Smith AC. 2007. New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Curr Opin Neurol* 20(2):125-34.
- Gu W, Lupski JR. 2008. CNV and nervous system diseases--what's new? *Cytogenet Genome Res* 123(1-4):54-64.
- Harris FN, Jenson WR, McMahon WM. 1987. Use of T scores on the revised child behavior profile with inpatients. *J Clin Psychol* 43(4):376-9.
- Hicks M, Ferguson S, Bernier F, Lemay JF. 2008. A case report of monozygotic twins with Smith-Magenis syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 29(1):42-6.
- Hienonen T, Sammalkorpi H, Isohanni P, Versteeg R, Karikoski R, Aaltonen LA. 2005. A 17p11.2 germline deletion in a patient with Smith-Magenis syndrome and neuroblastoma. *J Med Genet* 42(1):e3.
- Hino-Fukuyo N, Haginoya K, Uematsu M, Nakayama T, Kikuchi A, Kure S, Kamada F, Abe Y, Arai N, Togashi N and others. 2009. Smith-Magenis syndrome with West syndrome in a 5-year-old girl: a long-term follow-up study. *J Child Neurol* 24(7):868-73.
- Hodapp RM, Fidler DJ, Smith AC. 1998. Stress and coping in families of children with Smith-Magenis syndrome. *J Intellect Disabil Res* 42 (Pt 5):331-40.
- Hou JW. 2003. Smith-Magenis syndrome: report of one case. *Acta Paediatr Taiwan* 44(3):161-4.
- Iafraite AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9):949-51.
- Itoh M, Hayashi M, Hasegawa T, Shimohira M, Kohyama J. 2004. Systemic growth hormone corrects sleep disturbance in Smith-Magenis syndrome. *Brain Dev* 26(7):484-6.
- Jardon J, Izquierdo NJ. 2009. Smith-Magenis syndrome in Puerto Rico: a case report. *Bol Asoc Med P R* 101(2):59-61.
- Juyal RC, Figuera LE, Hauge X, Elsea SH, Lupski JR, Greenberg F, Baldini A, Patel PI. 1996. Molecular analyses of 17p11.2 deletions in 62 Smith-Magenis syndrome patients. *Am J Hum Genet* 58(5):998-1007.

- Juyal RC, Finucane B, Shaffer LG, Lupski JR, Greenberg F, Scott CI, Baldini A, Patel PI. 1995. Apparent mosaicism for del(17)(p11.2) ruled out by fluorescence in situ hybridization in a Smith-Magenis syndrome patient. *Am J Med Genet* 59(3):406-7.
- Juyal RC, Greenberg F, Mengden GA, Lupski JR, Trask BJ, van den Engh G, Lindsay EA, Christy H, Chen KS, Baldini A and others. 1995. Smith-Magenis syndrome deletion: a case with equivocal cytogenetic findings resolved by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 58(3):286-91.
- Juyal RC, Kuwano A, Kondo I, Zara F, Baldini A, Patel PI. 1996. Mosaicism for del(17)(p11.2p11.2) underlying the Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet* 66(2):193-6.
- Kimura T, Arakawa Y, Inoue S, Fukushima Y, Kondo I, Koyama K, Hosoi T, Orimo A, Muramatsu M, Nakamura Y and others. 1997. The brain finger protein gene (ZNF179), a member of the RING finger family, maps within the Smith-Magenis syndrome region at 17p11.2. *Am J Med Genet* 69(3):320-4.
- Kondo I, Matsuura S, Kuwajima K, Tokashiki M, Izumikawa Y, Naritomi K, Niikawa N, Kajii T. 1991. Diagnostic hand anomalies in Smith-Magenis syndrome: four new patients with del (17)(p11.2p11.2). *Am J Med Genet* 41(2):225-9.
- Kosaki R, Okuyama T, Tanaka T, Migita O, Kosaki K. 2007. Monozygotic twins of Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A* 143(7):768-9.
- Koyama K, Fukushima Y, Inazawa J, Tomotsune D, Takahashi N, Nakamura Y. 1996. The human homologue of the murine Llg1h gene (LLGL) maps within the Smith-Magenis syndrome region in 17p11.2. *Cytogenet Cell Genet* 72(1):78-82.
- Lacombe D, Moncla A, Malzac P, Mattei MG, Battin J. 1997. [Smith-Magenis syndrome]. *Arch Pediatr* 4(5):438-42.
- Laje G, Bernert R, Morse R, Pao M, Smith AC. Pharmacological treatment of disruptive behavior in Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(4):463-8.
- Laje G, Morse R, Richter W, Ball J, Pao M, Smith AC. Autism spectrum features in Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C(4):456-62.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. 2007. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* 131(7):1235-47.

