

Gustavo Henrique Vieira

Análise Molecular de Pacientes com
Macrossomia

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de
concentração: Genética

Orientador: Prof.Dr. Danilo Moretti-Ferreira

Botucatu

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Vieira, Gustavo Henrique.

Análise molecular de pacientes com macrossomia / Gustavo Henrique
Vieira. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu, 2007.

Orientadora: Danilo Moretti-Ferreira

Assunto CAPES: 20200005

1. Genética do desenvolvimento
2. Biologia do desenvolvimento
3. Genética

CDD 574.3

Palavras-chave: Macrossomias, Microdeleções; Microssatélites; Mutações;
Seqüenciamento direto; Síndrome de Sotos

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, por me dar os meus mais importantes valores.

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

À Tábata Mussi.

A toda minha família.

Ofereço este trabalho a todas as famílias com portadores de síndromes macrossômicas.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Julio Mesquita Filho – UNESP – Campus de Botucatu e todo seu corpo docente e funcionários, pelo aprendizado.

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 do trabalho.

Ao Serviço de Aconselhamento Genético e a todos os seus funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo Auxílio Financeiro (2005/01880-8).

À Fundação Lucentis de Apoio a Cultura, Ensino, Pesquisa e Extensão, pelo auxílio financeiro.

Ao Prof.Dr. Danilo Moretti-Ferreira, pela orientação, ensinamentos e amizade. Pela brilhante condução dos problemas durante as difíceis fases deste trabalho e por nortear a minha maneira de ver a ciência.

À Doutora Renata Lucia Leite Ferreira de Lima, pela ajuda nas análises finais deste trabalho, ensinamentos, incentivos, ajuda e amizade incondicional.

Ao Carlos Eduardo Frigério Domingues, irmão e companheiro de laboratório, pela ajuda em todas as fases deste trabalho. Pelo companheirismo e pela amizade livre de qualquer interesse.

Ao Prof.Dr. Wilson Araújo Silva Jr. pela disponibilização de seu laboratório para a realização dos seqüenciamentos.

Ao Dr. Daniel Rocha de Carvalho, pela avaliação clínica e ajuda em vários momentos deste trabalho.

À Deise Helena Souza, pela ajuda durante este trabalho.

Aos funcionários da pós-graduação.

À Anemari, Fernanda, Lidiane e Adriana, do Hemocentro da Faculdade de Medicina da USP – Ribeirão Preto pela ajuda no seqüenciamento das amostra.

À Israel Tojal, pela ajuda na parte de Bioinformática deste trabalho.

À Luciana Rosa, pela ajuda na parte laboratorial em momentos importantes deste trabalho e pela grande amizade.

À Aline Lourenço, pela ajuda em momentos importantes deste trabalho.

À Layla, Henrique, Larissa Doddi, Larissa Lumi, a toda Equipe ERBM, a todos meus amigos e aos meus grandes amigos, Uilian, Celso, Thiago, Lucas e Bruno (Comédia), Alex e Bruno (Fusuca), pelos momentos de ajuda psicológica em diversos momentos deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. Síndrome de Sotos.....	4
1.2. Síndrome de Weaver.....	6
1.3. Síndrome de Beckwith-Wiedemann.....	7
1.4. Síndrome de Bannayan-Zonana.....	8
1.5. Demais macrossomias.....	9
1.6. Aspectos moleculares das macrossomias.....	11
1.6.1. O gene NSD1.....	12
1.6.2 O gene PTEN.....	15
2. Objetivos	17
3. Materiais e métodos	19
3.1. Casuística.....	20
3.1.1. Critérios de inclusão.....	20
3.1.2. Critérios de exclusão.....	20
3.2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	20
3.3. Avaliação clínica.....	21
3.4. Obtenção das amostras.....	21
3.5. Metodologias.....	22
3.5.1. Obtenção de DNA genômico.....	22
3.5.2. Análise de microdeleção no gene NSD1.....	23
3.5.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23
3.5.2.2. Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)	26
3.5.2.3. Genotipagem.....	29
3.5.3. Análise dos exons dos genes NSD1 e PTEN através de seqüenciamento direto.....	30
3.5.3.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
3.5.3.2 Seqüenciamento automático.....	31
4. Resultados	34
4.1. Análise clínica.....	35
4.2. Análise de microdeleções.....	59
4.3 Análise dos exons dos genes NSD1 e PTEN através de seqüenciamento direto.....	62
5. Discussão	66
6. Conclusão	73
7. Referências Bibliográficas	76

Anexo I	1
Anexo II	3
Anexo III	5
Anexo IV – Descrições Clínicas	13
Anexo V – Resultados Moleculares	61

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.....	3
Figura 2.....	12
Figura 3.....	15
Figura 4.....	24
Figura 5.....	29
Figura 6.....	50
Figura 7.....	55
Figura 8.....	55
Tabela 1.....	9
Tabela 2.....	13
Tabela 3.....	25
Tabela 4.....	25
Tabela 5.....	26
Tabela 6.....	28
Tabela 7.....	32
Tabela 8.....	35
Tabela 9.....	36
Tabela 10.....	40
Tabela 11.....	43
Tabela 12.....	45
Tabela 13.....	53
Tabela 14.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

μl – microlitros

A/C – área de concentração

ADNPM – atraso do desenvolvimento neuropsicomotor

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

cm – centímetros

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

DGGE – Denaturing Gradiente Gel Eletroforesis

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

DO – densidade ótica

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

et al. – e outros (et alli)

H – homem

HCl – ácido clorídrico

IB – Instituto de Biociências

KCl – Cloreto de Potássio

kv – kilovolts

M – mulher

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Min – minutos

ml – mililitro

mM – Milimolar

MP – microssatélites polimórficos

MPLA – Multiplex ligation Dependent Probe Amplification

NaOH – Hidróxido de Sódio

ng – Nanogramas

nm – Nanômetros

NSD1 – Proteína nuclear contendo o receptor SET (Nuclear receptor SET-Domain containing protein)

°C – Graus Celsius

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PTEN – phosphatase and tensin homolog

RNA – ácido ribonucléico

RNMC – Ressonância Nuclear Magnética de Crânio

RPM – rotações por minuto

SAG – Serviço de Aconselhamento Genético

SBW – síndrome de Beckwith–Wiedemann

SBZ – síndrome de Bannayan-Zonana

Seg – segundo

SS – síndrome de Sotos

SSCP – Polimorfismo conformacional de fita simples

SW – síndrome de Weaver

TBE – Tris – Acído Bórico – EDTA

TCC – Tomografia Computadorizada de Crânio

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

UFRJ – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

UI – Unidade Internacional

UNESP – Universidade Estadual Paulista

USP – Universidade de São Paulo

W – Watts

RESUMO

A macrosomia é definida como desvio positivo dos padrões de crescimento somático normal, em um dado momento temporal. Esta afecção apresenta etiologia variada e pode apresentar-se em diversos momentos do desenvolvimento do indivíduo. Este trabalho analisou, através de técnicas de biologia molecular, pacientes que apresentaram macrosomias patológicas de origem pré-natal e entre elas estão a síndrome de Sotos, síndrome de Weaver, síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Bannayan-Zonana. Foram incluídos 27 pacientes (15 com síndrome de Sotos, 5 com síndrome de Weaver, 2 com síndrome de Beckwith-Wiedemann, 2 com síndrome de Bannayan-Zonana e 3 com síndromes macrossômicas a definir), que foram divididos em três grupos : síndrome de Sotos, síndrome de Weaver e demais macrosomias. Dos 27 pacientes incluídos apenas 17 deles foram analisados para a detecção de microdeleções, através de microssatélites polimórficos. Em nenhum dos casos analisados foi encontradas microdeleções. Em seguida, todos os casos passaram por uma análise nos genes NSD1 e PTEN, por seqüenciamento direto. Foram encontradas 10 novas mutações no gene NSD1 e uma no gene PTEN. A frequência dos de aparecimento de microdeleções e mutações no gene NSD1 em pacientes com SS, esta em acordo com outros estudo realizados na população européia. Estes achados vem contribuir para a criação de um painel de mutações na população brasileira e no desenvolvimento de um diagnóstico mais seguro e confiável para pacientes com fenótipo macrossômico.

ABSTRACT

Macrosomia is defined as a positive deviation from normal somatic growth patterns at a given time. This disease of varied etiology may manifest at different stages of an individual's development. The purpose of this work was to use molecular biology techniques to assess patients with pathological macrosomias of pre-natal origin such as Sotos syndrome, Weaver syndrome, Beckwith-Wiedmann syndrome, and Bannayan-Zonana syndrome. Twenty-seven patients (15 with Sotos syndrome, 5 with Weaver syndrome, 2 with Beckwith-Wiedmann syndrome, 2 with Bannayan-Zonana syndrome, and 3 with macrosomic syndromes still undefined) were divided into three groups: Sotos syndrome, Weaver syndrome, and other macrosomias. Polymorphic microsatellite markers were used for the analysis of 17 of the 27 patients included. No microdeletion was found in any of the cases. Subsequently, direct sequencing was used to analyze genes NSD1 and PTEN in all cases, and revealed 10 new mutations in NSD1 and one in PTEN. The frequency of NSD1 microdeletions and mutations found in the patients with Sotos syndrome was consistent with other studies conducted in European populations. These findings may contribute to the creation of a mutation panel for the Brazilian population, and to the establishment of a safer and more reliable diagnosis in patients with a macrosomic phenotype.

Introdução

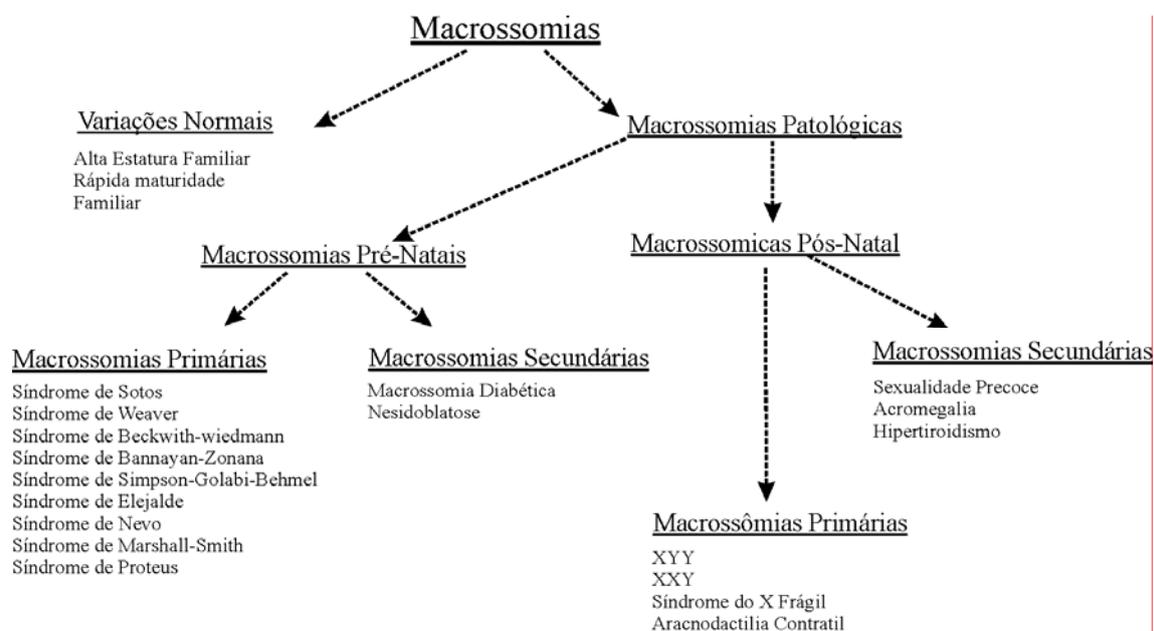
A macrosomia é conceituada tradicionalmente como um desvio positivo dos padrões de crescimento somático normal, em um dado momento temporal (Morreti-Ferreira, 1995, Cohen, 2002). Douglas et al. (2003), selecionaram crianças que estivessem acima do 97º percentil para altura, acima do 97º percentil de circunferência occipito-frontal e acima do 90º percentil de idade óssea para defini-las como macrosômicas.

O excesso de crescimento pode ser uma variante normal determinada poligeneticamente. Nas macrosomias patológicas, o excesso de crescimento é usualmente, de instalação pré-natal e tipo primário (Morreti-Ferreira, 1995).

Ao contrário das síndromes microsômicas que podem ser apenas um fenômeno secundário a uma causa cromossômica ou a uma alteração genética, a macrosomia é um fenômeno puramente primário, que resulta num crescimento desordenado do indivíduo portador, permitindo assim, realizar-se estudos que possibilitem o entendimento dos mecanismos e conseqüências da falha de regulação do crescimento (Carakushansky, 2001). Estas síndromes apresentam expressividade variável e seguem alguns preceitos: a macrosomia geralmente está presente ao nascimento e persiste na vida pós-natal; como critério de diagnóstico, o peso tem se mostrado tão importante quanto à estatura; muitas dessas síndromes encontram-se associadas a vários defeitos físicos; a deficiência mental é uma característica freqüente dos pacientes e por fim, algumas destas síndromes associam-se a neoplasias (Cohen, 1981, 1982a, 1982b; Moretti – Ferreira, 1988; Cohen, 1989).

Dentre as síndromes responsáveis pela macrosomia patológica pré-natal, podemos destacar: Síndromes de Sotos (SS), Weaver (SW), Beckwith-Wiedmann (SBW), Bannayan-Zonana (SBZ), Simpson-Golabi-Behnel, Elejaldi, Nevos, Marshall-

Smith e Proteus. A macrosomia apresenta uma etiologia variada, e desta forma podemos ter doenças que apresentam herança autossômica dominante como a SBZ, de caráter recessivo como a Elejalde ou acontecer esporadicamente como SW. A classificação realizada por Graham & Rimoim (2002) esta apresentada na figura 1.



Modificado de Graham & Rimoim (2002)

Figura 1. O esquema mostra a classificação geral das macrosomias.

Assim, realizaremos uma rápida exposição das principais macrosomias pré-natais primárias visando destacar fundamentalmente os aspectos clínicos e genéticos.

1.1. SÍNDROME DE SOTOS

A Síndrome de Sotos (SS, OMIM # 117550), conhecida também como “Gigantismo Cerebral”, refere-se a um distúrbio de crescimento positivo que se manifesta tanto na fase pré quanto pós-natal. Foi descrito inicialmente por Juan Sotos et al. (1964) em um grupo de cinco pacientes. Trata-se de uma afecção de herança autossômica dominante, mas casos esporádicos também são verificados (Cole e Hughes, 1990; Optiz et al., 1998; Proud et al., 1998). Apesar de não ter uma prevalência bem definida, estima-se que esteja entre 1 em 10.000 e 1 em 50.000 nascidos vivos (CARAKUSHANSKY, 2001).

Esta síndrome se expressa clinicamente de maneira bastante ampla. Verifica-se principalmente o crescimento excessivo de tamanho, acima do 90º percentil, correspondendo em média a 55,2 cm ao nascimento, sendo que nos quatro primeiros anos de vida esse processo ocorre aceleradamente seguindo também do ganho de peso e que atingem limites acima de 97º percentil; após esse pico de crescimento segue-se uma diminuição desse fenômeno estabilizando assim a estatura que estará em torno de 97º percentil. A idade óssea do paciente mostra-se avançada em relação a sua idade cronologia (Moretti-Ferreira, 1995; Carakushansky, 2001).

As anomalias congênitas e de desenvolvimento são sinais também relevantes nos indivíduos acometidos por essa afecção. A macrocrania associada a características dismórficas, como a dolicocefalia, estão permanentemente presentes; fronte ampla e com bossas; fendas palpebrais inclinadas para baixo; ponte nasal alargada; palato arqueado e erupção prematura de dentes são observados em mais de 50% dos casos. Anomalias no desenvolvimento do sistema nervoso central são também verificadas, levando a uma deficiência mental que pode variar de leve a moderada. A dilatação dos

ventrículos cerebrais, sem indícios de obstrução ou de atrofia cerebral são comuns (Moretti-Ferreira, 1995; Cohen et al. 2002).

Imaizumi et al. diagnosticaram, em 2002, uma criança com SS na qual foi identificada uma translocação t(5;8) (q53;q24.1) acarretando na disrupção de um gene localizado em 5q35 e identificado como NSD1 (*nuclear receptor SET-domain-containing protein*). Kurotaki et al. (2002) também estudaram essa região, analisando 42 indivíduos com SS e verificaram que 19 deles apresentaram uma microdeleção de 2.2Mb e os restante deles, uma mutação no gene NSD1.

1.2. SÍNDROME DE WEAVER

A Síndrome de Weaver (SW, OMIM # 277590), descrita em 1974 por David Weaver, é uma doença que atua desregulando positivamente o crescimento desde a fase pré-natal e, portanto, a criança já apresenta tamanho e peso acima dos 97º percentil ao nascimento. Além disso, apresenta um quadro clínico semelhante à Sotos, sugerindo uma heterogeneidade alélica, segundo Optiz et al. (1998), o que aumenta as chances de ocorrerem erros de diagnóstico durante a avaliação do paciente. No entanto, alguns sinais peculiares podem estar presentes como o choro rouco de tonalidade grave e hipertonia. Há também, crescimento e maturação óssea desregulado, sendo que, em relação à altura, peso e perímetro cefálico, este último é o que se revela mais destoante em relação ao excessivo crescimento (Meinecke et al., 1983; Amir et al., 1984). Dentre outras características também se encontra atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (Danwood et al., 1985; Moretti-Ferreira, 1995). No crânio, observa-se o occipital frequentemente achatado e raramente é dolicocefálico, fronte larga e alta, hipertelorismo ocular, seguido de um achatamento da base do nariz e, em alguns casos, de epicanto interno. (Moretti-Ferreira, 1995; Cara, 2001).

A causa da SW ainda não está bem elucidada e a maioria dos casos são tidos como esporádicos. No entanto foram relatados casos que indicam uma herança dominante (COHEN et al., 2002; DOUGLAS et al., 2003).

Douglas et al. (2003) e Rio et al. (2003) afirmam que mutações no gene NSD1 podem levar a SW. Estes achados corroboram com a temática de que em síndromes macrossômicas o mesmo gene pode decodificar proteínas diferentes, controlando os resultados em fenótipos diferentes (De Vitto, 2004).

1.3. BECKWITH-WIEDEMANN

A síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW, OMIM #130650) é uma síndrome macrossômica complexa e heterogênea, que causa alterações genéticas e epigenéticas envolvendo “imprinting” genômico e predisposição para o desenvolvimento de câncer (GOMES, 2003).

A SBW foi descrita por Wiedemann em 1964 e Beckwith em 1969 em estudos independentes. A tríade de sinais dismórficos que caracterizam a síndrome são: onfalocele, macroglossia e gigantismo. Deficiência mental de grau variável é frequentemente descrita, especialmente nos casos em que a microcefalia está associada (Morretti-Ferreira, 1995; De Vitto, 2004).

Segundo Carakushansky (2001), cerca de 30 a 50% dos casos apresentaram uma grave e persistente hipoglicemia, com início já nos primeiros dias de vida, que se deve a uma hiperinsulinemia resultante de uma síndrome de maturação defeituosa das ilhotas pancreáticas, anteriormente conhecida como nesidoblastose (Munns et al., 2001). Goldman (2003) relatou casos em que a hipercalciúria também estava presente. Existe uma incidência aumentada de tumores malignos, com destaque para o tumor de Wilm's e o hepatoplastoma. A prevalência desta síndrome está estimada em 1: 13.700 nascidos vivos. (Graham&Rimoin, 2002)

A maioria dos autores relatam correlação entre a SBW e o cromossomo 11, na região p15.5, mas o gene ainda não foi isolado (Maher,1999; Schofield, 2001; Catchpole, 2000; DeVitto, 2004). Segundo Engel et al. (2000) esta síndrome tem origem poligênica e pode estar associada a “imprinting” nos genes IGF2 e H19 e microdeleções na região p15.5 (Esparago et al., 2004; Prawitt et al. 2005; Cerrato et al., 2005)

1.4. SÍNDROME DE BANNAYAN-ZONANA

A Síndrome de Bannayan-Zonana (BZS, OMIM #153408) é uma síndrome autossômica dominante que se caracteriza por macrocefalia, disfunção neurológica, manchas café-com-leite no tronco, pólipos intestinais, e hemangiomas múltiplos. (Higginbottom, 1982; Moretti-Ferreira, 1989, 1995).

Israel et al. (1991) descreveram um caso de translocação Y;19 (q11;q13) em um paciente com SBZ, mas microdeleções envolvendo o a região 10q23, que contem o gene PTEN foram relatadas por Arch et al.(1997) e Tsuchiya et al. (1998). Análises moleculares envolvendo pacientes com BZS foram realizadas por Marsh et al. (1997), Longy et al. (1998) e Celebi et al. (1999), que relataram mutações no gene PTEN e as relacionaram com as características fenotípicas resultantes da BZS.

1.5. DEMAIS SÍNDROMES MACROSSÔMICAS

As características clínicas e moleculares das demais síndromes cromossômicas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Principais características de outras síndromes macrossômicas*

Síndrome	Herança	Principais achados clínicos	Aspectos Moleculares
Simpson-Golabi- Behnel	Recessiva ligada ao X	Macrocefalia, hipertelorismo ocular, nariz hipoplásico, mãos grandes, macroglossia, retardo mental de grau variável, hipotonia, polidactilia pós-axial nas mãos, unhas hipoplásicas, sindactilia cutânea parcial, criptorquidismo, mamilos supra-numéricos, anomalias cardíaca e intestinal, rins alargados policísticos.	Microdeleções (500Kb) no gene GPC3 (Xq26)
Elejalde	Autossômica recessiva	Craniossinostose, grandes edemas, membros curtos, polidactilia pós-axial, pescoço alado, displasia cística renal, cardiopatia congênita, anormalidades no baço.	Mutações no gene MYO5A
Nevo	Autossômica recessiva	Orelhas grandes e baixo implantadas, criptorquidismo, maturação óssea acelerada, dolicocefalia, extremidades grandes, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e de fala, edema generalizado, hipotonia, contratura nos pés, clinodactilia, punhos fletidos	Mutações no gene PLOD1 (1p36.3)

Tabela 1. Principais características de outras síndromes macrossômicas*
(*Continuação*)

Síndrome	Herança	Principais achados clínicos	Aspectos Moleculares
Marshall-Smith	esporádica	Crescimento acelerado, maturação óssea acelerada, hipotonia, atraso no desenvolvimento, estruturas cerebrais anormais, trato respiratório anormal, pneumonias recorrentes, hipertensão pulmonar, dolicocefalia, sobrancelhas grossas, esclera azulada, narinas antevertidas, hipertricose, hérnia umbilical, atresia coanal, onfalocele, ponte nasal e ramo mandibular pequenos.	Trissomia de 2q3
Proteus	esporádica	Hipercrecimento na região das mãos e dos pés, membros assimétricos, hiperplasia plantar, hemangiomas, lipomas, linfangiomas, varicose, nevo epidérmico verrucoso, macrocefalia, hiperostose cranial, hipercrecimento ósseo, deficiência mental de grau variada.	Deleção no gene PTEN

*Modificado de Rimoin et al. (2002)

1.6. ASPECTOS MOLECULARES DAS MACROSSOMIAS

As sobreposições moleculares fazem as síndromes macrossômicas apresentarem grande dificuldade no momento do diagnóstico molecular (Baujat et al., 2005). Diversos estudos relacionaram primeiramente síndromes isoladas a apenas um gene, mas estudos recentes demonstram que em muitos casos vários genes estão envolvidos nestas condições ou ainda genes que estavam relacionados a síndromes isoladas estão alterados de uma maneira específica que gera uma outra condição macrossômica, como os casos descritos por Baujat et al. (2005), envolvendo as SS e SBW.

A região do cromossomo 5q(35.2 – 35.3) apresenta aproximadamente 42 MB no qual podemos encontrar o gene NSD1 (figura 1) que já foi relacionado com as síndromes de Sotos (Imaizumi et al., 2002; Kurotaki et al., 2002), Weaver (Douglas et al., 2003; Rio et al., 2003) e recentemente com a síndrome Beckwith-Wiedemann que classicamente está relacionada com “*imprinting*” da região 11p15, no entanto após resultados negativos quanto a alterações nesta região, foi feita análise de mutações no gene NSD1 revelando, alterações (Baujat et al., 2004).

Vários estudos relacionam o desenvolvimento macrossômico a alterações em outros genes, como por exemplo, alterações nos genes GPC3 relacionadas à síndrome Simpson-Golabi-Behnel (Piilia et al., 1996; Xuan et al, 1994 e 1999; Li et al., 2001; Rodriguez-Criado et al., 2005), MYO5A relacionadas à síndrome de Elejalde (Anikster et al., 2002;), PLOD1 relacionadas à síndrome de Nevo(Giunta et al., 2005), Trissomia de 2q3 relacionada a síndrome Marshall-Smith (Seidahmed et al., 1999) e o gene PTEN com as síndromes de Cowden (síndrome caracterizada por apresentar lesões hamartomatosas múltiplas), Proteus e Bannayan-Zonana (Wanner et al., 2001).

1.6.1. O GENE NSD1

As funções do gene NSD1 (*nuclear receptor-SET-domain-containing protein*) ainda não estão bem esclarecidas, no entanto, segundo Douglas (2003), acredita-se que esteja envolvido no processo transcricional, assumindo um papel capaz de estimular ou inibir essa atividade celular. Recentemente, à SS tem sido atribuída a haploinsuficiência do gene NSD1, apesar de não ser uma característica condizente com os sinais clínicos relatados, pois existem pacientes com os sinais clínicos mais frequentes na SS que não apresentam alterações no gene NSD1 (Nagai et al., 2003).

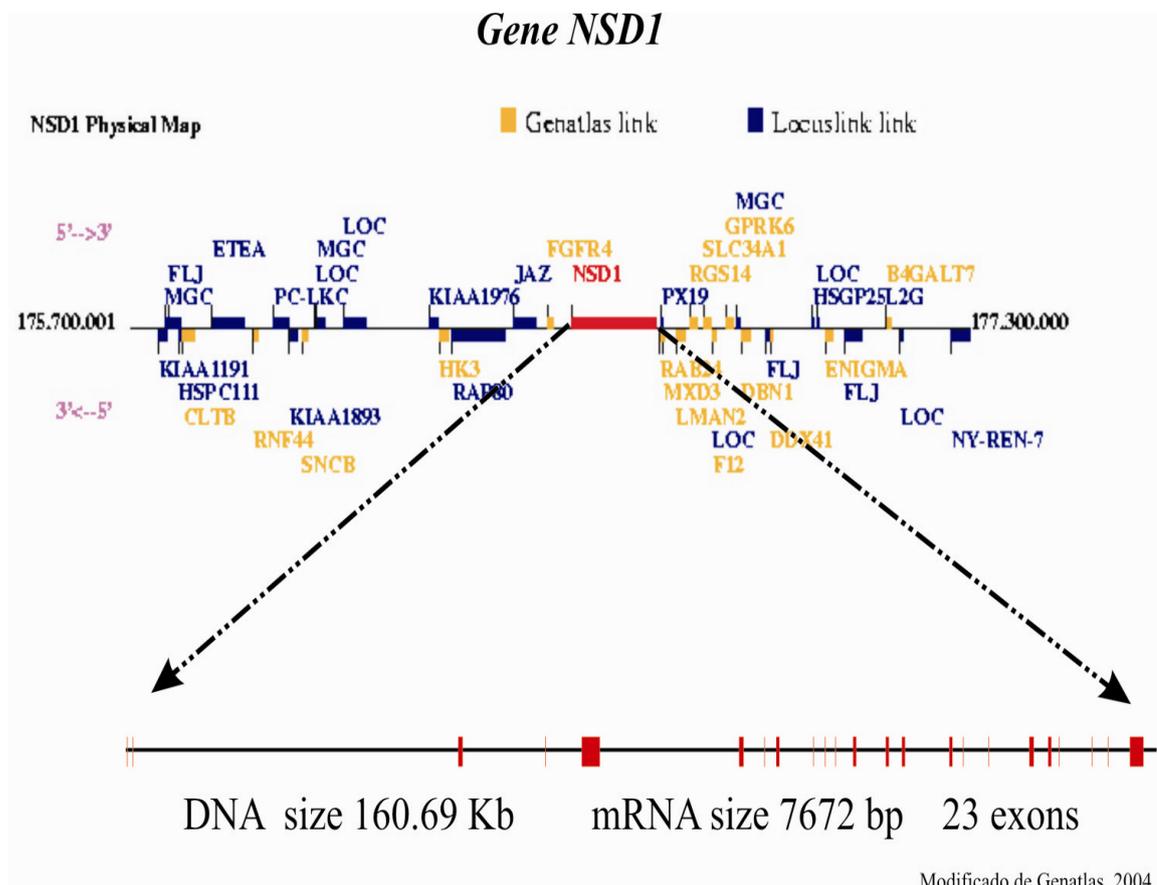


Figura 2. Esquema de localização do gene NSD1. (<http://www.genatlas.org/>)

Dos 23 exons que constituem o gene NSD1, somente o primeiro não é expresso. O restante são responsáveis por codificarem pelo menos 6 domínios funcionais (SET,

PWWP I, PWWP II, PHD-I, PHD-II, PHD-III) ligados à regulação da cromatina, e são expressos em diversos tecidos como o cerebral, tanto em fetos quanto em adultos, renal, muscular esquelético, esplênico e no timo (Nagai, 2003; Douglas et al., 2003). Desta forma, uma das possíveis causas das SS e SW é a presença de alterações no gene NSD1, fato este que tem variado em diferentes populações como no Reino Unido, França, Alemanha e Itália (Tabela 2). Entretanto, a tal discrepância destes índices é sugerida por Tatton-Brown (2005) como sendo apenas uma simples diferença de amostragem não sendo um critério exclusivo para a classificação da SS.

TABELA 2. Frequência de ocorrência de alterações no gene NSD1 na SS.*

Referência	População estudada	Frequência
Kurotaki et al. [2002]	japoneses	77%
Kurotaki et al. [2003]	japoneses / europeus	
Pacientes japoneses		63%
Pacientes não japoneses		35%
Douglas et al. [2003]	Ingleses	76%
Rio et al. [2003]	Franceses	69%
Turkmen et al. [2003]	Alemães	
Cecconi et al. [2005]	Italianos	70%

*Modificado de Faravarelli (2005)

As mutações no NSD1 também já foram relacionadas ao aparecimento de sinais clínicos característicos das síndromes de Sotos, Weaver e mais recentemente de Beckwith-Wiedmann. Nagai (2003) correlacionou o fenótipo (precoce maturação na primeira infância, retardo mental, hipotonia e hiper-reflexia e anomalias menores como no sistema nervoso central, cardiovascular e urinário) de cinco pacientes com mutações intragênicas no gene NSD1, sendo duas delas sem sentido, uma inserção, uma deleção e uma mutação que altera o quadro de leitura produzindo a proteína NSD1 truncada.

Em estudos recentes realizados por Baujat et al. (2004) mostraram uma íntima relação molecular entre as SS e BWS. Foram encontrados quatro casos que apresentavam alterações paradoxais em seus genomas. Dois deles, diagnosticados como

SS, apresentavam alterações na região 11p15 (isodissomia parental e demetilação do KCNQ1OT), região tradicionalmente relacionada ao *imprinting* causador da Síndrome de Beckwith-Wiedemann. Quando foram analisados os probandos com BWS que não apresentavam alterações na região característica foram encontradas mutações em seus genes NSD1 {ins 5(G) no exon 14 e del (GACA) no exon 23}, gene que está relacionado com a SS.

Desta forma, notamos que pode existir uma correlação molecular entre as síndromes macrossômicas, mesmo entre as que aparentemente apresentam sinais distintos e etiologia variada.

1.6.2. O GENE PTEN

O gene PTEN tem seu locus localizado no cromossomo 10 na região q22-23, ele expressa duas fosfatases com atividade de supressão tumoral. Este gene apresenta 9 éxon, dos quais 8 são codificados completamente e apenas 1 (éxon 1) apresenta uma região rica em GC que não é codificada. A proteína codificada apresenta 403 aminoácidos, com 47 Kda de peso molecular.