- Leoni C, Cesarini L, Dittoni S, Battaglia D, Novelli A, Bernardini L, Losurdo A, Vollono C, Testani E, Della Marca G and others. Hypoventilation in REM sleep in a case of 17p11.2 deletion (Smith-Magenis syndrome). *Am J Med Genet A* 152A(3):708-12.
- Liburd N, Ghosh M, Riazuddin S, Naz S, Khan S, Ahmed Z, Liang Y, Menon PS, Smith T, Smith AC and others. 2001. Novel mutations of MYO15A associated with profound deafness in consanguineous families and moderately severe hearing loss in a patient with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet* 109(5):535-41.
- Livet MO, Moncla A, Delobel B, Croquette MF, Philip N, Vallee L. 1997. [Smith-Magenis syndrome]. *Arch Pediatr* 4(12):1231-7.
- Llerena JC, Jr. 1997. Regarding the Smith-Magenis syndrome multidisciplinary clinical study by Greenberg et al [1996]. *Am J Med Genet* 73(1):97.
- Lucas RE, Vlangos CN, Das P, Patel PI, Elsea SH. 2001. Genomic organisation of the approximately 1.5 Mb Smith-Magenis syndrome critical interval: transcription map, genomic contig, and candidate gene analysis. *Eur J Hum Genet* 9(12):892-902.
- Lupski JR. 1998. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14(10):417-22.
- Lupski JR. 2007. An evolution revolution provides further revelation. *Bioessays* 29(12):1182-4.
- Lupski JR. 2007. Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nat Genet* 39(7 Suppl):S43-7.
- Lupski JR. 2007. Structural variation in the human genome. *N Engl J Med* 356(11):1169-71.
- Madduri N, Peters SU, Voigt RG, Llorente AM, Lupski JR, Potocki L. 2006. Cognitive and adaptive behavior profiles in Smith-Magenis syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 27(3):188-92.
- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. 2007. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* 35(Database issue):D26-31.
- Mariannejensen L, Kirchhoff M. 2005. Polydactyly in a boy with Smith-Magenis syndrome. *Clin Dysmorphol* 14(4):189-90.
- Martin SC, Wolters PL, Smith AC. 2006. Adaptive and maladaptive behavior in children with Smith-Magenis Syndrome. *J Autism Dev Disord* 36(4):541-52.

- Meinecke P. 1993. Confirmation of a particular but nonspecific metacarpophalangeal pattern profile in patients with the Smith-Magenis syndrome due to interstitial deletion of 17p. *Am J Med Genet* 45(4):441-2.
- Moncla A, Livet MO, Auger M, Mattei JF, Mattei MG, Giraud F. 1991. Smith-Magenis syndrome: a new contiguous gene syndrome. Report of three new cases. *J Med Genet* 28(9):627-32.
- Moncla A, Piras L, Arbex OF, Muscatelli F, Mattei MG, Mattei JF, Fontes M. 1993. Physical mapping of microdeletions of the chromosome 17 short arm associated with Smith-Magenis syndrome. *Hum Genet* 90(6):657-60.
- Myers SM, Challman TD. 2004. Congenital heart defects associated with Smith-Magenis syndrome: two cases of total anomalous pulmonary venous return. *Am J Med Genet A* 131(1):99-100.
- Myers SM, Challman TD, Bock GH. 2007. End-stage renal failure in Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A* 143A(16):1922-4.
- Natacci F, Corrado L, Pierri M, Rossetti M, Zuccarini C, Riva P, Miozzo M, Larizza L. 2000. Patient with large 17p11.2 deletion presenting with Smith-Magenis syndrome and Joubert syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 95(5):467-72.
- Niederhofer H. 2007. Efficacy of risperidone treatment in Smith-Magenis syndrome (del 17 pll. 2). *Psychiatr Danub* 19(3):189-92.
- Nyhan WL. 1972. Behavioral phenotypes in organic genetic disease. Presidential address to the Society for Pediatric Research, May 1, 1971. *Pediatr Res* 6(1):1-9.
- Nyhan WL. 1972. Clinical features of the Lesch-Nyhan syndrome. *Arch Intern Med* 130(2):186-92.
- Oldridge DA, Banerjee S, Setlur SR, Sboner A, Demichelis F. 2010. Optimizing copy number variation analysis using genome-wide short sequence oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* 38(10):3275-86.
- Orimo A, Inoue S, Ikeda K, Sato M, Kato A, Tominaga N, Suzuki M, Noda T, Watanabe M, Muramatsu M. 1998. Molecular cloning, localization, and developmental expression of mouse brain finger protein (Bfp)/ZNF179: distribution of bfp mRNA partially coincides with the affected areas of Smith-Magenis syndrome. *Genomics* 54(1):59-69.