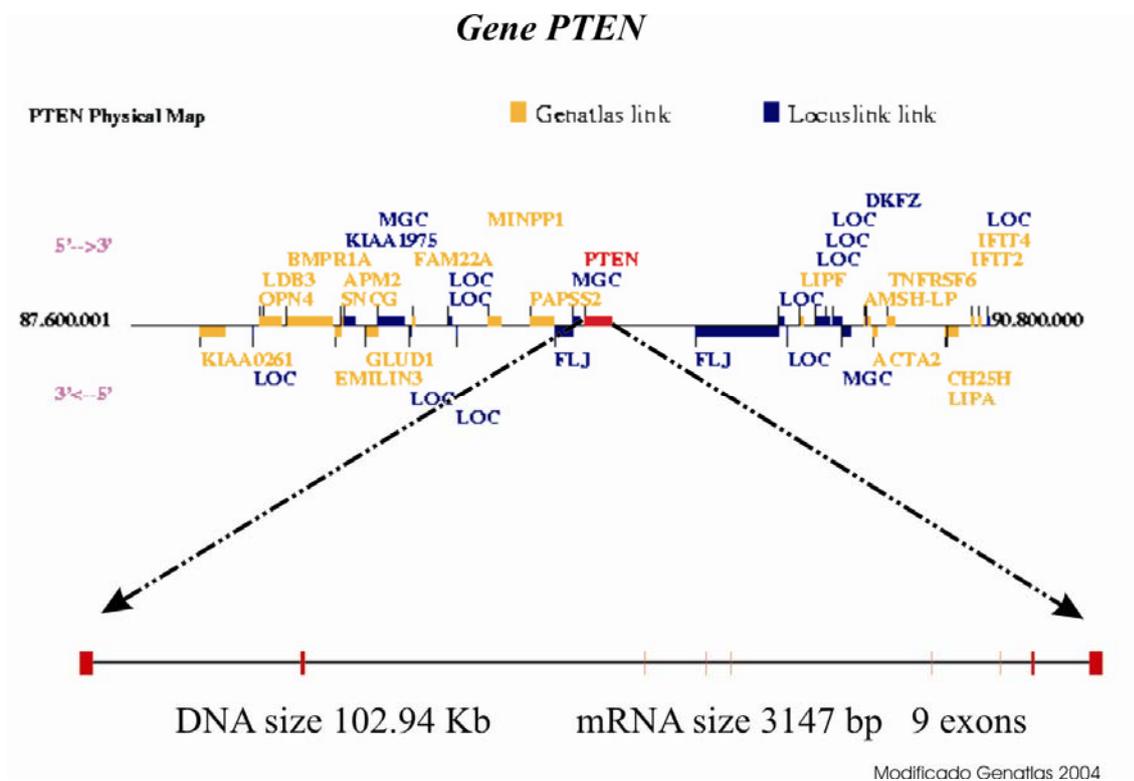


Figura 3. Esquema de localização do gene PTEN (<http://www.genatlas.org/>).

Este gene está relacionado à síndrome de Cowen, Proteus e Bannayan-Zonana. Primeiramente, descrito como um supressor tumoral, o gene PTEN quando mutado pode levar a vários fenótipos diferentes. (Payne et al. 1999). Wanner et al. (2001), relatou mutações no gene PTEN em famílias de síndrome Bannayan-Zonana. Outras

mutações foram descritas por Reardon et al. (2001) que associavam este gene à macrocefalia, dilatação ventricular e associação de VATER.

Objetivos

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, as síndromes macrossômicas apresentam grande similaridade quanto aos sinais clínicos apresentados e quanto aos parâmetros citogenéticos e moleculares (Jones, 1994).

Estudos realizados na Inglaterra e Japão mostram um grande número de mutações no gene NSD1 nas SS e SW, outros correlacionam o gene PTEN às síndromes de Proteus e a Bannayan-Zonana, estas idéias colaboram com a temática de que em síndromes macrossômicas o mesmo gene pode decodificar proteínas diferentes, resultando em fenótipos diferentes (DOUGLAS, 2003; DE VITTO, 2004).

Este estudo pretende sequenciar os dois genes mais freqüentemente relacionados à macrossomias, desta forma este estudo pretendeu envolver pacientes de vários centros de diagnóstico e aconselhamento genético e assim encontrar as principais mutações relacionadas a síndromes macrossômicas na população brasileira. Desta forma nossos objetivos no presente estudo foram:

1. Realizar uma triagem nos genes NSD1 e PTEN em pacientes afetados pelas síndromes macrossômicas visando estabelecer um painel das mutações mais freqüentes ou verificar novas mutações presentes em nossa população.
2. Pesquisar, através da análise de microssatélites, uma herança não balanceada na região cromossômica do gene NSD1.
3. Desenvolver uma correlação genótipo/fenótipo entre as diversas síndromes macrossômicas e suas mutações a fim de estabelecer um diagnóstico diferencial entre as síndromes macrossômicas.
4. Desenvolver um método racional para o diagnóstico molecular das síndromes macrossômicas.

*Material e
Métodos*

3.1. CASUÍSTICA

Para a realização deste estudo foram analisados 27 pacientes diagnosticados clinicamente como portadores de síndromes macrossômicas pertencente a 26 núcleos familiares (caso 24 e 25 são gêmeas), 20 destes pacientes foram avaliados no Serviço de Aconselhamento Genético do Departamento de Genética –IB – UNESP – Campus de Botucatu – SP (SAG), 3 pacientes foram encaminhados pelo Serviço de Genética Clínica do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da UFRJ e 6 casos enviados do Serviço de Genética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP de Ribeirão Preto.

3.1.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo todos os pacientes que apresentavam características macrossômicas ao nascimento ou em algum momento temporal do seu desenvolvimento. Este paciente ainda deveria apresentar ou ter apresentado, em algum momento temporal, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

3.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo os pacientes que não apresentassem macrossomias em nenhum momento temporal, todos os pacientes que não aceitassem as condições éticas ou apresentassem qualquer anomalia citogenética.

Ainda poderiam ser excluídos das análises de microdeleção no gene NSD1, aqueles que não apresentassem condições de coleta sanguínea do núcleo familiar completo.

3.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para a participação neste estudo todos os responsáveis presentes na consulta médica foram informados sobre a metodologia utilizada e os objetivos da pesquisa.

Quando estes concordavam em participar da pesquisa, era solicitado o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II). Este projeto foi aprovado pelo Comitê em Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UNESP de Botucatu – SP, através do parecer OF 536/2004-CEP (Anexo I).

3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Todos os pacientes foram analisados por profissional médico geneticista. Para a padronização da avaliação em diversos centros de diagnóstico foi desenvolvido um protocolo de avaliação de pacientes com hipótese diagnóstica de síndromes macrossômicas (PA) e enviado aos centros de genética que participavam do estudo (anexo III).

Para uma melhor análise dos dados os pacientes foram divididos em três grupos: Síndrome de Sotos (I), Síndrome de Weaver (II) e outras macrossomias (III). (DOUGLAS, 2003).

Apenas 17 casos apresentaram trio familiar completo (mãe, pai e filho). Em 10 deles, não foi possível coletar amostra de sangue de um dos genitores devido ao fato de não estarem disponíveis para a coleta de material biológico. Nos casos em que não foi possível a coleta de material dos genitores, formando o trio familiar completo, não foi realizada a análise de microdeleções e somente foi feito a busca de mutações por seqüenciamento direto.

3.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para cada paciente foram coletados 9 ml de sangue periférico bem como de seus genitores. Este sangue foi distribuído em dois (2) tubos: 1- contendo anticoagulante

EDTA a 6% (frasco Vacuette[®] EDTA 3ml) e 2- contendo anticoagulante heparina sódica 25.000 UI (frasco Vacuette[®] Heparina 6ml). Quando o paciente já havia realizado cariótipo foi coletado apenas 3 ml de sangue (tubo com EDTA) para a realização de extração de DNA, bem como de seus pais. Após a distribuição, os tubos foram homogeneizados para evitar a formação de coágulos.

Os tubos foram mantidos sob refrigeração (4°C) para o transporte até o processamento no SAG.

3.5 METODOLOGIAS

3.5.1. 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 “Genomic Prep Blood Isolation Kit” da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH[®]. 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 seco a temperatura ambiente e foi ressuspendido em solução de hidratação.

As amostras de DNA foram quantificadas e qualificadas através de leitura em espectrofotômetro. Uma vez diluídas na proporção de 1:100 foram submetidas a leituras em 260nm (comprimento de onda que o DNA apresenta o máximo de absorção), 280nm e 320 nm para assim obtermos a razão relativa 260/280 que nos dá a pureza da amostra. Todas as amostras apresentaram valores entre 1.85 e 2.0 garantindo assim a boa qualidade, livre de contaminação por proteínas e RNA. Depois de cumprida essa etapa, quantificamos as amostras utilizando a fórmula sugerida por Kaufman, (1995):

$$(DO_{260 \text{ nm}} - DO_{320 \text{ nm}}) \times DO^* \times \text{valor da diluição} = \text{___} \mu\text{g/ml}$$

Sendo:

DO = densidade ótica

DO*(diluição de 1:100) apresenta os seguintes valores:

DO_{260 nm} (DNA fita dupla) = 50 μg/ml

DO_{260 nm} (DNA fita simples) = 30 μg/ml

3.5.2. Análise de microdeleção do gene NSD1

A triagem de microdeleções no gene NSD1 foi realizada em 17 probandos e em seus pais a fim de pesquisar uma herança não balanceada na região cromossômica do gene NSD1. Dez dos casos analisados não apresentavam núcleo familiar completo (mãe, probando e pai), não sendo possível a análise de microdeleções por microssatélites nestes casos.

A metodologia sugerida por Douglas *et al.* (2003), incluía 9 marcadores microssatélites polimórficos (MP) dentro e ao redor do NSD1. A localização destes MP pode ser observada na Figura 4.

As análises destes MP seguiu as seguintes etapas:

3.5.2.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA extraídas segundo a técnica descrita acima foram submetidas a PCR. Esta técnica permite que regiões selecionadas dos genes em questão sejam amplificadas milhões de vezes. Para este estudo foram utilizados os iniciadores específicos que flanqueiam os marcadores microssatélites polimórficos, estes iniciadores estão descritos na tabela 5.

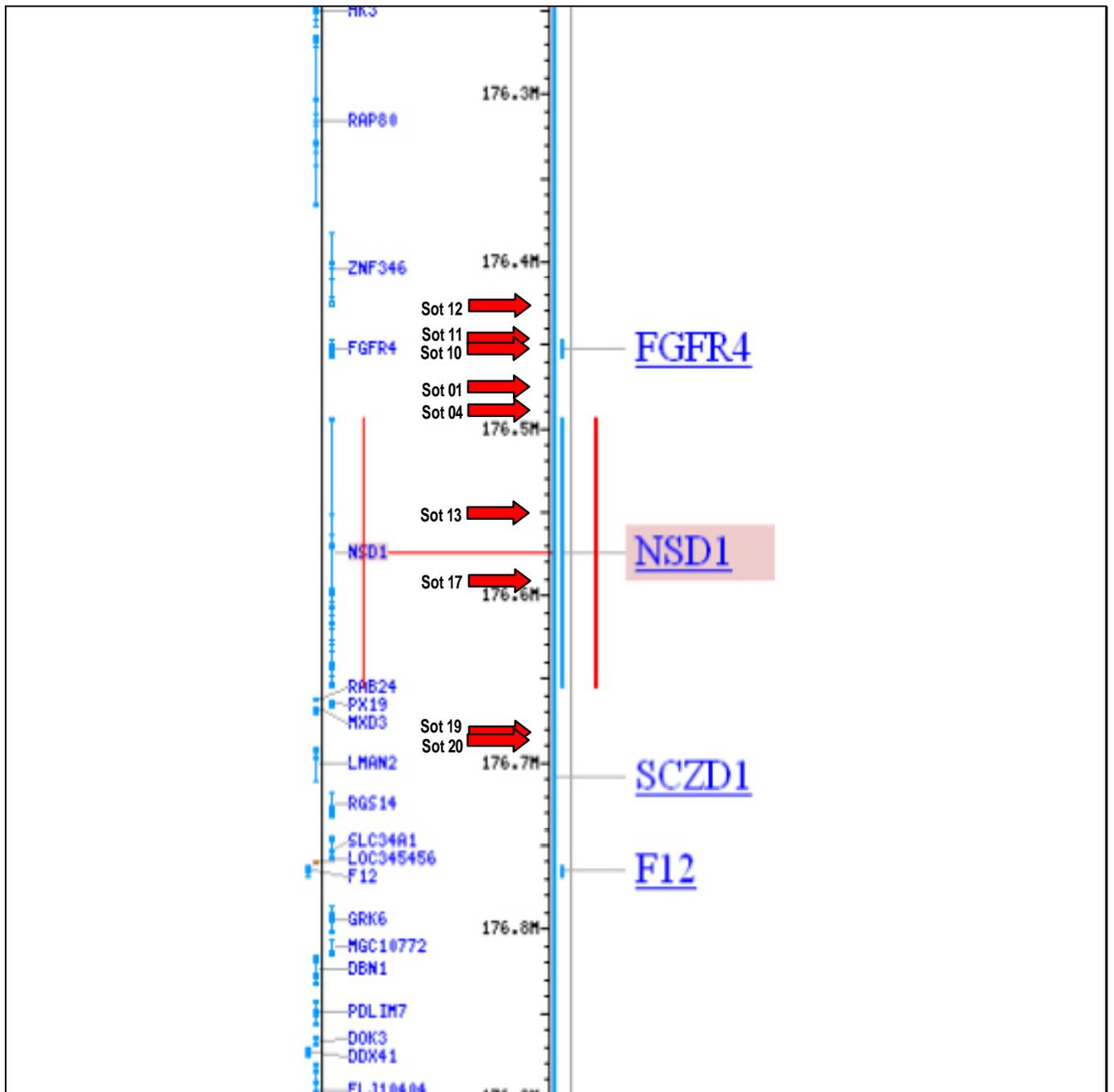


Figura 4. Localização dos sítios de atuação dos marcadores microssatélites.
(modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Cada reação de PCR (com volume total de 10 μ l) continha: 40ng de DNA, 200mM de cada dinucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 20 μ M de cada iniciador específico; 10mM de Tris-HCl pH8.3; 50mM KCl; 1.5mM de MgCl₂; 0,001% de gelatina; 0,5 μ l de DMSO e 1 unidade (U) de Taq Polimerase (Invitrogen). As ampliações *in vitro* foram realizadas no termociclador da MJ Research PT200 seguindo o programa descrito por Douglas et al. (2003) (tabela 3). As temperaturas de anelamento de cada iniciador foram atingidas realizando-se testes com PCRs com temperaturas de anelamento gradiente, assim as temperaturas são demonstradas na tabela 4.

Tabela 3 – Programação do termociclador para os marcadores utilizados.

Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
94 °C /5 min	94°C /45seg	Temp. /45seg	72°C /45seg	72°C /10min
35 ciclos				

Tabela 4 – Marcadores microssatélite, temperatura de anelamento e respectivos tamanhos.

Marcador	Temperatura de anelamento	Tamanho (pb)
SOT12	59°C	172
SOT11	56°C	203
SOT10	60°C	148
SOT1	59°C	226
SOT13	61°C	216
SOT17	60°C	201

O Produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 2,0%, na condição de corrida de 100 volts por 30 minutos, corado com brometo de etídeo e analisado sob luz ultravioleta. Além disso, foi utilizado um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100 pb como referência.

Tabela 5 – Sequência de Primers para os marcadores microssatélites da região 5q35 e suas posições em relação ao gene NSD1*

Marcador	Posição em relação ao gene NSD1 (kb)	Sequência dos Primers (5' → 3')		Tamanho (pb)
		Forward	Reverse	
SOT12	645 cen	GATAAACCACAACCCCAACC	ACGTAGCTAGGCACCACCAT	172
SOT11	391 cen	CAGGCTCGTTCATTCACAAA	AGGCAAAATTTCTCCCATC	203
SOT10	383 cen	GACTGCAAGGAGCTTGAACC	GGGCCACCATACTTGTTC	148
SOT1	181 cen	GGGAAAGTTGACAGGATTTGA	GCAAATAGGGCATCTGCAAG	226
SOT4	26 cen	GGTCCTCCACACATTCTGCT	ACATGCCCTATGACCTGGAA	201
SOT3	Intra	GCACCGTTTACAGTCCTACTT	CTGCAGTGAGCCAAGACCAT	216
SOT17	Intra	GGCATTGTTCTGGATGAGA	GGAGATGGATGTTGCAGTGA	201
SOT19	284 tel	CCCCTTTGTATGGGGTCTTT	CCTGGGTGACACAGTGAGACT	201
SOT20	290 tel	CCAGTTCATCCAAGACACA	CATTGATCCAGAAATCCCACT	267

*Modificado de DOUGLAS, J. et.al., 2003

3.5.2.2 Polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP)

A técnica de SSCP, geralmente utilizada para a realização de “*screening*” de mutações gênicas, neste caso não foi utilizada com esta função, mas sim por sua capacidade de detectar pequenas diferenças entre os alelos. Essa técnica se baseia no princípio de que a mobilidade de um fragmento de DNA de fita simples em gel de poliacrilamida desnaturante depende de seu tamanho, de sua sequência de nucleotídeos e da temperatura de corrida. Assim, uma diferença de apenas um par de bases entre dois fragmentos de DNA pode ser detectada pela presença de bandas com migração diferente em gel desnaturante (ORITA, 1989).

Assim, para o preparo do gel de poliacrilamida houve a necessidade se preparar previamente as placas de vidro e de soluções. Esse processo obedeceu as seguintes etapas:

a) Tratamento das placas: as placas de vidro (uma maior de 20x36cm e outra menor de 20x33cm) foram descontaminadas em solução de NaOH 3M por 24

horas e lavadas com detergente neutro e água destilada. Após a lavagem estas permaneceram secando e em seguida foram limpas com papel toalha embebido em etanol 70%.

b) Uma vez limpa, as placas receberam tratamentos diferenciados. A placa de menor tamanho recebeu um tratamento para que o gel permanecesse fixado na sua superfície e para isso foi aplicado uma solução “Bind-Silane” (3µl de *Bind-Silane*, 1 ml de etanol absoluto e 5µl de ácido acético glacial). Com auxílio do papel toalha essa solução é espalhada sobre a placa e deixando-a secar por 5 minutos, em seguida é lavada com etanol 70% para a remoção do excesso. Já a placa de maior tamanho recebeu um tratamento para que o gel não aderisse na sua superfície e para isso foi aplicado, com o auxílio de papel toalha, 0,5 ml de óleo de silicone. Esse produto permaneceu secando por 5 minutos e em seguida a placa foi lavada com água destilada para a retirada do excesso do produto. Já preparadas, essas placas foram encaixadas e montadas de forma apropriada para receber o gel de poliacrilamida.

c) A preparação do gel de poliacrilamida 6% desnaturante obedeceu ao seguinte protocolo: Bis-Acrilamida 40% (19:1), Uréia, TBE 10X, Persulfato de amônia 10% (APS), TEMED e água Milli-Q. É importante salientarmos que o TEMED e o persulfato de sódio foram adicionados por último, pois são responsáveis por catalisar o processo de polimerização.

Cumprida estas etapas, a placa contendo o gel polimerizado foi devidamente encaixada no suporte da cuba de eletroforese vertical (Modelo SA, Gibco BRL Sequencing System). Adicionou-se aos compartimentos da cuba tampão de corrida (TBE 1X) e iniciou-se uma pré-corrída por 30 minutos a 25 Watts com o objetivo de aquecer e ordenar a malha poliacrilamida. Concomitantemente, os produtos de PCR amplificados foram desnaturados a 94 °C por 5 minutos. Em seguida 3,5µl de amostra

foram aplicados no gel obedecendo ao tempo de corrida e a voltagem conforme a tabela 6. A essas amostras também é aplicado um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb.

Tabela 6 - Tempo de corrida eletroforese em gel de poliacrilamida 6% desnaturante para diferentes tamanhos de fragmentos.

Tamanho do fragmento	Tempo mínimo de corrida (horas)	Tempo máximo de corrida (horas)	Voltagem
até 120 pb	1	2,5	25 W
120- 150pb	1 ½	3,5	
150-175pb	2	4	
175-200pb	2 ½	4,5	
200-250pb	3	5	
250-300	3 ½	5,5	

Finalmente o gel foi revelado com nitrato de prata seguindo o protocolo descrito por Budwole e cols (1991) e assim resumido:

Fixação do gel: solução de etanol 10% (200ml de etanol 100% e 1,8 L de água Milli-Q), por cerca de 8 minutos.

Oxidação do gel: solução de ácido nítrico 1% (20 ml de ácido nítrico e 1,98 L de água Milli-Q), por cerca de 3 minutos.

Impregnação: solução de nitrato de prata (2g de nitrato de prata, 3 ml de formaldeído 37% e 2 L de água Milli-Q) por cerca de 30 minutos.

Revelação: solução de carbonato de sódio a 4°C (60g de carbonato de sódio, 3 ml de formaldeído 37% e 2 L de água Milli-Q), tempo necessário para o aparecimento das bandas.

Interrupção: solução de ácido acético (200 ml de ácido acético glacial e 1,8 L de água Milli-Q), por cerca de 30 segundos.

Lavagem: a placa é mergulhada em água destilada por 1 minuto aproximadamente para a retirada do excesso de solução. Uma vez seca, a placa contendo o gel, está pronta para ser fotodocumentada e genotipada.

3.5.2.3. Genotipagem

Neste estudo, a ausência de uma banda na amostra do probando (nos casos dos marcadores microssatélites polimórficos), permite concluir que o segmento, contendo o alelo em questão, não está presente e, portanto, microdeletado (Figura 5). Assim, o objetivo principal desse trabalho foi de comparar os alelos intrafamiliares e não entre os núcleos familiares, permitindo desta forma que os géis de poliacrilamida apresentassem pequenas variações sem que análise de microdeleções fosse prejudicada.

A interpretação do gel de poliacrilamida foi realizada numerando as bandas em ordem decrescente de peso molecular, nos mostrando dessa forma o número de polimorfismos e em que pacientes eles estão presentes ou ausente (deletados) figura 5.

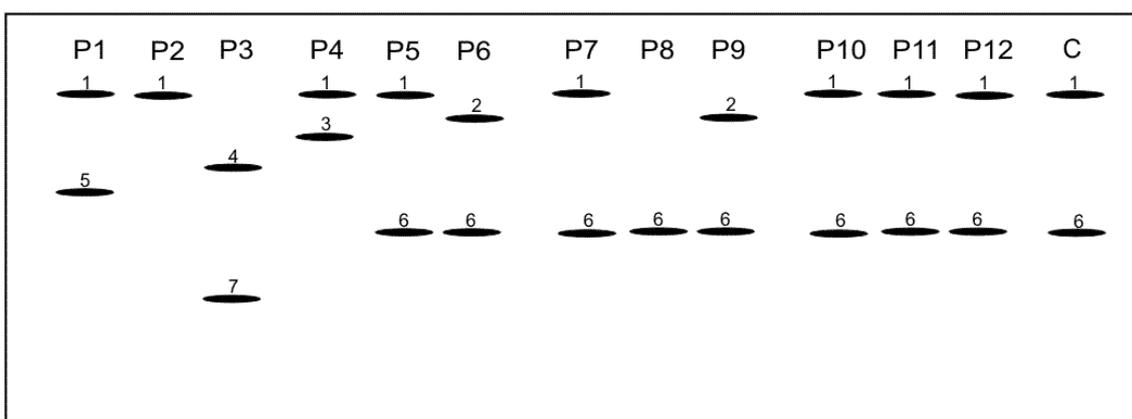


Figura 5. Esquema mostrando gel de eletroforese em poliacrilamida, após PCR, no qual pode se observar o controle (C), mãe do probando (P1), probando (P2) e pai do probando (P3), neste caso o probando apresenta a microdeleção e mãe do probando (P4), probando (P5) e pai do probando (P6), não apresentando a microdeleção. Os núcleos familiares (P7, P8 e P9) e (P10, P11 e P12) são exemplos de situações não informativas.

3.5.3. Análise dos exons dos genes NSD1 e PTEN através do sequenciamento direto

A análise dos exons dos genes NSD1 e PTEN através de sequenciamento direto foi realizada em 27 probandos e 6 controles afim de encontrar alterações patogênicas que podem estar diretamente ou indiretamente ligadas aos padrões fenotípicos das síndromes macrossômicas. Os 6 controles não poderiam apresentar qualquer anormalidade presente no protocolo de avaliação médica, assim foi aplicado o PA em seis alunos de pós-graduação do curso de Ciências Biológicas:- A/C Genética e os mesmos foram incluídos no estudo após consentimento.

Esta análise seguiu as seguintes etapas:

3.5.3.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA extraídas segundo a técnica descrita no item 3.5.1. foram submetidas à PCR.

Foram utilizados, para o gene NSD1 os iniciadores específicos que flanqueiam os éxons de 2 a 23, delineados por Rio et al. (2003) e os éxons de 1 a 9 do gene PTEN, o qual delineamos utilizando o software on line *Primer3* <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi>.

Cada reação de PCR (com volume total de 10µl) continha: 40ng de DNA, 200mM de cada dinucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), 20µM de cada iniciador específico; 10mM de Tris-HCl pH8.3; 50mM KCl; 1.5mM de MgCl₂; 0,001% de gelatina; 0,5µl de DMSO e 1 unidade (U) de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen). As amplificações *in vitro* foram realizadas no termociclador da MJ Research PT200 seguindo, para ambos os genes, o programa descrito por Rio et al. (2003), que já havia

sido utilizado para análise de MP (tabela 3). As temperaturas de anelamento de cada iniciador foram atingidas realizando-se testes com PCRs com temperaturas de anelamento gradiente, quando não foi atingido uma concentração de produto de PCR satisfatória (demonstrada pela qualidade das bandas no gel de agarose 2%) foi modificada a concentração de $MgCl_2$ e DMSO das reações.

O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 2,0%, na condição de corrida de 100 volts por 30 minutos, corado com brometo de etídeo e analisado sob luz ultravioleta. Além disso, foi utilizado um marcador de peso molecular (*ladder*) de 100pb como referência.

3.5.3.2. Seqüenciamento automático

Esta etapa do estudo foi realizada nos laboratórios de pesquisa do Hemocentro da USP - Campus Ribeirão Preto em colaboração com o professor Wilson Araujo Silva Jr.

O produto de PCR purificado foi amplificado pela PCR com os mesmos iniciadores específicos descritos anteriormente, mas na reação de seqüenciamento foi utilizado somente o iniciador no sentido 3'→5', ou seja o iniciador “reverse”.

O processo de seqüenciamento das amostras foi realizado seguindo as etapas seguintes:

a) Reação de seqüenciamento:

Para volume final de 10ul foi adicionado 4,7ul de água ultrapura autoclavada, 4ul de iniciador ET (DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit by Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), 0,8 ul de iniciador “reverse” e 0,5 ul de produto de PCR. O programa da reação de seqüenciamento esta descrito na tabela 7.

TABELA 7 – Programação do termociclador para a reação de seqüenciamento.

Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão
95 °C /2 seg	95°C /10seg	51°C /15seg	60°C /60 seg
35 ciclos			

b) Reação de Precipitação:

Para a precipitação dos produtos da reação de seqüenciamento seguiram-se os seguintes passos: foi adicionado 1ul de acetato de amônio, foram adicionados 27,5 ul de etanol absoluto à temperatura ambiente, aplicou-se no vortex e colocou-se em repouso no gelo por 20 minutos. Ao final do tempo de repouso centrifugou-se a 3250RPM durante 30 minutos e o sobrenadante foi desprezado, acrescentou-se 100ul de etanol 70% à temperatura ambiente, centrifugou-se a 3250RPM durante 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Centrifugo-se a placa invertida por alguns segundos, adicionou-se 10ul de Loading Buffer em cada poço e aplicou-se no vortex, por fim centrifugou-se rapidamente para retirada de bolhas.

c) Injeção no gel de seqüenciamento

O Seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático MegaBAceTM1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). As amostras foram injetadas no gel a 2kv por 80 segundos e o a voltagem de corrida foi de 9kv por 150 minutos.

d) Análise do seqüenciamento direto

As seqüências obtidas das amostras utilizadas foram comparadas com seqüências consenso utilizando o programa de computador PolyPhred (<http://droog.mbt.washington.edu/PolyPhred.html>). O programa PolyPhred utiliza conjuntamente o PHRED (para nomear a base e caracterizar dos picos), PHRAP e CONSED (para examinar, editar e anotar dos resultados).

Resultados

4.1. ANÁLISE CLÍNICA

Foram incluídas, neste estudo 26 famílias, contendo 27 probandos, sendo 13 do sexo masculino e 14 do sexo feminino, 17 casos apresentam trio familiar completo (mãe, pai e filho) e em 10 deles, não foi possível coletar amostra de sangue de um dos genitores devido ao fato de não estarem disponível para a coleta de material biológico.

A caracterização clínica dos pacientes foi realizada através do protocolo clínico desenvolvido para este estudo e esta apresentada nas tabelas 11, 12, 13, 14. O diagnóstico clínico dos pacientes esta apresentado tabela 8.

Tabela 8. Diagnóstico clínico dos pacientes.

	Grupos	Número de casos	Observações
I	Síndrome de Sotos	15	
II	Síndrome de Weaver	5	
III	Demais Macrossomias	7	síndrome de Beckwith-Wiedemann (2 Casos) síndrome Bannayan-Zonana (2 casos) macrossomia não definida (3 casos)

GRUPO 1 – síndrome de Sotos

A SS foi diagnosticada em 15 pacientes estudados. A proporção sexual foi de 1H:1,3M e a média de idade dos pacientes foi de 8,8 a (+/- 5a). As principais características dos probandos constam da tabela 9.

Tabela 9. Principais características dos pacientes com síndrome de Sotos da presente casuística e da literatura.

Sinais Clínicos	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 7	Caso 8	Caso 11	Caso 13	Caso 14	Caso 15	Caso 21	Caso 22	Caso 23	Caso 24	Caso 25	Frequência %	Frequência* %
Crescimento																	
Peso elevado ao nascimento	-	+	?	-	+	-	?	-	+	-	-	+	+	+	+	53	84
Crescimento superior ao normal – alta estatura	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	93	97
Idade óssea avançada em relação à idade	+	+	-	+	+	-	?	+	-	?	+	?	?	?	+	70	79
Mãos e pés grandes	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	80	83
Desenvolvimento																	
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	84
Coordenação motora fina comprometida	+	+	?	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	92	72
Dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal	+	-	-	?	?	+	-	?	+	-	+	?	-	-	+	45	44

* Morretti-Ferreira, 1995; Cohen, 2002; Rimoin et al. 2002

Tabela 9. Principais características dos pacientes com síndrome de Sotos da presente casuística e da literatura. (Continuação)

Sinais Clínicos	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 7	Caso 8	Caso 11	Caso 13	Caso 14	Caso 15	Caso 21	Caso 22	Caso 23	Caso 24	Caso 25	Frequência %	Frequência* %
Craniofacial																	
Macrocrania	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	90
Dolicocefalia	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	80	85
Implantação do cabelo na região frontal elevada	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	73	94
Frontal saliente e largo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	96
Hipertelorismo ocular	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	60	92
Fendas palpebrais para baixo	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	80	65
Mento saliente	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	93	79
Palato alto e arqueado	+	+	?	+	+	+	?	+	+	+	+	+	-	-	+	78	96
Erupção prematura dos dentes	+	-	?	?	?	?	?	?	-	+	-	?	-	-	-	25	57

* Morretti-Ferreira, 1995; Cohen, 2002; Rimoin et al. 2002

GRUPO 2 – síndrome de Weaver

No grupo 2, onde estão incluídos os pacientes diagnosticados com SW foram incluídos 5 pacientes. A proporção sexual foi de 1H:1,5M e a média de idade dos pacientes foi de 8a (+/- 4a). As principais características dos probandos constam da tabela 10.

Tabela 10. Principais características dos pacientes com síndrome de Weaver da presente casuística e da literatura.

Sinais Clínicos	Caso 9	Caso 10	Caso 16	Caso 19	Caso 20	Frequência* %
Crescimento						
Crescimento prenatal excessivo – alta estatura ao nascimento	+	+	+	-	-	80
Crescimento posnatal excessivo – alta estatura pós-natal	+	+	+	+	+	85
Idade óssea avançada em relação à idade	+	+	+	+	+	100
Desenvolvimento						
Hipertonia	-	-	-	-	-	55
Hipotonia	+	+	+	+	+	27
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	+	+	+	+	+	100
Choro rouco e grave	-	?	-	?	-	82
Craniofacial						
Frontal saliente e largo	-	+	+	+	+	94
Região occipital achatada	-	+	+	+	-	54
Orelhas grandes	+	-	-	+	+	88
Hipertelorismo ocular	-	+	-	-	-	100
Filtro longo ou proeminente	-	-	-	-	-	71
Micrognatia relativa	+	+	-	+	+	89

* Morretti-Ferreira, 1995; Cohen, 2002; Rimoin et al. 2002

Tabela 10. Principais características dos pacientes com síndrome de Weaver da presente casuística e da literatura. (*continuação*)

Sinais Clínicos	Caso 9	Caso 10	Caso 16	Caso 19	Caso 20	Frequência* %
Membros						
Camptodactilia	-	-	-	-	-	68
'Pads' digitais proeminentes	-	-	-	?	-	66
Unhas finas, bastante convexas e encravadas	-	+	-	+	-	90
Polegares alargados	-	+	-	-	-	66
Clinodactilia em artelhos	-	-	-	+	+	80
Extensão reduzida de cotovelo ou joelho	-	-	-	?	-	76
Ossos longos com porção distal alargada	+	+	?	?	-	88
Deformidade em pés: em varo, em valgo, metatarso aduzido	+	+	+	+	-	70
Outros						
Pele redundante e frouxa	-	-	-	+	+	91
Hérnia umbilical ou diástese de retos abdominais	-	-	-	?	-	70
Hérnia inguinal	-	-	-	?	-	28
Mamilos invertidos	-	-	+	?	-	75

* Morretti-Ferreira, 1995; Cohen, 2002; Rimoin et al. 2002

Grupo 3 – Demais Macrossomias

O grupo 3 foi composto dos pacientes com outras síndromes macrossômicas e de pacientes sem diagnóstico definido. Neste grupo foram incluídos 2 pacientes com a SBW, 2 pacientes com a SBZ e 3 pacientes com macrossomias indefinidas.