- Park JP, Moeschler JB, Davies WS, Patel PI, Mohandas TK. 1998. Smith-Magenis syndrome resulting from a de novo direct insertion of proximal 17q into 17p11.2. *Am J Med Genet* 77(1):23-7.
- Park SS, Stankiewicz P, Bi W, Shaw C, Lehoczky J, Dewar K, Birren B, Lupski JR. 2002. Structure and evolution of the Smith-Magenis syndrome repeat gene clusters, SMS-REPs. *Genome Res* 12(5):729-38.
- Patil SR, Bartley JA. 1984. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 17. *Hum Genet* 67(2):237-8.
- Pittet O, Christodoulou M, Staneczek O, Ris HB. 2006. Diagnosis of Birt-Hogg-Dube syndrome in a patient with spontaneous pneumothorax. *Ann Thorac Surg* 82(3):1123-5.
- Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D, Carvalho CM, Eifert A, Friedman EM, Glaze D, Krull K, Lee JA, Lewis RA and others. 2007. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet* 80(4):633-49.
- Potocki L, Chen KS, Lupski JR. 1999. Subunit 3 of the COP9 signal transduction complex is conserved from plants to humans and maps within the smith-magenis syndrome critical region in 17p11.2. *Genomics* 57(1):180-2.
- Potocki L, Chen KS, Park SS, Osterholm DE, Withers MA, Kimonis V, Summers AM, Meschino WS, Anyane-Yeboah K, Kashork CD and others. 2000. Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Nat Genet* 24(1):84-7.
- Potocki L, Glaze D, Tan DX, Park SS, Kashork CD, Shaffer LG, Reiter RJ, Lupski JR. 2000. Circadian rhythm abnormalities of melatonin in Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet* 37(6):428-33.
- Potocki L, Shaw CJ, Stankiewicz P, Lupski JR. 2003. Variability in clinical phenotype despite common chromosomal deletion in Smith-Magenis syndrome [del(17)(p11.2p11.2)]. *Genet Med* 5(6):430-4.
- Prasad C. 2003. Smith-Magenis syndrome. *CMAJ* 169(6):543, 545; author reply 545.
- Probst FJ, Chen KS, Zhao Q, Wang A, Friedman TB, Lupski JR, Camper SA. 1999. A physical map of the mouse shaker-2 region contains many of the genes commonly

- deleted in Smith-Magenis syndrome (del17p11.2p11.2). *Genomics* 55(3):348-52.
- Pruitt KD, Tatusova T, Klimke W, Maglott DR. 2009. NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue):D32-6.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. 2007. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35(Database issue):D61-5.
- Quijano Roy S, Delicado Navarro A, Lopez Pajares I, Pascual-Castroviejo I. 1998. [Smith-Magenis syndrome: a case report]. *An Esp Pediatr* 49(4):405-8.
- Rachid R, Castigli E, Geha RS, Bonilla FA. 2006. TACI mutation in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* 6(5):357-62.
- Roccella M, Parisi L. 1999. The Smith-Magenis syndrome: a new case with infant spasms. *Minerva Pediatr* 51(3):65-71.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M and others. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38(1):24-6.
- Sarimski K. 2004. Communicative competence and behavioural phenotype in children with Smith-Magenis syndrome. *Genet Couns* 15(3):347-55.
- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, Canese K, Chetvermin V, Church DM, Dicuccio M, Federhen S and others. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue):D5-16.
- Scheurlen WG, Seranski P, Mincheva A, Kuhl J, Sorensen N, Krauss J, Lichter P, Poustka A, Wilgenbus KK. 1997. High-resolution deletion mapping of chromosome arm 17p in childhood primitive neuroectodermal tumors reveals a common chromosomal disruption within the Smith-Magenis region, an unstable region in chromosome band 17p11.2. *Genes Chromosomes Cancer* 18(1):50-8.
- Schlesinger AE, Potocki L, Poznanski AK, Lupski JR. 2003. The hand in Smith-Magenis syndrome (deletion 17p11.2): evaluation by metacarpophalangeal pattern profile analysis. *Pediatr Radiol* 33(3):173-6.
- Schoumans J, Staaf J, Jonsson G, Rantala J, Zimmer KS, Borg A, Nordenskjold M, Anderlid