Os pacientes com SBW apresentavam a proporção sexual de 1H:1M e a média de idade de 1,9a (+/- 1,2a). Já os dois pacientes que apresentavam a SBZ eram do sexo masculino e foram diagnosticados mais tardiamente com média de idade de 12,4a (+/- 1,3a). Quanto aos pacientes que apresentavam síndromes macrossômicas indefinido, estes apresentavam proporção sexual de 2H:3M e média de idade de 7,7a (+/- 4,3a). As principais características dos probandos esta na tabela 11 e 12.

Tabela 11. Principais características dos pacientes com síndrome de Beckwith-Wiedemann da presente casuística e da literatura.

Sinais Clínicos	Caso 6	Caso 26	Frequência* %
Um ou mais membros da família com diagnóstico clínico de SBW ou história de aspectos sugestivos para SBW	+	-	
Crescimento			
Macrossomia	+	+	33
Prematuridade	+	+	
Idade óssea avançada em relação à idade	+	?	21
Tumor embrionário: Tumor de Wilms, Hepatoblastoma, Rabdomiosarcoma	?	-	
Desenvolvimento			
Polidramnio	-	-	
Hipoglicemia neonatal	?	+	30
Craniofaciais			
Macroglossia			82
Fenda de palato	-	-	
Fácie característica: hipoplasia de face média e prega em região de pálpebra inferior	+	+	
Sulcos na parte anterior do lóbulo da orelha / pits em região posterior de hélice	+	-	38

* Morretti-Ferreira, 1995; Cohen, 2002; Rimoin et al. 2002

Tabela 11. Principais características dos pacientes com síndrome de Beckwith-Wiedemann da presente casuística e da literatura.
(Continuação)

Sinais Clínicos	Caso 6	Caso 26	Frequência* %
Órgãos Internos			
Hemihiperplasia definida como crescimento assimétrico de regiões do corpo	-	+	13
Córtex adrenal com células gigantes a histologia	?	-	
Anormalidades renais incluindo anormalidade estrutural, nefromegalia; nefrocalcinose	-	-	23
Onfalocele ou hérnia umbilical	-	+	75
Diástese de retos abdominais	+	-	
Visceromegalia	+	+	23
Malformações vasculares de aspecto capilar	+	-	16
Cardiomegalia / anomalia cardíaca estrutural / raramente cardiomiopatia	-	-	16
Pele			
Nevos hemangiomaso plano em face	+	+	
Gemelaridade monozigótica	-	-	

* Morretti-Ferreira, 1995; Cohen, 2002; Rimoin et al. 2002

Tabela 12. Principais características dos pacientes com síndrome de Bannayan-Zonana da presente casuística..

Sinais Clínicos	Caso 17	Caso 25
Crescimento		
Alta estatura ao nascimento	-	+
Altura de adulto normal	-	+
Peso de nascimento maior que 4 Kg	-	+
Craniofacial		
Macrocefalia	+	+
Fissuras palpebrais inclinadas para baixo	+	-
Pseudopalpiloedema	?	-
Corpo caloso alargado a neuroimagem	?	-
Estrabismo	?	+
Tórax/Abdômen		
Mamilos supra-numerários	-	-
Pele		
Acantose nigrans	-	+
Máculas café-com-leite em pele	-	+
Angioqueratoma	-	?
Máculas	+	?

Tabela 12. Principais características dos pacientes com síndrome de Bannayan-Zonana da presente casuística. (*continuação*)

Sinais Clínicos	Caso 17	Caso 25
Orgãos Internos		
Pólipos hamartomatosos em cólon	?	
Intussuscepção intestinal	-	?
Sangramento retal	-	-
Pólipos hamartomatosos no íleo	-	-
Lipomas	-	?
Hemangiomas	-	-
Tireoidite de Hashimoto	?	-
Tumor tireoidiano de células foliculares	?	-
Meningiomas	-	?
Genitália		
Hipercrôminas em glândula ou no pênis Hipotonia	+	-
Neurológicos		
Convulsões	-	+
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	?	+
Atraso no desenvolvimento da fala	-	+
Retardo mental leve ou moderado	-	+

Alguns pacientes, no momento da avaliação, alguns casos não apresentavam macrossomia. Estes casos foram incluídos no estudo por apresentarem macrossomia em outros momentos de seu desenvolvimento, como ao nascimento, este fato pode ser analisado por cartões de nascimento ou cartões médicos que continham informações de outras fases do desenvolvimento do pacientes. Outros casos, não se apresentavam acima do normal em todos os tópicos (crescimento, peso e perímetro cefálico), mas sim apenas um deles, estes fatores somados a outros sinais clínicos característicos de síndromes macrossômicas incluíam estes casos em nosso grupo de estudo.

4.2 ANÁLISE DE MICRODELEÇÕES

A triagem de microdeleções no gene NSD1 foi realizada em 16 núcleos familiares a fim de pesquisar uma herança não balanceada na região cromossômica do gene NSD1. Dos 27 casos estudados, 10 não apresentavam núcleo familiar completo (mãe, probando e pai), não sendo possível a análise de microdeleções por microssatélites nestes casos. Cabe explicar que o estudo analisou 26 núcleos familiares que continham 27 probandos, pois um dos núcleos familiares apresentou gemelaridade.

A metodologia sugerida por Douglas *et al.* (2003), incluía 9 marcadores microssatélites polimórficos (MP) dentro e ao redor do NSD1, mas neste estudo foi possível a utilização de apenas 6 destes marcadores, pois 3 deles apresentaram problemas de amplificação não sendo possível a realização das análises.

Não foram encontradas microdeleções em nenhum dos 17 probandos.

Cada marcador molecular foi analisado em todas as 16 famílias disponíveis e para isso necessitou de pelo menos 3 géis de poliacrilamida nomeados em *a*, *b* e *c*. Assim, em cada gel, as famílias foram genotipadas e enumeradas de acordo com seu peso molecular obtendo ao final da análise um número de alelos específico para o gel analisado.

Desta forma, uma vez os géis nomeados e genotipados foi possível numerar os alelos e inserir estes dados no heredogramas familiares (figura 7), obedecendo a ordem dos marcadores conforme proposto. Assim, por exemplo, para a família 1, marcador SOT 1 e gel *a*, a mãe apresentou os alelos 6,8 – *a*; o probando, 3,6 – *a* e o pai, 3,6 – *a*. Este esquema de análise, possibilita correlacionar o heredograma estudado e o gel em que as famílias foram analisadas.

Os alelos encontrados nos indivíduos das 16 famílias com macrosomias assim como seus respectivos heredogramas estão demonstrados na figura 12 e a fotodocumentação dos géis esta apresentada no Anexo IV: Resultados moleculares.

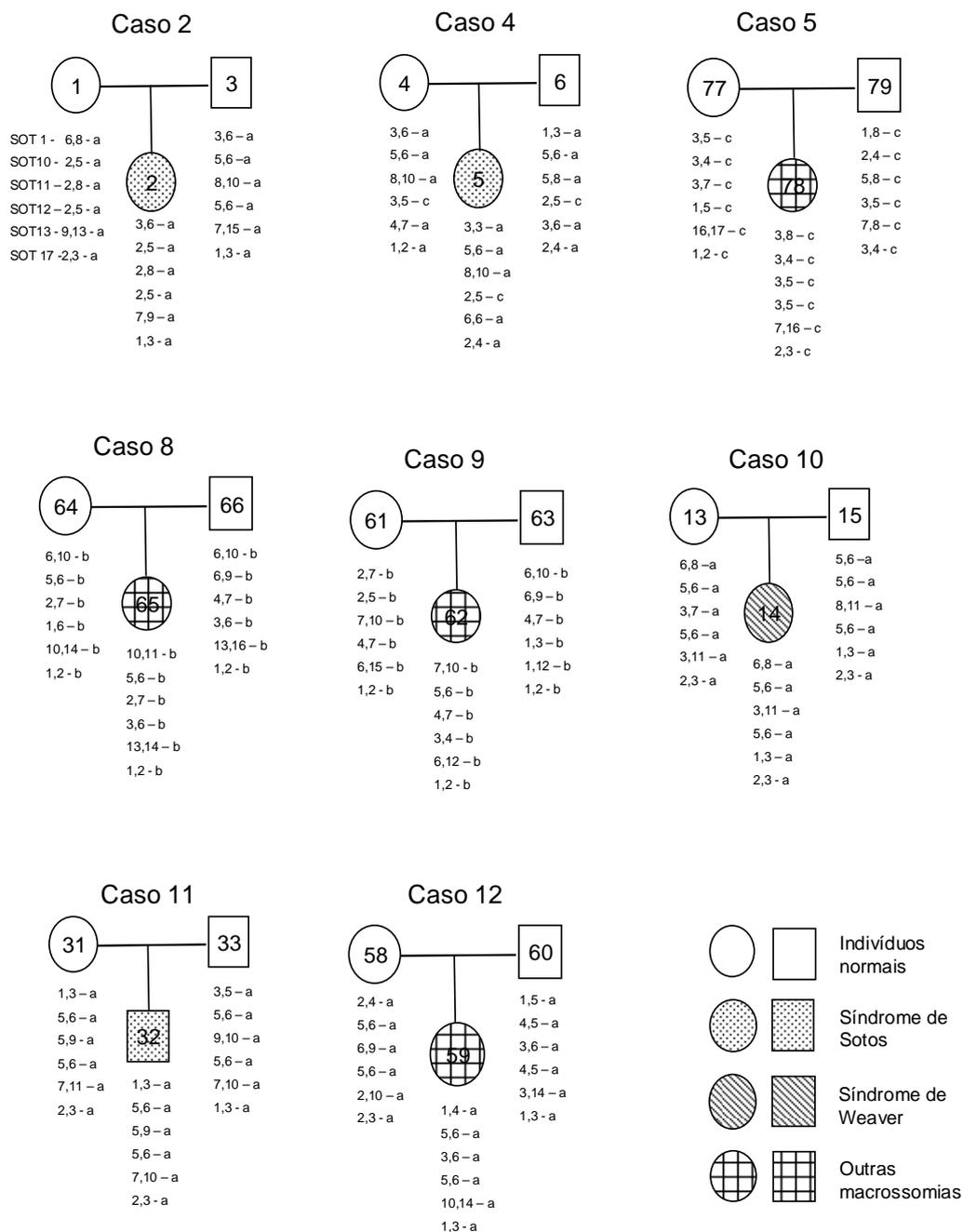
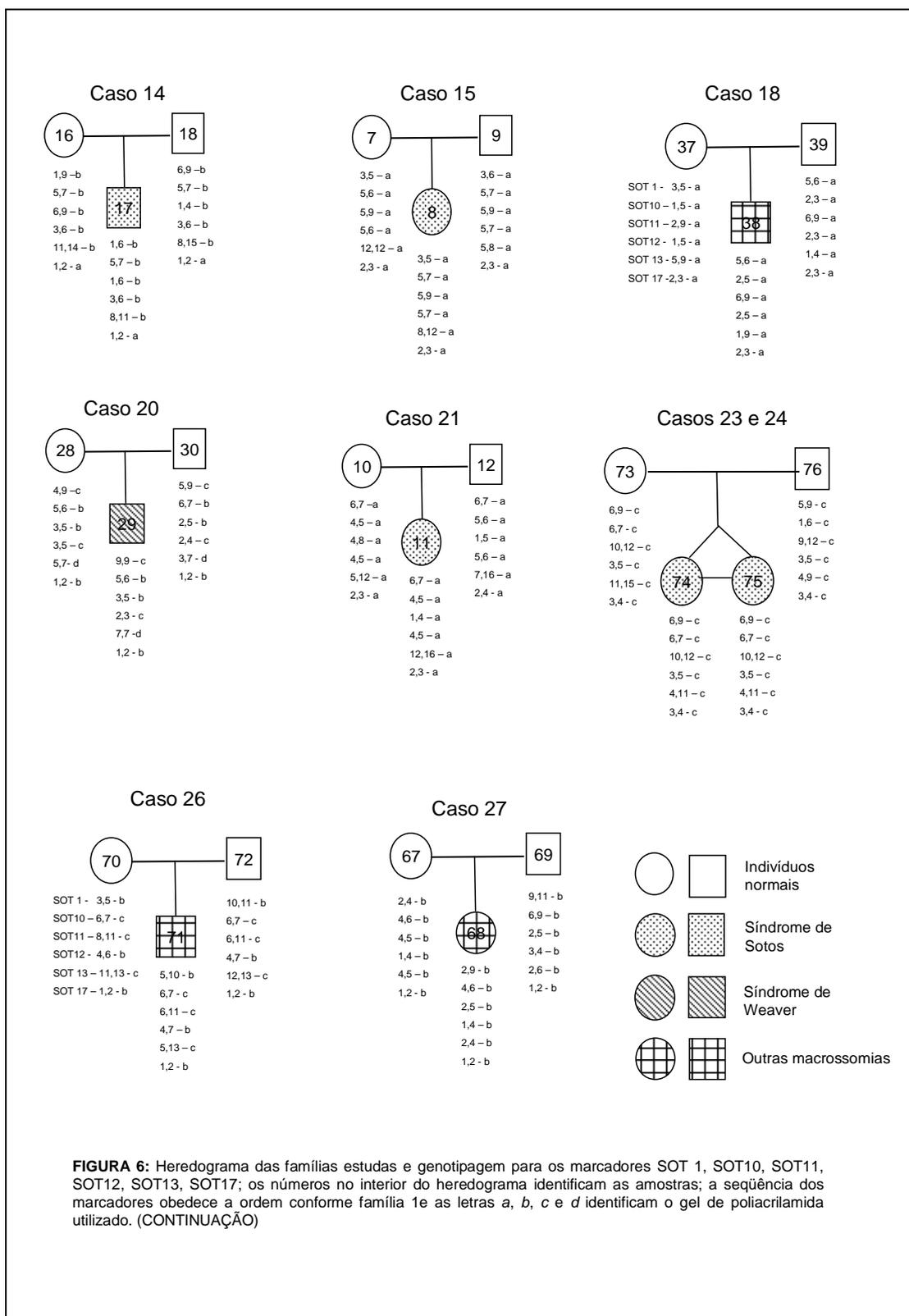


FIGURA 6: Heredograma das famílias estudadas e genotipagem para os marcadores SOT 1, SOT10, SOT11, SOT12, SOT13, SOT17; os números no interior do heredograma identificam as amostras; a seqüência dos marcadores obedece a ordem conforme família 1 e as letras a, b, c e d identificam o gel de poliacrilamida utilizado.



4.3. ANÁLISE DOS EXONS DOS GENES NSD1 E PTEN ATRAVÉS DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO

No presente estudo, foram seqüenciados 70 % do gene NSD1 e 80% do gene PTEN em 27 probandos que apresentaram hipótese diagnóstica ou diagnóstico para síndrome macrossômicas. Após, o seqüenciamento direto e análise pelos conjunto de softwares Phred/Phrap/Consed foram encontradas 10 mutações em 12 pacientes distintos para o gene NSD1 e 1 mutação em apenas 1 paciente para o gene PTEN

Foram utilizados, para o gene NSD1 os iniciadores específicos que flanqueiam os éxons de 2 a 23, delineados por Rio et al. (2003) e os éxons de 1 a 9 do gene PTEN, o qual delineamos utilizando o software on line *Primer3* <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi>. As temperaturas de anelamento de cada iniciador foram atingidas realizando-se testes com PCRs com temperaturas de anelamento gradiente, quando não foi atingido uma concentração de produto de PCR satisfatória (demonstrada pela qualidade das bandas no gel de agarose 2%) foi modificada a concentração de MgCl₂ e DMSO das reações. Apesar das modificações nos protocolos de PCR não foi possível realizar o seqüenciamento em todos os exons dos genes NSD1 e PTEN, pois em alguns casos (cerca de 30% do gene NSD1 e 20% no gene PTEN) a PCR ou não produzia concentração de DNA suficiente ou não havia amplificação da seqüência alvo. Nestes casos as condições da PCR foram alteradas, na tentativa de otimizar a PCR, mas isto não ocorreu. Em outros casos a PCR apresentava inúmeras “bandas” inespecífica, quando visualizadas no gel de agarose, mais uma vez as condições de PCR foram alteradas, mas não houve sucesso. Nestes casos, foi utilizado produtos que tem por objetivo a purificação do produto de PCR (ExoSap-IT – USB corporation), mas também não obteve-se resultados satisfatórios. para a reação de sequenciamento ou produzia inúmeras bandas inespecíficas. As

condições de PCR e quais iniciadores apresentaram resultados satisfatórios que permitiram o seqüenciamento, podem ser observadas na tabela 13.