- BM. 2005. Detection and delineation of an unusual 17p11.2 deletion by array-CGH and refinement of the Smith-Magenis syndrome minimum deletion to approximately 650 kb. *Eur J Med Genet* 48(3):290-300.
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EG, Oldenburg J. 1995. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 74(6):1402-6.
- Schwaab R, Oldenburg J, Schwaab U, Johnson DJ, Schmidt W, Olek K, Brackman HH, Tuddenham EG. 1995. Characterization of mutations within the factor VIII gene of 73 unrelated mild and moderate haemophiliacs. *Br J Haematol* 91(2):458-64.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M and others. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305(5683):525-8.
- Seranski P, Heiss NS, Dhorne-Pollet S, Radelof U, Korn B, Hennig S, Backes E, Schmidt S, Wiemann S, Schwarz CE and others. 1999. Transcription mapping in a medulloblastoma breakpoint interval and Smith-Magenis syndrome candidate region: identification of 53 transcriptional units and new candidate genes. *Genomics* 56(1):1-11.
- Seranski P, Hoff C, Radelof U, Hennig S, Reinhardt R, Schwartz CE, Heiss NS, Poustka A. 2001. RAI1 is a novel polyglutamine encoding gene that is deleted in Smith-Magenis syndrome patients. *Gene* 270(1-2):69-76.
- Shaw CJ, Lupski JR. 2005. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet* 116(1-2):1-7.
- Shaw CJ, Withers MA, Lupski JR. 2004. Uncommon deletions of the Smith-Magenis syndrome region can be recurrent when alternate low-copy repeats act as homologous recombination substrates. *Am J Hum Genet* 75(1):75-81.
- Shelley BP, Robertson MM. 2005. The neuropsychiatry and multisystem features of the Smith-Magenis syndrome: a review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17(1):91-7.
- Shelley BP, Robertson MM, Turk J. 2007. An individual with Gilles de la Tourette syndrome and Smith-Magenis microdeletion syndrome: is chromosome 17p11.2 a candidate region for Tourette syndrome putative susceptibility genes? *J Intellect Disabil Res* 51(Pt 8):620-4.

- Sineo L, Romagno D, Guarducci S, Lapini M, Giovannucci-Uzielli ML, Chiarelli B. 2002. Chromosome mapping of Miller-Diecker, Smith-Magenis and RARA loci in non-human primates: implications in the evolution of human chromosome 17. *Genetica* 114(3):275-80.
- Slager RE, Newton TL, Vlangos CN, Finucane B, Elsea SH. 2003. Mutations in RAI1 associated with Smith-Magenis syndrome. *Nat Genet* 33(4):466-8.
- Smith A, Bentley J, Zalewski C, Morse R, Introne W, Brewer C. 2007. Hyperacusis in persons with Smith Magenis syndrome: Expanding the SMS phenotype. 2007 ASHG Annual Meeting. San Diego. p 652.
- Smith A, Gropman A. 2005. Smith-Magenis syndrome. In: Allanson J, Cassidy S, editors. *Clinical Management of Common Genetic Syndromes*. New York: Wiley-Liss.
- Smith A, Leonard A, Gropman A, Krasnewich D. 2004. Growth assessment of Smith-Magenis syndrome. 54th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. Toronto. p 145.
- Smith A, McGavran L, Waldstein G. 1982. Deletion of the 17 short arm in two patients with facial clefts. *Am J Hum Genet* 34((Suppl):):A410.
- Smith AC, Boyd K, Elsea SH, Finucane BM, Haas-Givler B, Gropman A, Johnson KP, Lupski JR, Magenis E, Potocki L and others. 2010. Smith-Magenis Syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington.
- Smith AC, Dykens E, Greenberg F. 1998. Behavioral phenotype of Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Am J Med Genet* 81(2):179-85.
- Smith AC, Dykens E, Greenberg F. 1998. Sleep disturbance in Smith-Magenis syndrome (del 17 p11.2). *Am J Med Genet* 81(2):186-91.
- Smith AC, Gropman AL, Bailey-Wilson JE, Goker-Alpan O, Elsea SH, Blancato J, Lupski JR, Potocki L. 2002. Hypercholesterolemia in children with Smith-Magenis syndrome: del (17) (p11.2p11.2). *Genet Med* 4(3):118-25.
- Smith AC, Magenis RE, Elsea SH. 2005. Overview of Smith-Magenis syndrome. *J Assoc Genet Technol* 31(4):163-7.
- Smith AC, McGavran L, Robinson J, Waldstein G, Macfarlane J, Zonona J, Reiss J, Lahr M,

- Allen L, Magenis E. 1986. Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am J Med Genet* 24(3):393-414.
- Smith MR, Hildenbrand H, Smith AC. 2009. Sensory motor and functional skills of dizygotic twins: one with Smith-Magenis syndrome and a twin control. *Phys Occup Ther Pediatr* 29(3):239-57.
- Smith MR, Lee C, Crowley SJ, Fogg LF, Eastman CI. 2005. Morning melatonin has limited benefit as a soporific for daytime sleep after night work. *Chronobiol Int* 22(5):873-88.
- Smith MT, Edwards RR, Stonerock GL, McCann UD. 2005. Individual variation in rapid eye movement sleep is associated with pain perception in healthy women: preliminary data. *Sleep* 28(7):809-12.
- Smith MT, Perlis ML, Chengazi VU, Soeffing J, McCann U. 2005. NREM sleep cerebral blood flow before and after behavior therapy for chronic primary insomnia: preliminary single photon emission computed tomography (SPECT) data. *Sleep Med* 6(1):93-4.
- Song J, da Costa KA, Fischer LM, Kohlmeier M, Kwock L, Wang S, Zeisel SH. 2005. Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J* 19(10):1266-71.
- Spadoni E, Colapietro P, Bozzola M, Marseglia GL, Repossi L, Danesino C, Larizza L, Maraschio P. 2004. Smith-Magenis syndrome and growth hormone deficiency. *Eur J Pediatr* 163(7):353-8.
- Spilsbury J, Mohanty K. 2003. The orthopaedic manifestations of Smith-Magenis syndrome. *J Pediatr Orthop B* 12(1):22-6.
- Stankiewicz P, Inoue K, Bi W, Walz K, Park SS, Kurotaki N, Shaw CJ, Fonseca P, Yan J, Lee JA and others. 2003. Genomic disorders: genome architecture results in susceptibility to DNA rearrangements causing common human traits. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:445-54.
- Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M, Elizondo L, Park SS, Lupski JR. 2003. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet* 72(5):1101-16.
- Stenson PD, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Mort M, Cooper DN. 2009. The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for

- molecular diagnostics and personalized genomics. *Hum Genomics* 4(2):69-72.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K, Phillips AD, Thomas NS, Cooper DN. 2009. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Med* 1(1):13.
- Stratton RF, Dobyns WB, Greenberg F, DeSana JB, Moore C, Fidone G, Runge GH, Feldman P, Sekhon GS, Pauli RM and others. 1986. Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2): report of six additional patients with a new chromosome deletion syndrome. *Am J Med Genet* 24(3):421-32.
- Struthers JL, Carson N, McGill M, Khalifa MM. 2002. Molecular screening for Smith-Magenis syndrome among patients with mental retardation of unknown cause. *J Med Genet* 39(10):E59.
- Sweeney E, Peart I, Tofeig M, Kerr B. 1999. Smith-Magenis syndrome and tetralogy of Fallot. *J Med Genet* 36(6):501-2.
- Taylor L, Oliver C. 2008. The behavioural phenotype of Smith-Magenis syndrome: evidence for a gene-environment interaction. *J Intellect Disabil Res* 52(10):830-41.
- Teraoka M, Narahara K. 1996. [Smith-Magenis syndrome]. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*(15):224-6.
- Thein SL, Hesketh C, Taylor P, Temperley IJ, Hutchinson RM, Old JM, Wood WG, Clegg JB, Weatherall DJ. 1990. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(10):3924-8.
- Thomas DG, Jacques SM, Flore LA, Feldman B, Evans MI, Qureshi F. 2000. Prenatal diagnosis of smith-magenis syndrome (del 17p11.2). *Fetal Diagn Ther* 15(6):335-7.
- Tomona N, Smith AC, Guadagnini JP, Hart TC. 2006. Craniofacial and dental phenotype of Smith-Magenis syndrome. *Am J Med Genet A* 140(23):2556-61.
- Trask BJ, Mefford H, van den Engh G, Massa HF, Juyal RC, Potocki L, Finucane B, Abuelo DN, Witt DR, Magenis E and others. 1996. Quantification by flow cytometry of chromosome-17 deletions in Smith-Magenis syndrome patients. *Hum Genet* 98(6):710-8.
- Truong HT, Dudding T, Blanchard CL, Elsea SH. Frameshift mutation hotspot identified in Smith-Magenis syndrome: case report and review of literature. *BMC Med Genet* 11:142.

- Truong HT, Solaymani-Kohal S, Baker KR, Girirajan S, Williams SR, Vlangos CN, Smith AC, Bunyan DJ, Roffey PE, Blanchard CL and others. 2008. Diagnosing Smith-Magenis syndrome and duplication 17p11.2 syndrome by RAI1 gene copy number variation using quantitative real-time PCR. *Genet Test* 12(1):67-73.
- Tsirikos AI, Baker AD, McClean C. Surgical treatment of scoliosis in Smith-Magenis syndrome: a case report. *J Med Case Reports* 4:26.
- Udwin O, Webber C, Horn I. 2001. Abilities and attainment in Smith-Magenis syndrome. *Dev Med Child Neurol* 43(12):823-8.
- Van Thillo A, Devriendt K, Willekens D. [Sleep disturbances in Smith-Magenis syndrome: treatment with melatonin and beta-adrenergic antagonists]. *Tijdschr Psychiatr* 52(10):719-23.
- Vlangos CN, Das P, Patel PI, Elsea SH. 2000. Assignment of developmentally regulated GTP-binding protein (DRG2) to human chromosome band 17p11.2 with somatic cell hybrids and localization to the Smith-Magenis syndrome critical interval. *Cytogenet Cell Genet* 88(3-4):283-5.
- Vlangos CN, Wilson M, Blancato J, Smith AC, Elsea SH. 2005. Diagnostic FISH probes for del(17)(p11.2p11.2) associated with Smith-Magenis syndrome should contain the RAI1 gene. *Am J Med Genet A* 132A(3):278-82.
- Vlangos CN, Yim DK, Elsea SH. 2003. Refinement of the Smith-Magenis syndrome critical region to approximately 950kb and assessment of 17p11.2 deletions. Are all deletions created equally? *Mol Genet Metab* 79(2):134-41.
- Walz K, Spencer C, Kaasik K, Lee CC, Lupski JR, Paylor R. 2004. Behavioral characterization of mouse models for Smith-Magenis syndrome and dup(17)(p11.2p11.2). *Hum Mol Genet* 13(4):367-78.
- Wheeler B, Taylor B, Simonsen K, Reith DM. 2005. Melatonin treatment in Smith Magenis syndrome. *Sleep* 28(12):1609-10.
- Willekens D, De Cock P, Fryns JP. 2000. Three young children with Smith-Magenis syndrome: their distinct, recognisable behavioural phenotype as the most important clinical symptoms. *Genet Couns* 11(2):103-10.
- Williams SR, Girirajan S, Tegay D, Nowak N, Hatchwell E, Elsea SH. 2010. Array comparative genomic hybridisation of 52 subjects with a Smith-Magenis-like