Tabela 13. Padronização das condições das PCRs dos jogos de *primer* dos genes NSD1 e PTEN

Nome	Forward	Reverse	Temperatura Padrão	Volume de MgCl ₂ (ul)	Adição de DMSO (1,5 ul)	Seqüenciamento Possível
NSD1 2A	57	54,7	55	1,00	Não	Sim
NSD1 2B	53,6	57	55	0,75	Não	Sim
NSD1 2C	54,6	52,6	54	0,75	Não	Sim
NSD1 2D	54,2	54,2	54	0,75	Não	Sim
NSD1 3	53,1	51,7	52	1,25	Não	Sim
NSD1 4	54,3	54,8	54	0,75	Não	Sim
NSD1 5A	52,4	53,8	53	1,50	Sim	Sim
NSD1 5B	53,8	52,4	53	0,75	Não	Não
NSD1 5C	56,5	52,4	55	1,25	Não	Sim
NSD1 5D	53,2	54,9	54	0,75	Não	Sim
NSD1 5E	53,3	57,3	55	0,75	Não	Não
NSD1 5F	55,6	56,9	56	1,50	Sim	Sim
NSD1 5G	52,4	54,8	53	0,75	Não	Sim
NSD1 5H	56,8	55,2	56	1,50	Sim	Sim
NSD1 5I	52,1	53,5	53	0,75	Não	Não
NSD1 5J	52,1	56,7	55	0,75	Não	Não
NSD1 5K	51,6	47,3	50	0,75	Não	Sim
NSD1 6	54,3	49,8	52	1,00	Não	Sim
NSD1 7	54,3	54	52	0,75	Não	Sim
NSD1 8	52,3	53,4	53	0,75	Não	Sim
NSD1 9	55,5	57,8	56	1,50	Sim	Não
NSD1 10	52,7	56	55	0,75	Não	Não
NSD1 11	54,9	55,6	55	0,75	Não	Sim
NSD1 12	56,3	53,5	55	1,00	Não	Sim
NSD1 13	54,1	53,3	53	0,75	Não	Sim
NSD1 14	52	54,2	53	0,75	Não	Sim
NSD1 15	55,1	56,9	56	0,75	Não	Sim
NSD1 16	51,1	54	51	1,50	Sim	Sim
NSD1 17	52	57,7	55	0,75	Não	Sim
NSD1 18	55,2	54,6	56	0,75	Não	Sim
NSD1 19	57,8	54,5	56	0,75	Não	Sim
NSD1 20	53,7	54,2	54	0,75	Não	Sim
NSD1 21	54,5	57,3	55	1,00	Não	Não
NSD1 22	54,9	55,6	54	0,75	Não	Sim
NSD1 23A	57,4	55,4	56	0,75	Não	Não
NSD1 23B	55,9	56,6	56	0,75	Não	Sim
NSD1 23C	52,9	56,3	56	0,75	Não	Sim
NSD1 23D	55,9	56,1	56	0,75	Não	Não
NSD1 23E	56,5	57,3	56	1,50	Sim	Sim
NSD1 23F	53,7	54,7	54	0,75	Não	Não
PTEN 1	54,3	54,8	52	1,50	Sim	Sim
PTEN 2	53,3	55,9	54	0,75	Não	Sim
PTEN 3	51,2	55,4	54	0,75	Não	Sim
PTEN 4	51,7	51,5	52	1,50	Sim	Não
PTEN 5	50,8	54,5	52	1,50	Sim	Sim
PTEN 6	56,6	52,3	54	0,75	Não	Sim
PTEN 7	53,2	55,3	54	0,75	Não	Sim
PTEN 8	53,3	54,9	54	0,75	Não	Sim
PTEN 9	53,3	53,6	54	0,75	Não	Não

As mutações encontradas estão descritas e caracterizadas na tabela 14 e nas figuras 7 e 8. A apresentação dos eletroferogramas de cada mutação consta do Anexo V: Resultados moleculares.

Tabela 14. Mutações encontradas nos genes NSD1 e PTEN.

Mutação	Mudança na Proteína	Exon	Paciente	Grupo Fenotípico
Gene NSD1				
23C→A	P8Q	2	26	3
210-11insT	frameshift	2	6	3
943A→G	K316E	3	18	3
1128C→A	A377A	4	5 1	3 1
1157T→A	F387Y	4	5	3
1178delA	frameshift	4	3	1
2690-91insG	frameshift	5	8	1
3607-08insG	frameshift	5	2	1
3693delG	frameshift	5	13	1
			23	1
			20	2
			8	1
4305-06insA	frameshift	9	4	1
Gene Pten				
1972-73insG	frameshift	7	11	1

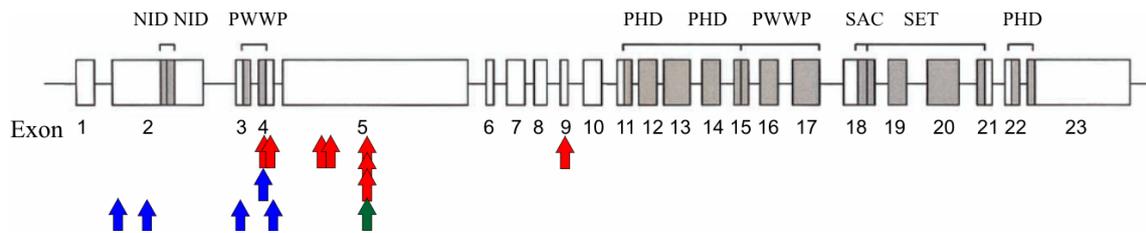


Figura 7. Representação esquemática do gene NSD1, seus domínios (cinza) e as mutações encontradas neste estudo. Mutações encontradas em pacientes do grupo 1 – síndrome de Sotos (vermelho), mutações encontradas no grupo 2 – síndrome de Weaver (verde) e mutações encontradas no grupo 3 – demais macrossomias (azul).

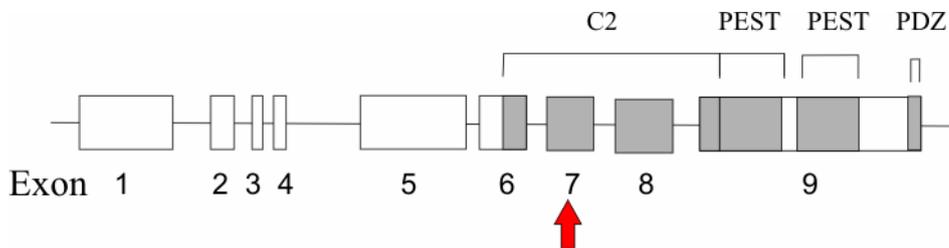


Figura 8. Representação esquemática do gene PTEN, seus domínios (cinza) e a mutação encontradas no grupo 1 – síndrome de Sotos (vermelho).

Discussão

No presente estudo, foram incluídos 26 núcleos familiares que continham 27 probandos e diagnóstico para síndromes macrossômicas. Deste grupo amostral, 15 são trios completos (mãe, probando, pai), 1 núcleo familiar com mãe, probandos (gêmeos monozigóticos) e pai e dez são núcleos familiares incompletos com a ausência de mãe, pai ou ambos.

Foi realizada análise clínica em 27 pacientes que apresentaram 4 síndromes macrossômicas diferentes e foram classificados em 3 grupos distintos, grupo 1 – síndrome de Sotos (15), grupo 2 - síndrome de Weaver (5) e grupo 3 – Demais síndromes macrossômicas: síndrome de Beckwith-wiedemann (2) e síndrome de Bannayan-Zonana (2), além de 3 pacientes que apresentavam características macrossômicas mas não apresentavam um definido. Os pacientes foram encaminhados ao nosso serviço por apresentarem dificuldades escolares crescimento excessivo e, em alguns casos, dismorfologia.

A análise clínica, dos pacientes com SS (15), mostrou que nossos dados estão em acordo com a literatura, com as frequências de sinais clínicos próxima às relatadas por Türkmen et al. (2003) e Tatton-Brown et al. (2005, 2006).

No grupo amostral, do presente estudo, foram descritos 5 pacientes com SW, a análise dos dados obtidos através da análise clínica, nos mostrou que estes pacientes apresentam a frequência de sinais clínicos próxima as relatadas por Morretti-Ferreira (1995) e pelo estudo de Voorhoeve et al. (2002). Da mesma forma, os casos com SBW e SBZ apresentavam os sinais clínicos relatados na literatura (Graham & Rimoim, 2002; Weksberg et al. 2005)

Todos os pacientes apresentaram algum tipo de déficit cognitivo, que não foi medido. Dos casos analisados, 62% dos casos apresentaram perímetro cefálico acima do percentil 98 e 74 % apresentaram estatura acima do percentil 90.

Como parte das análises moleculares realizadas foi feita a análise de microdeleções na região 5q35 em todos os pacientes, utilizando 6 marcadores microssatélite. Depois de cumprida todas as etapas laboratoriais os géis de poliacrilamida foram analisados e genotipados a fim de verificar se havia ou não microdeleção nessa região.

Assim a partir dos resultados obtidos da leitura e interpretação dos géis, foi concluído que nenhum probando das 16 famílias analisadas apresentou microdeleção na região 5q35 para os marcadores estudados, fato este que não exclui a presença de microdeleções correlacionada às síndromes macrossômicas.

Opondo-se aos resultados obtidos por Kurotaki cols. (2003) e Douglas (2003) que observaram frequências diferentes de microdeleções em pacientes japoneses com SS (52%) e europeus (5%), neste estudo não foram encontradas microdeleções utilizando a metodologia sugerida por Douglas et al. (2003). Entretanto, a metodologia sugerida por Douglas et al. (2003), apresenta os MP a uma distância relativamente grande, e este fato contribui para a não detecção de microdeleções em apenas poucos exons. Além disso, os pacientes de nossa amostra, podem apresentar mutações pontuais no gene NSD1, característica mais frequente que microdeleções em populações européias (em média 63%). Em estudo recente realizado por Fagali et al. (2006) e apresentado no 52º Congresso Brasileiro de Genética, 40 pacientes com SS foram submetidos a técnica de *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification* (MLPA), por ser mais sensível e capaz de detectar microdeleções em apenas um exon do gene. Este estudo achou uma frequência de 2/40 microdeleções em parciais no gene NSD1.

Após a realização de investigação para detectar microdeleções no gene NSD1 e em suas regiões flanqueadoras, iniciou-se análise a procura de mutações tanto no gene NSD1 quanto no gene PTEN. Além de procurar mutações, foi realizada também a

procura por marcadores de moleculares que pudessem ajudar no diagnóstico molecular das síndromes macrossômicas.

Foram seqüenciados 70 % do gene NSD1 em 27 probandos que apresentaram hipótese diagnóstica ou diagnóstico para síndrome macrossômicas. Após, o seqüenciamento direto e análise pelo conjunto de softwares Phred/Phrap/Consed foram encontradas 10 mutações em 12 pacientes distintos para o gene NSD1

Apesar de não analisar o gene NSD1 em sua totalidade, a frequência de mutações encontradas, nos pacientes com SS (50%), esta próxima aos valores relatados em estudos realizados por Douglas et al. (2003), 70% , Rio et al. (2003), 61% , Turkmen et al. (2003), 90% e Cecconi et al. (2005), 66%. Acredita-se que com o aumento do grupo amostral estudado e com a adequação das técnicas descritas por Douglas et al. (2003), este valor se torne mais próximo aos relatados nos estudos supracitados.

Das dez mutações encontradas no gene NSD1, apenas 1 delas esta localizada em um importante domínio do gene (mutação 1128C→A) o domínio PWWP-II, por ser uma alteração que não muda o aminoácido associado a proteína essa alteração não é a responsável pelo fenótipo macrossômico dos pacientes que apresentaram essa mutação (caso 1 – grupo fenotípico 1 e caso 5 – grupo fenotípico 3). Ao contrário desta alteração, o restante das mutações não estão localizadas em domínios da proteína, porém elas não são sinônimas e causam alteração na proteína. As mutações 23C→A, 943A→G e 1157T→A alteram o aminoácido original da proteína, porém deverá ser realizado estudo populacional e avaliação dos pais para a confirmação destas alterações como mutações e não como polimorfismos normais na população.

Já as mutações 210-11insT, 1178delA, 2690-91insG, 3607-08insG, 3693delG e 4305-06insA, apesar de não estarem presentes em domínios da proteína em questão, por inserirem ou deletarem apenas um nucleotídeo, geram codons de parada pelo fato de

modificarem o quadro de leitura dos codons do RNAm. Estes codons de parada não acontecem exatamente no local da mutação, mas subsequente ao local alterado. Por estas mutações estarem no início e meio da transcrição impedem que a síntese da proteína seja concluída e conseqüentemente impedem a síntese de importantes domínios como o *PHD-finger*, responsável pela ligação da proteína ao DNA e SET, responsável pela interação proteína-proteína. A alteração, ou eliminação destes dois domínios inutilizam o receptor nuclear gerado pelo gene NSD1, que se caracteriza por ser um fator regulador da transcrição gênica.

Por fim, foi seqüenciado cerca de 80% do gene PTEN em 27 probandos que apresentaram hipótese diagnóstica ou diagnóstico para síndrome macrossômicas. Após, o seqüenciamento direto e análise pelo conjunto de softwares Phred/Phrap/Consed foi encontrada 1 mutações em 1 pacientes.

A mutação encontrada estava presente no exon 6 deste gene e se caracteriza pela inserção de guanina na posição 1972-73 do DNA, esta mutação modifica o quadro de leitura neste gene e causa um códon de parada, prejudicando a síntese protéica e impossibilitando a criação dos domínios desta proteína.

Não existe relato na literatura de uma mutação neste gene em pacientes com diagnóstico de SS, este fato vem corroborar com as idéias que vários genes estão ligados com o fenótipo macrossômico. Outro estudo, desenvolvido por Baujat et al. (2004), também correlaciona outras regiões gênicas (11p15), até então ligadas ao fenótipo de Beckwith-Wiedemann, como provável etiologia para a SS. Assim, outros genes, além dos já mencionados neste e em outros estudos, devem estar ligados com a etiologia das síndromes macrossômicas, já que em nenhum dos estudos até o momento, foi possível determinar a causa destas síndromes em todos os casos estudados.

Apenas duas alterações foram relatadas em mais de um paciente, a mutação 1128C→A, que não confere alterações protéicas e desta forma não pode ser relacionada ao fenótipo macrossômico dos pacientes analisados e a mutação 3693delG. Esta mutação, localizada no exon 5, o maior dos exons do gene NSD1 e onde está relatado o maior número de mutações, causa um códon de parada 26 codons à frente do ponto mutado, assim ela impede a formação dos principais domínios do receptor nuclear gerado pelo NSD1. Um fato interessante é que ela esta presente tanto em pacientes com SS (casos 8, 13 e 23) como em um dos pacientes de SW (caso 20). Este fato corrobora com a afirmação de Baujat et al. (2005), que o que faz a dificuldade do diagnóstico das síndromes macrossômicas a grande sobreposição de sinais clinicos e mais recentemente isso pode ser demonstrado pela sobreposição molecular.

Também vale ressaltar que deve haver outros fatores gênicos causando o fenótipo macrossômico, principalmente na SS. Isso pode ser confirmando nos casos 23 e 24, que são provenientes de uma gestação com gemelaridade. O caso 23 apresenta a mutação 3693delG e o caso 24 não apresenta esta mutação. A zigozidade destes casos não foi estudada.

Em nossa amostra existiam dois pacientes com diagnóstico de Beckwith-Wiedemann (casos 6 e 26) e ambos passaram pela avaliação molecular, seja pela busca de microdeleções, seja pelo seqüenciamento direto. Corroborando com os estudos de Baujat et al. (2005) ambos apresentaram alterações no gene NSD1, não é possível apenas com estas avaliações afirmar que esta seja o fator etiológico para a síndrome em questão, assim estes pacientes irão passar por avaliação na região 11p15, classicamente ligada a esta afecção.