- phenotype: identification of dosage sensitive loci also associated with schizophrenia, autism, and developmental delay. *J Med Genet* 47(4):223-9.
- Witherspoon DJ, Watkins WS, Zhang Y, Xing J, Tolpinrud WL, Hedges DJ, Batzer MA, Jorde LB. 2009. Alu repeats increase local recombination rates. *BMC Genomics* 10:530.
- Wolters PL, Gropman AL, Martin SC, Smith MR, Hildenbrand HL, Brewer CC, Smith AC. 2009. Neurodevelopment of children under 3 years of age with Smith-Magenis syndrome. *Pediatr Neurol* 41(4):250-8.
- Wong JT, Chan DK, Wong KY, Tan M, Rudduck C, Tien SL. 2003. Smith-Magenis syndrome and cyanotic congenital heart disease: a case report. *Clin Dysmorphol* 12(1):73-4.
- Xing J, Zhang Y, Han K, Salem AH, Sen SK, Huff CD, Zhou Q, Kirkness EF, Levy S, Batzer MA and others. 2009. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res* 19(9):1516-26.
- Yamamoto T, Ueda H, Kawataki M, Yamanaka M, Asou T, Kondoh Y, Harada N, Matsumoto N, Kurosawa K. 2006. A large interstitial deletion of 17p13.1p11.2 involving the Smith-Magenis chromosome region in a girl with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet A* 140(1):88-91.
- Yan J, Bi W, Lupski JR. 2007. Penetrance of craniofacial anomalies in mouse models of Smith-Magenis syndrome is modified by genomic sequence surrounding Rai1: not all null alleles are alike. *Am J Hum Genet* 80(3):518-25.
- Yan J, Keener VW, Bi W, Walz K, Bradley A, Justice MJ, Lupski JR. 2004. Reduced penetrance of craniofacial anomalies as a function of deletion size and genetic background in a chromosome engineered partial mouse model for Smith-Magenis syndrome. *Hum Mol Genet* 13(21):2613-24.
- Yoshimuru K, Kurashige T. 1996. [A case of Smith-Magenis syndrome]. *No To Hattatsu* 28(4):341-5.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. 2009. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10:451-81.
- Zhao Z, Lee CC, Jiralerspong S, Juyal RC, Lu F, Baldini A, Greenberg F, Caskey CT, Patel PI. 1995. The gene for a human microfibril-associated glycoprotein is commonly

deleted in Smith-Magenis syndrome patients. *Hum Mol Genet* 4(4):589-97.

Zori RT, Lupski JR, Heju Z, Greenberg F, Killian JM, Gray BA, Driscoll DJ, Patel PI, Zackowski JL. 1993. Clinical, cytogenetic, and molecular evidence for an infant with Smith-Magenis syndrome born from a mother having a mosaic 17p11.2p12 deletion. *Am J Med Genet* 47(4):504-11.

Anexos

1. Ofício de aprovação do Comitê de ética em Pesquisa, FMB – UNESP.



**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 05 de novembro de 2.007

OF. 447/2007-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Danilo Moretti-Ferreira
Departamento de Genética do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezado Prof. Danilo,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP informo que o Projeto de Pesquisa **“Avaliação molecular de pacientes com síndrome de Smith-Magenis”**, a ser conduzido por Gustavo Henrique Vieira, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05/11/2007, **não necessitando de envio à CONEP, haja vista cumprir as normas da Resolução 340/2004 –Genética Humana.**

Situação do Projeto: **APROVADO.** Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP **“Relatório Final de Atividades”**.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

2. Termo de consentimento livre e esclarecido



Depto. de Genética - Inst. de Biociências - UNESP
 Tel. (14) 3811-6016 Fone/Fax (14) 3815-3131
 Cx.P. 529 18618-000 Botucatu/SP
 E-Mail: sag@fmb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós estamos convidando vocês a participarem do projeto de pesquisa intitulado "Avaliação molecular de pacientes com síndrome de Smith-Magenis" do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu cujo responsável é o Mt. Gustavo Henrique Vieira e gostaríamos que vocês soubessem que:

- Participar deste projeto é uma opção de vocês, podendo decidir participar ou não;
- Caso vocês decidirem não participar ou desistirem de participar a qualquer momento vocês não perderão nenhum benefício ou tratamento que estiverem fazendo nesta instituição (UNESP – Botucatu).
- A qualquer momento você terá a liberdade de buscar junto aos responsáveis pelo projeto, esclarecimentos de qualquer natureza, inclusive os relativos à metodologia de trabalho.
- Sua participação nesta pesquisa é total e completamente isenta de qualquer ônus financeiro. Caso você venha a ter qualquer despesa decorrente de sua participação nesta pesquisa, será imediatamente ressarcido, mediante a devolução dos valores despendidos.
- Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

- O presente trabalho tem por **objetivos**:

1. Determinar o fragmento deletado, com os respectivos genes perdidos, em portadores brasileiros da SMS, diagnosticados através da técnica de FISH, como portadores da microdeleção;
2. Construção do mapa de deleção (perda de material genético) dos portadores brasileiros da SMS;
3. Estabelecer uma correlação genótipo (genes deletados) /fenótipo (características clínicas).

- se vocês decidirem participar gostaríamos de informar-lhes que:

- a) Iremos coletar uma amostra de 3ml de sangue (1 colher de sopa) do portador de da síndrome Smith-Magenis e de seus pais.
- b) A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe um risco de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta.
- c) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para você ou sua família.
- d) Vocês estarão colaborando para aumentar o nosso conhecimento sobre a origem da síndrome de Smith-Magenis.
- e) O material biológico (DNA) será armazenado em nossos bancos de estoque e poderá ser usado em futuras pesquisas por fatores genéticos, relacionados com a síndrome de Smith-Magenis, que venham a ser descobertos, diante de nova aprovação pelo CEP e CONEP, após vocês serem novamente contatados e dando nova autorização.
- e) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
- f) Assim que existam resultados, estes serão apresentados a vocês pelos responsáveis.
- g) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
- h) Sempre que ocorrerem publicações científicas, a sua identidade, de seu filho ou familiar será mantida em absoluto sigilo.
- i) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido o acesso aos dados por terceiros.
- j) Todos os resultados de exames moleculares estarão disponíveis no prontuário do portador de Smith-Magenis do Serviço de Aconselhamento Genética – UNESP.

l) Os pesquisadores se responsabilizam por reparar danos eventuais associados e/ou decorrentes da pesquisa, sejam eles imediatos ou tardios, inclusive no que diz respeito às indenizações.

Eu, _____ portador do R.G. nº _____ (responsável pelo paciente) concordo em participar do projeto de pesquisa "Avaliação molecular de pacientes com síndrome de Smith-Magenis". Declaro haver recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, estar ciente sobre os itens acima mencionados e minha participação é voluntária por opção própria.

Nome do Paciente: _____ Data: _____

Assinatura
Nome do responsável:

Responsável: Mt. Gustavo Henrique Vieira

Fone: (14) 3815-3131 / 9754-5963

Endereço: Rubião Junior S/N – UNESP – Campus de Botucatu - Depto. de Genética – Serviço de Aconselhamento Genético

Botucatu/SP – CEP:18.618-000

ghvieira@ibb.unesp.br

Eu, _____ portador do R.G. nº _____,

- Autorizo
 Não autorizo

que minha amostra de DNA fique depositada no Banco de DNA do Serviço de Aconselhamento Genético da UNESP de Botucatu.

Assinatura
Nome do responsável:

3. Ficha de avaliação de pacientes com suspeita clínica de SMS

FICHA DE AVALIAÇÃO SÍNDROME DE SMITH-MAGENIS

PACIENTE: _____

RESPONSÁVEL: _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ IDADE: ____ Registro: _____

TEL: _____

INSTITUIÇÃO COLABORADORA: _____

CONTATO NA INSTITUIÇÃO: _____ TEL: _____

DATA DA AVALIAÇÃO CLÍNICA: ____/____/____

CRITÉRIOS / PONTUAÇÃO:

A. DISTÚRPIO DO SONO: Presente [] Ausente [] Não possível caracterizar []

(acordar a noite frequentemente, sono se interrompe cedo pela manhã, sonolência e cochilos durante o dia, não deixa a família dormir dentro da casa, etc)

Descrever: _____

B. Movimento estereotipado de 'self-hug' (ABRAÇAR-SE) ou movimento similar (como descrito no folder): Presente [] Ausente [] Não possível caracterizar []

(como espasmos ou tics exacerbados por alegria, excitação ou maior estimulação do paciente. Podem diminuir na fase adulta.)

Descrever: _____

C. Movimento estereotipado de 'LICK AND FLIP' ou Movimento similar:

Presente [] Ausente [] Não possível caracterizar []

(lamber a mão ou dar pequenas mordidas enquanto usa a outra para passar páginas ou folhas sequencialmente)

Descrever: _____

D. ARRANCAR AS UNHAS: Presente [] Ausente [] Não possível caracterizar []

(fazendo parte da sensibilidade diminuída dos afetados chegando a sangrar e também muitas vezes puxando a cutícula ao redor das unhas dos pés ou das mãos)

Descrever: _____

E. INSERIR OBJETOS EM ORIFÍCIOS (Ouvido, nariz, umbigo, ânus ou vagina):

Presente [] Ausente [] Não possível caracterizar []

(pode ser pensado em abuso quando em vagina ou ânus, e muitas vezes levando a necessidade recorrente de atendimento para extração de corpo estranho)

Descrever: _____

F. DISMORFIAS FACIAIS COMPATÍVEIS:

Presente [] Ausente []

Descrever: _____

OUTROS:

1. Outra forma de auto-injúria: Sim [] Não []

(beliscar-se, puxar a pele, arrancar os cabelos, morder-se fazendo calos, bater no peito ou na cabeça, bater a cabeça em superfícies duras, etc)

Descrever: _____

2. Comportamentos desajustados (birras, agressividade, surtos de raiva, desobediência recorrente, atitudes desafiadoras para chamar a atenção): Sim [] Não []

Descrever: _____

3. Busca de alguma forma constantemente a atenção de adultos: Sim [] Não []

Descrever: _____

4. Atração demasiada por objetos eletrônicos: Sim [] Não []

(para desmontá-los, tentar observar como funciona, separar as partes)

Decrever: _____

5. Hipotonia e comportamento calmo ('bebê perfeito') no primeiro ano de vida: Sim [] Não []

Descrever: _____

6. Beber água frequentemente ou comer várias vezes ao dia (sem muita atração por doces) para chamar atenção e para diminuir a ansiedade.

Presente [] Ausente [] Não possível caracterizar []

Descrever: _____

OUTRAS ANOMALIAS E DADOS CLÍNICOS RELEVANTES

Principalmente **oftalmológicas** (alta miopia, coloboma ou anormalidade de íris, microcórnea, estrabismo, alguma forma de catarata ou opacificação do cristalino, degeneração macular, anormalidades de retina, hipoplasia de nervo óptico), cardíacas, genito-urinárias, ou musculoesqueléticas:

Frequência dos sinais clínicos da Síndrome de Smith-Magenis. Baseada em Smith et al. (2004)

S – presente ; N- ausente; ? – Não possível observar ou caracterizar

Frequência	Sistema	Anormalidade
> 75% dos pacientes	Craniofacial / Músculo- esquelético	<ul style="list-style-type: none"> • Braquicefalia () • Hipoplasia de face média () • Prognatismo relativo com a idade () • Face larga e de formato quadrado () • Lábio superior protuso e em 'V' invertido () • Olhos encovados e pouca distância intercantal () • Mãos pequenas e largas () • Braquidactilia () • Anormalidades Odontológicas ()
	Anormalidades Otolaringológicas	<ul style="list-style-type: none"> • Voz rouca e grave () • Infecções crônicas do ouvido ()
	Neuro- comportamentais	<ul style="list-style-type: none"> • Comprometimento cognitivo/atraso no desenvolvimento () • Letargia e pouca reatividade (infância precoce) () • Hipotonia (até os 2 anos) () • Distúrbio de sono () • Inversão do ritmo circadiano da melatonina () • Comportamentos estereotipados () • Comportamento de auto-agressão () • Atraso de fala () • Reflexos hipoativos () • Sinais de neuropatia periférica () • Disfunção da motricidade oral (infância precoce) () • Atraso Motor () • Necessidade de atenção ()
Aspectos comuns (50 a 75% dos pacientes)		<ul style="list-style-type: none"> • Perda auditiva () • Baixa estatura () • Escoliose () • Discreto alargamento dos ventrículos cerebrais () • Insuficiência velo-faríngea () • Anorm. oftalmológicas (anomalia de íris, microcórnea) () • Anormalidades do sono REM () • Hipercolesterolemia / Hipertrigliceridemia () • Relato de constipação () • Anormalidades ao EEG s/ crises convulsivas evidentes () • Miopia () • Estrabismo ()

Pouco comum (25 a 50% dos pacientes)		<ul style="list-style-type: none">• Cardiopatia ()• Anormalidades da função tireoidiana ()• Epilepsia ou anormalidades de EEG sem crises clínicas ()• Hipogenitalismo nos meninos ()• Sinofre ()
Ocasionais (<25% dos pacientes)		<ul style="list-style-type: none">• Anormalidades renais ou do trato urinário ()• Anormalidades do antebraço ()• Fenda lábio-palatina ()• Descolamento de retina ()• Obesidade ()