O não término dos estudos, nos genes propostos, ocorreu pela impossibilidade da reprodução das técnicas utilizadas por Douglas et al. (2003), na população brasileira e a não funcionalidade dos iniciadores sintetizados para os genes NSD1 e PTEN.

Algumas hipóteses podem ser sugeridas: a) os iniciadores apresentarem algum erro durante sua síntese, e desta forma deverão ser re-sintetizados; os iniciadores estarem em uma região deletada, região não detectada pela análise de microdeleções; alguns iniciadores estarem em regiões alteradas por mutação, fato este que impediria o anelamento específico dos iniciadores.

O gene PTEN, até então, não apresentou alterações nos casos 17 e 25, que apresentam diagnóstico de Bannayan-Zonana. Entretanto, um caso de SS (caso 11) apresentou a mutação 1972-73insG, que causa um códon de parada 3 codons subsequentes a alteração, gerando uma proteína truncada. São necessários mais estudos com o probando e sua família para afirmarmos que esta alteração gerou o fenótipo macrossômico, mas este dado inédito nos mostra, que outros genes podem estar envolvidos com as síndromes macrossômicas, não necessariamente diretamente, mas controlando regiões promotoras de transcrição, por exemplo. Desta forma, podem estar intimamente relacionados, gerando uma rede de controle que envolve os mecanismos de desenvolvimento, crescimento e maturação cognitiva do indivíduo.

Conclusão

As síndromes macrossômicas apresentam grande similaridade e sobreposição, quanto aos sinais clínicos e às características moleculares (JONES et al., 1994; BAUJAT et al., 2005). Uma avaliação clínica dos pacientes foi realizada e, além disso, os dois principais genes ligados às síndromes macrossômicas, NSD1 e PTEN, foram analisados.

No presente estudo foi possível descrever novas mutações que geram o fenótipo macrossômico e motivam novos estudos para verificar se estas alterações estão presentes somente na população brasileira

Não foram encontradas microdeleções no gene NSD1, entretanto foram descritas dez novas mutações neste gene. Além disso, foi descrita uma mutação no gene PTEN, que pode estar ligada à SS.

Através da análise de microssatélites polimórficos foi possível a exclusão de microdeleções que abrangem grande parte do gene NSD1, isto não excluiu a presença de microdeleções de poucos exons, que podem gerar o fenótipo macrossômico. A técnica utilizada por Fagali et al. (2006) pode ser aplicada em nossos pacientes em estudos futuros para descartar a deleção em regiões codificantes e que não foram analisadas pela técnica que utiliza microssatélites polimórficos.

Não foi possível correlacionar genótipo/fenótipo, nos casos analisados neste estudo, pois as mutações encontradas estavam localizadas em regiões bem próximas uma das outras e de maneira geral estas mutações tinham por característica a criação de condons de parada que impediam a síntese dos domínios protéicos.

Encontrar formas mais simples de realizar o diagnóstico macrossômico é importante para diminuir o número de casos subdiagnosticados e poder realizar uma consultoria genética mais segura e confiável. Assim, concluímos que a metodologia utilizada neste trabalho, para a análise de mutações (realizar o sequenciamento direto

em todos os exons dos genes NSD1 e PTEN), não será viável para a utilização no Sistema Único de Saúde (SUS), por se tratar de uma metodologia extremamente cara e laboriosa. Sugerimos a utilização de uma técnica de triagens de mutação anterior ao seqüenciamento direto, como, por exemplo, SSCP ou DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), o que eliminará o seqüenciamento de regiões sem a possibilidade de mutações.

Referências
Bibliográfica

- AMIEL, J.; FAIVRE, L.; WILSON, L. et al. Dymorphism, variable overgrowth, normal bone age, and severe developmental delay: a "Sotos-like" syndrome? **J. Med. Genet**, v. 39, p. 148-152, 2002.
- AMIR, N.; GROSS-KIESELSTEIN, E.; HIRSH, H. J. et al. Weaver-Smith syndrome. A case study with long term follow-up. **Am J Dis Child**, v. 138, p. 1113-1115, 1984.
- ARMENGOL L.; PUJANA M.A.; CHEUNG J. et al. Enrichment of segmental duplications in regions of breaks of synteny between the human and mouse genomes suggest their involvement in evolutionary rearrangements. **Hum Mol Genet**, v.121, n.7, p.2201-8, Set 2003.
- BAUJAT, G.; RIO, M.; ROSSIGNOL, S. et al. Clinical and Molecular Overlap in Overgrowth Syndromes. **Am J Hum Genet**. v. 137C, p.4-11, 2005.
- BAUJAT, G.; RIO, M.; ROSSIGNOL, S. et al..Paradoxical NSD1 Mutations in Beckwith-Wiedemann Syndrome and 11p15 Anomalies in Sotos Syndrome. **Am J Hum Genet**. v.74, p. 715-720, 2004.
- BIESECKER L.G.; HAPPLE R.; MULLIKEN J.B. et al. Proteus syndrome: diagnostic criteria, differential diagnosis, and patient evaluation. **Am J Med Genet**, v.11, n.84(5), p.389-95, Jun 1999.
- BILBAO, C.; RODRÍGUEZ, G.; RAMÍREZ, R. et al. The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. **Int J Cancer**, v. 119, p. 563-570, 2006.
- BUDWOLE, B. Analysis of the VNTR Locus D1S80 by PCR followed by high resolution PAGE. **Am J Hum Genet**, v.48, p.137-44, 1991.
- CAHALI J.B.; FERNANDEZ S.A.; OLIVEIRA Z.N. et al. Elejalde syndrome: report of a case and review of the literature. **Pediatr Dermatol**, v. 21, n. 4, p.479-82, Jul-Ago 2004.

- CARAKUSHANSKY, M.; CARAKUSHANSKY, G. Síndromes Macrossômicas. In: CARAKUSHANSKY, G. **Doenças genéticas em pediatria**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.400-406. 2001.
- CATCHPOOLE D.; LAM W.W.; VALLER D. et al. Epigenetic modification and uniparental inheritance of H19 in Beckwith-Wiedemann syndrome. **J Med Genet**, v.34, n.5, p.353-9, Mai 1997.
- CATCHPOOLE D.; SMALLWOOD A.V.; JOYCE J.A. et al. Mutation analysis of H19 and NAP1L4 (hNAP2) candidate genes and IGF2 DMR2 in Beckwith-Wiedemann syndrome. **J Med Genet**, v.37, n.3, p.212-5, Mar 2000.
- CECCONI, M.; FORZANO, F.; MILANI, D.; et al., Mutation analysis of the NSD1 gene in a group of 59 patients with congenital overgrowth. **Am J Med Genet**, v. 134A, p. 247-253, 2005.
- COHEN M.M. JR, NERI G. New overgrowth syndrome and FGFR3 dosage effect. **J Med Genet**, v. 35, n.4, p.348-9, Abr 1998b.
- COHEN M.M. JR. Perspectives on overgrowth syndromes. **Am J Med Genet**, v.2, n.79(4), p.234-7, Out 1998a.
- COHEN, M. M. JR.; A comprehensive and critical assessment of over-growth syndromes. In: Haris, H.; Hirschorm. K., eds. *Adv Hum Genet*, v. 18, p. 181-303, 1989.
- COHEN, M. M. JR.; **The children with multiple birth defects**. New York: Raven Press, p. 310, 1982b.

- COHEN, M. M. JR.; The large-for-gestational age infant in dismorphic perspective. In: Wiley, A.M.; Carter, T.P.; Kelly, S.; Porter, I.H., eds. **Clinical Genetics: Problems in Diagnosis and Counseling**. New York: Academic Press, p. 153-169, 1982a.
- COHEN, M. M. JR.; Tumors and nontumors in Sotos syndrome. **Am J Med Genet**; v. 84, p. 173-175, 1999.
- COHEN, M.M.JR.; NERI G.; WEKSBERG, R. **Overgrowth Syndromes**. Oxford: New York, 2002.
- COLE T.R.; HUGHES H.E. Autosomal dominant macrocephaly: benign familial macrocephaly or a new syndrome **Am J Med Genet**, v.1, n. 41, p.115-24, Out 1991.
- COLE T.R.P.; HUGHES H. E.; Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history. **J Med Genet**, v. 31; p.20-32, 1994.
- DANWOOD, A. A.; MACHADO, G. T.; WINSHIP, W. S. Weaver's syndrome - primordial excessive growth velocity: a case report. **S Afr Med J**, v. 67, p.646-6448, 1985.
- DE BOER, L.; RODER, I.; WIT, J.M. Psychosocial, cognitive, and motor functioning in patients with suspected Sotos syndrome: a comparison between patients with and without NDS1 gene alterations. **Dev. Med. Child Neurol**, v.48 (7), p. 582-588, 2006.
- DE VITTO, L.P.M. **Achados Fonoaudiológicos e a Correlação com Síndromes Macrossômicas**. 2004. 229f. Doutorado em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Genética). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho. São Paulo.

DOUGLAS J.; HANKS S.; TEMPLE I.K. et al. NSD1 mutations are the major cause of Sotos syndrome and occur in some cases of Weaver syndrome but are rare in other overgrowth phenotypes. **Am J Hum Genet**, v. 72, n.1, p. 132-143, Jan 2003.

DOUGLAS, K.; TATTON-BROWN, K.; COLEMAN, K. et al. Partial NSD1 deletions cause 5% of Sotos syndrome and are readily identifiable by multiplex ligation dependent probe amplification. **J. Med. Genet**, v. 42, p. e56, 2005.

DOVER, G., Slippery DNA runs on and on and on...**Nature Genetics**, v.10, p.254-256, 1995.

ENGEL J.R.; SMALLWOOD A.; HARPER A. et al. SCHOFIELD P.N.; MAHER E.R. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. **J Med Genet**, v.37, n.12, p.921-6, Dez 2000.

ENGSTROM W.; LINDHAM S.; SCHOFIELD P. Wiedemann-Beckwith syndrome. **Eur J Pediatr**, v.147, n. 5, p.450-7, Jun 1988.

FAGALI, C.Q.; KIM, C.A.; BERTOLA, D.R.; KOIFFMANN, C.P. Pesquisa de mecanismos genéticos na síndrome de Sotos. Congresso Brasileiro de Genética, 52º, 2006, Foz do Iguaçu, **Anais**.

FARAVELLI. F.; Mutations in Sotos Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 137c, p. 24-31, 2005.

GENEATLAS. Université René Descartes. Disponível em <<http://www.genatlas.org/>> Acesso em 10/10/2006.

GOLDMAN M.; SHUMAN C.; WEKSBERG R.; ROSENBLUM N.D. Hypercalciuria in Beckwith-Wiedemann syndrome. **J Pediatr**, v.142, n.2, p.206-8, Fev 2003.

GOLDSTEIN D.J.; WARD R.E.; MOORE E.; FREMION A.S.; WAPPNER R.S.
Overgrowth, congenital hypotonia, nystagmus, strabismus, and mental retardation:
variant of dominantly inherited Sotos sequence? **Am J Med Genet**, v.29, n.4,
p.783-92, Apr 1988.

GOMES M.V.; RAMOS E.S.; Beckwith-Wiedemann syndrome and isolated
hemihyperplasia. **Sao Paulo Med J**, v. 5; n.121, p.133-85, Mai 2003.

GRAHAM, J.M.JR.; RIMOIM, D.L. Abnormal Body Size And Proportion. In:
RIMOIN D.L.; CONNOR J. M.; PYERITZ R.E.; KORF, B.R. (Eds.) **Principles
and Practice of Medical Genetics** (Fourth Edition), New York: Churchill
Livingstone, P. 1066-1082, 2002.

HENKE, W., HERDEL, K.,JUNG, K. e cols. Betaine improve the PCR amplification of
GC-rich DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v.10, n.19, p.3957-3958,
1997.

HENKE, W., HERDEL, K.,JUNG, K. e cols. Betaine improve the PCR amplification of
GC-rich DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v.10, n.19, p.3957-3958,
1997.

HIGGINBOTTOM M.C.; SCHULTZ P. The Bannayan syndrome: an autosomal
dominant disorder consisting of macrocephaly, lipomas, hemangiomas, and risk
for intracranial tumors. **Pediatrics**, v.69, n.5, p.632-4, Mai 1982.

HOGLUND P, KUROTAKI N, KYTOLA S, MIYAKE N, SOMER M, MATSUMOTO
N. FAMILIAL Sotos syndrome is caused by a novel 1 bp deletion of the NSD1
gene. **J Med Genet**, v.40, n.1, p.51-4, Jan 2003.

HUANG N.; VOM BAUR E; GARNIER J-M. e cols. Two distinct nuclear receptor
interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of
both corepressor and coactivators. **Embo J.**, v 17, p. 3398-3412, 1998.

HUGHES-BENZIE R.M.; PILIA G.; XUAN J.Y, et al. Simpson-Golabi-Behmel syndrome: genotype/phenotype analysis of 18 affected males from 7 unrelated families. **Am J Med Genet**, v.11, n. 66(2), p. 227-34, Dez 1996.

IMAIZUMI, K.; KIMURA, J.; MATSUO, M.; et al., Sotos syndrome associated with a de novo balanced reciprocal translocation t(5;8)(q35;q24.1). **Am J Med Genet**, v. 107, p. 58-60.

JONES, K. L.. **Smith's: Recognizable Patterns of Human malformation**. 5^a ed. W. B. Saunders Company Ltd, 1997.

KAMIMURA J.; ENDO Y.; KUROTAKI N. et. al. Identification of eight novel NSD1 mutations in Sotos syndrome. **J Med Genet**, v. 40 n.11 p.126. Nov 2003.

KANEMOTO, N.; KANEMOTO, K.; NISHIMURA, G. et al. Nevo Syndrome with an NSD1 Deletion: A Variant of Sotos Syndrome? **American Journal of Medical Genetics**, v.140A, p. 70-73, 2006.

KANT, S.G.; KRIEK, M.; WALENKAMP, M.J.E. et al. Tall stature and duplication of the insulin-like growth factor I receptor gene. **European Journal of Medical Genetics**, v. 20, p.1-10, 2006.

KAUFMAN, P.B., WU, W., KIM, D., CSEKE, L.,J. **Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine**, Florida: CRC, 1995.

KIRCHHOFF, M.; BISGAARD, A.M.; BRYNDORF, T. et al. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams – Beuren syndrome regions. **European Journal of Medical Genetics**, v. 50, p. 33-42, 2007.

KRUGLYAK, L. Power tools for human genetics. **Nature Genetics** (Advance Online Publication), 30 Out 2005.

KUROTAKI N, HARADA N, YOSHIURA K. et al. Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. **Gene**. v.28, n.279, p.197-204, Nov 2001.

KUROTAKI N.; HARADA N.; SHIMOKAWA O. e cols. Fifty microdeletions among 112 cases of Sotos syndrome: low copy repeats possibly mediate the common deletion. **Hum Mutat**, v.22, n.5, p.378-87, Nov 2003.

KUROTAKI N.; IMAIZUMI K.; HARADA N. et al. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. **Nat Genet**, v. 30, n.4, p. 365-6, Mar 2002.

KUROTAKI, STANKIEWICZ, P. WAKUI, K. et al.. Sotos syndrome common deletion is mediated by directly oriented subunits within inverted Sos-REP low-copy repeats. **Human molecular genetics**, v.14, n.4, p535-542, Jan 2005.

LAM W.W.; HATADA I.; OHISHI S.; MUKAI T. et al. Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. **J Med Genet**, v.36, n.7, p.518-23, Jul 1999.

MARCONDES, E. **Desenvolvimento da criança: desenvolvimento biológico – crescimento**. Sociedade Brasileira de Pediatria, 1994.

MARCONDES, E.; SETIAN, N.; CARRAZZA, F. R. **Desenvolvimento Físico (Crescimento) e Funcional da Criança. Pediatria Básica – Tomo I: Pediatria Geral e Neonatal**. 9º ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 2002.capítulo 4.

MAROUN, C.; SCHMERLER, S.; HUTCHEON, R.G. Child with Sotos phenotype and a 5:15 translocation. **Am J Med Genet**, 50(3): p. 291-293, Apr 1994.

MEINECKE P.; SCHAEFER E.; ENGELBRECHT R.; The Weaver syndrome in a girl.
Eur J Pediatr, v.141, n.1, p.58-9, Out 1983.

MELO DG.; ACOSTA A.X.; SALLES M.A.; PINA-NETO J.M.; CASTRO J.D.;
SANTOS A.C. Sotos syndrome (cerebral gigantism): analysis of 8 cases. **Arq
Neuropsiquiatr**, v.60, n. 2-A, p.234-8, Jun 2002.

MIYAKE N.; KUROTAKI N.; SUGAWARA H. et al Preferential Paternal Origin of
Microdeletions Caused by Prezygotic Chromosome or Chromatid Rearrangements
in Sotos Syndrome **Am. J. Hum. Genet.** v.72, n.5, p.1331–1337, Mai 2003.

MORETTI-FERREIRA, D. **Macrossomias na Infância Estudo genético-clínico de 32
portadores de macrossomia associada a síndrome dismórficas** 1995. 166f.
Doutorado em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Genética). Instituto de
Biotecnologia, Universidade de São Paulo. São Paulo.

MORETTI-FERREIRA, D.; KOIFFMANN, C. P.; LISTIK, M. Macrossomia, Obesity,
Macrocephaly and Ocular abnormalities (MOMO Syndrome) in Two unrelated
patients: Delineation of a newly recognized overgrowth Syndrome **American
Journal of Medical Genetics**, v. 46, p. 555 – 558, 1993

MORETTI-FERREIRA, D.; KOIFFMANN, C. P.; WAJNTAL, A. Macrossomia,
Macronania e Incoordenação Motora na Infância: Síndrome de Sotos (McKusick
11755)- Estudo de 7 casos. **Arquiv Neuro Psiq**, v.49, p. 164 – 171, 1991.

MORETTI-FERREIRA, D.; KOIFFMANN, C.P; SOUZA, D.H. Macrocephaly,
Multiple Lipomas and Hemangiomas (Bannayan-Zonana Syndrome - BZS,
McKusick 15348. Genetic Heterogeneity or Autosomal Dominant Locus with
Two Different Allelic Forms? **Am J Med Genet**, v. 34, p. 548 – 551, 1989.

MUNNS C.F.; BATCH J.A. Hyperinsulinism and Beckwith-Wiedemann syndrome.
Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, v.84, n.1, p.67-9. Jan 2001.

NAGAI T.; MATSUMOTO N.; KUROTAKI N. et al. Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: clinical features of intragenic mutations and submicroscopic deletions. **J Med Genet**, v.40, n.4, p.285-9, Abr 2003.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. National Institutes of Health. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em: 21/01/2007.

NERI G.; MARINI R.; CAPPÀ M.; BORRELLI P.; OPITZ J.M. Simpson-Golabi-Behme syndrome: an X-linked encephalo-tropho-schisis syndrome. **Am J Med Genet**, v.30 n.1-2, p.287-99, Mai 1988.

NEVO, S.; ZELTZER, M.; BENDERLY, A. et al. Evidence for autosomal recessive inheritance in cerebral gigantism. **J. Med. Genet.** v.11, p.158-165, 1974.

NICKERSON GROUP. University of Washington, Department of Genome Science. Disponível em: <<http://droog.mbt.washington.edu/PolyPhred.html>> Acesso em 01/03/2007.

NIEMITZ, L. E.; DEBAUN, R. M.; FALLON, J. et al..Microdeletion of LIT1in Familial Beckwith-Wiedmann Síndrome. **Am J Hum Genet**, v.75, p.844-849, 2004.

OHLSSON R.; NYSTROM A.; PFEIFER-OHLSSON S. et al IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nat Genet**, v.4, n.1, p.94-7, Mai 1993.

OMIM#601451 – NEVO Syndrome. LURIE, I. W. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601451>>. Acesso em: 14/09/2005.

OPITZ, J.; WEAVER, D.; REYNOLDS, J.; The syndromes of Sotos and Weaver: Reports and review. **Am J Genet**, 179: p.294-304, 1998.

ORITA M.; IWAHANA H.; KANAZAWA H. et al.. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proceeding of the National Academy of Sciences**. USA, v.86, p.2766-2770, Abr 1989.

PERENETTE, R.S. **Análise genético-clínica de 10 portadores de síndrome de sotos**. 2003. 133f. Mestrado em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Genética). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho. São Paulo.

PILIA G.; HUGHES-BENZIE R.M.; MACKENZIE A. et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. **Nat Genet**, v.12, n.3, p. 241-7, Mar 1996.

PRIMER3. Withehead Institute for Biomedical Research. Disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi> Acesso em: 07/03/2005.

PROUD, V., BRADDOCK, S. R.; COOK, L.; WEAVER, D. D. Weaver syndrome: autosomal dominant inheritance of disorder. **Am J Med Genet**, v. 79, p. 305-310, 1998.

RAYASAM GV, WENDLING O, ANGRAND P.O. et al. NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. **EMBO J**, v. 16 n.22, p.3153-63, Jun 2003.

RIMOIN L. DAVID; CONNOR MICHAEL, J.; PYERITZ E. REED; KORF R. BRUCE. Emery and Rimoin's: Principles and Practive of Medical Genetics. 4^a ed. CIDADE DE PUBLICAÇÃO: Churchill Livingstone, 2002. v. 1, p. 1075-1077.

RIO M.; CLECH L.; AMIEL J. et al. Spectrum of NSD1 mutations in Sotos and Weaver syndromes. **J Med Genet.**; v. 40, n. 6, p.436-40, Jun 2003.

SANAL O. YEL L.; KUCUKALI T.; GILBERT-BARNES E. et al An allelic variant of Griscelli disease: presentation with severe hypotonia, mental-motor retardation, and hypopigmentation consistent with Elejalde syndrome (neuroectodermal melanolyosomal disorder). **J Neurol**, v.247, n.7, p. 570-2, Jul 2000.

SANLAVILLE, D.; DELNATTE, C.; MOUGENOT, J. et al. Deletion of PTEN and BMPR1A on Chromosome 10q23 Is Not Always Associated with Juvenile Polyposis of Infancy. **The American Journal of Human Genetics**, v. 79, p.593-597, Set 2006.

SARQUIS, M. S.; AGRAWAL, S.; SHEN, L. et al. Distinct Expression Profiles for PTEN Transcript and Its Splice Variants in Cowden Syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, v.79, p. 23-30, Jul 2006.

SAUGIER-VEBER, P.; GOLDENBERG, A.; DE LA ROCHEBROCHARD, C. et al. Simple detection of genomic microdeletions and microduplications using QMPSF in patients with idiopathic mental retardation. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, p. 1009-1017, 2006.

SCHLESSINGER D.; FORABOSCO A. Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmelsyndrome. **Dev Dyn**, v.213, n.4, p.431-9, Dez 1998.

SCHOFIELD P.N.; LINDHAM S.; ENGSTROM W. Analysis of gene dosage on chromosome 11 in children suffering from Beckwith-Wiedemann syndrome. **Eur J Pediatr**, v.148, n.4, p.320-4, Jan 1989.

SEIDAHMED M.Z.; ROONEY D.E.; SALIH M.A. et al. Case of partial trisomy 2q3 with clinical manifestations of Marshall-Smith syndrome. **Am J Med Genet**, v.16, n. 85(2), p.185-8, Jul 1999.

SMILINICH N.J.; DAY C.D.; FITZPATRICK G.V. et al.. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss

of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.6, n. 96(14), p.8064-9, Jul 1999.

SMITH J.M.; KIRK E.P.; THEODOSOPOULOS G. et al. Germline mutation of the tumour suppressor PTEN in Proteus syndrome. **J Med Genet**, v.39, n.12, p.937-40, Dez 2002.

SOTOS J.F.; Overgrowth. **Clin. Pediatr**, v. 36, p. 89-103, 1997.

SPIEGEL, M.; OEXEL, K.; HORN, D.; et al. Childhood overgrowth in patients with common NF1 microdeletions. **European Journal of Human Genetics**, v.13, p.883-888, 2005.

TATTON-BROWN K.; DOUGLAS J.; COLEMAN K. et al..Genotype-Phenotype Associations in Sotos Syndrome: An Analysis of 266 Individuals with NSD1 Aberrations. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 77; p. 193-204, 2005.

TATTON-BROWN K.; DOUGLAS J.; COLEMAN K. et al..Multiple mechanisms are implicated in the generation of 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. **J Med Genet**, v.42, p.307-313, Abr 2005.

TATTON-BROWN K.; RAHMAN N.; Sotos syndrome. **Eur J Hum Genet**, p. 1-8, 2006.

TURKMEN S.; GILLESSEN-KAESBACH G.; MEINECKE P. et al. Mutations in NSD1 are responsible for Sotos syndrome, but are not a frequent finding in other overgrowth phenotypes. **Eur J Hum Genet**, v. 11, n. 11, p. 858-65, Nov 2003.

VEUGELERS M.; CAT BD.; MUYLDERMANS S.Y. et alMutational analysis of the GPC3/GPC4 glypican gene cluster on Xq26 in patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome: identification of loss-of-function mutations in the GPC3 gene. **Hum Mol Genet**, v.22, n. 9(9), p. 1321-8, Mai 2000.

- VEUGELERS M.; VERMEESCH J.; WATANABE K. et al. GPC4, the gene for human K-glypican, flanks GPC3 on xq26: deletion of the GPC3-GPC4 gene cluster in one family with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. **Genomics**, v.1, n.53(1), p.1-11, Oct 1998.
- VISSER R.; MATSUMOTO N. Genetics of Sotos syndrome. **Curr Opin Pediatr**, Curr Opin Pediatr, v. 15, n. 6, p. 598-606, Dez 2003.
- VISSER, R.; HASEGAWA, T.; NIKAWA, N. et al. Analysis of the NSD1 promoter region in patients with a Sotos syndrome phenotype. **J. Hum. Genet**, v.56, p. 15-20, 2006.
- VISSER, R.; SHIMOKAWA, O.; HARADA, N. et al. Identification of a 3.0 Kb Major Recombination Hotspot in Patients with Sotos Syndrome Who Carry a Common 1.9-Mb Microdeletion. **Am. J. Hum. Genet**, v.76, p.52-67, 2005.
- VISSER, R.; SHIMOKAWA, O.; HARADA, N. et al. Non-hotspot-related breakpoints of common deletions in Sotos syndrome are located within destabilised DNA regions. **J Med Genet**, v. 42, p. 66, 2005.
- WAJNTAL, A.; MORETTI-FERREIRA, D.; SOUZA, D.H.; Cytogenetic evidence of involvement of chromosome regions 15q. 12 and 12q. 15 in conditions with associated overgrowth. **Dna And Cell Biology**, v. 12, p. 227 – 231, 1993.
- WEAVER, D. A.; GRAHAM, C. B.; THOMAS, I.T.; SMITH, D.W. A new overgrowth syndrome with accelerated skeletal maturation, unusual facies and camptodactyly. **J Pediatr**, 44: p.547-552, 1974.
- WEKSBERG, R.; SHUMAN, C.; SMITH, A. C. Beckwith-Wiedemann Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v.137c, p. 12-23, 2005.
- WIEDEMANN H.R. Familial Malformation Complex With Umbilical Hernia And Macroglossia--A "New Syndrome"? **J Genet Hum**, v.13, p.223-32, Set 1964.

WILSON, S. M.; YIP, R.; SWING, D. A.; et al A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. **Proc. Nat. Acad. Sci**, v. 97, p.7933-7938, 2000.

YODER C.C.; WISWELL T.; CORNISH J.D.; CUNNINGHAM B.E.; CRUMBAKER D.H. Marshall-Smith syndrome: further delineation. **South Med J**, v. 81, n. 10, p.1297-300, Oct 1988.

Anexo I



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, 08 de novembro de 2.004

OF 536/2004-CEP
MACAH/asc

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

Prezado Dr. Danilo

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o projeto de pesquisa intitulado "Análise molecular de pacientes com macrosomia", de autoria de Gustavo Henrique Vieira, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 08/11/2004.

O CEP esclarece que mesmo se tratando de Genética Humana, o projeto não tem necessidade de envio a CONEP, pois cumpre as normas da Resolução 340 de 08/07/2004.

Situação do Projeto: APROVADO.

Atenciosamente,

*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*

Anexo II



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 do Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) – UNESP - Botucatu intitulado “Análise molecular em pacientes com macrosomia” e gostaríamos que vocês soubessem que:

- participar deste projeto é uma opção de vocês, vocês podem decidir participar deste projeto 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;
- se vocês decidirem participar gostaríamos de informar-lhes que:
 - a) Serão coletados 5ml de sangue (2 colheres de sopa) do paciente e seus pais, nos quais será realizado uma busca por mutações nos genes NSD1, PTEN e quanto a presença de microdeleções cromossômicas.
 - b) A coleta de sangue pode causar algum desconforto físico e existe uma chance 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 as possíveis causas das Doenças Macrossômicas.
 - e) O material biológico (DNA) será armazenado em nossos bancos de estoque e poderá ser usado em futuras pesquisas em genes, relacionados com macrossomias, que venham a ser descobertos, diante de nova aprovação pelo CEP e CONEP, desde que seja autorizado por vocês.
 - e) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos.
 - f) Assim que existam resultados, estes serão apresentados a vocês pelos médicos do SAG e será garantido, nesta entidade, o aconselhamento genético e acompanhamento clínico sem qualquer custo.
 - g) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulem entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
 - h) Sempre que ocorrerem publicações científicas a sua identidade e do seu filho será mantida em absoluto sigilo.
 - i) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido, em nenhuma hipótese, o acesso dos dados por terceiros.
 - j) Todos os resultados de exames moleculares estarão disponíveis no prontuário do paciente no Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu.

Eu, _____ portador do R.G. n° _____
 (responsável pelo paciente) concordo em participar do projeto de pesquisa “Análise molecular dos genes NSD1 e PTEN em pacientes com diagnóstico clínicos de macrosomia”. 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 pela pesquisa: Gustavo Henrique Vieira

Fone: (14) 3815-3131 (14)3814-0473

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

Botucatu/SP – CEP:18.600-000

Anexo III



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

Análise Molecular em Pacientes com Macrosomias

Data: ___/___/___

Nome: _____
 Registro: _____ SAG : _____
 Data de Nascimento : ___/___/___ Idade: _____

DADOS PRÉ-NATAIS

Diabetes Melitus Materno: Sim () Não () Diabetes Gestacional: Sim () Não ()
 Glicemia: _____
 Necessidade de dieta para controle glicêmico: Sim () Não ()
 Insulina: Sim () Não () Em que período da gestação: _____

DADOS DE NASCIMENTO

Tipo de Parto: Vaginal () Cesariano () Motivo: _____
 Idade Gestacional: _____ Semanas() Desconhecida () Pré-Termo () A Termo () Pós-Termo
 Peso ao Nascimento: _____ Percentil: _____ Desconhecido ()
 Estatura: _____ Percentil: _____ Desconhecido ()
 Perímetro Cefálico: _____ Percentil: _____ Desconhecido ()

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS (Curvas em anexo):

Data: ___/___/___

Peso: _____ Percentil: _____
 Estatura: _____ Percentil: _____
 Perímetro Cefálico: _____ Percentil: _____

Idade Óssea (GP) : ___ a ___ m Data: ___/___/___ Idade Cronológica: ___ a ___ m

Estatura do Pai : _____ Percentil: _____ Desconhecido ()
 Perímetro Cefálico do Pai: _____ Percentil: _____ Desconhecido ()
 Estatura da Mãe : _____ Percentil: _____ Desconhecido ()
 Perímetro Cefálico da mãe: _____ Percentil: _____ Desconhecido ()

Tomografia Computadorizada de Crânio: Sim () Não () Data: ___/___/___

Ressonância Nuclear Magnética de Crânio: Sim () Não () Data: ___/___/___

Dilatação Ventricular: Sim () Não () Outra Anomalia? : _____

Neoplasia/ ou Suspeita: Sim () Não () _____

Assimetria Corpórea: Sim () Não () _____

Diagnóstico Suspeito: () Diagnóstico Definido: ()
 Qual? _____

Responsável pela Pesquisa: Gustavo Henrique Vieira
 Responsável Clínico: Daniel Rocha de Carvalho
 Responsável Geral: Prof. Dr. Danilo Moretti – Ferreira

Síndrome de Sotos

Crescimento		Frequência %
Peso elevado ao nascimento	()	84
Crescimento superior ao normal – alta estatura	()	97
Idade óssea avançada em relação à idade	()	79
Mãos e pés grandes	()	83
Desenvolvimento		
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	()	84
Coordenação motora fina comprometida	()	72
Dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal	()	44
Craniofacial		
Macrocrania	()	90
Dolicocefalia	()	85
Implantação do cabelo na região frontal elevada	()	94
Frontal saliente e largo	()	96
Hipertelorismo ocular	()	92
Fendas palpebrais para baixo	()	65
Mento saliente	()	79
Palato alto e arqueado	()	96
Erupção prematura dos dentes	()	57

- + Presente
- Ausente
- ? Não Observado

Síndrome de Weaver

Crescimento	Frequência
	%
Crescimento prenatal excessivo – alta estatura ao nascimento ()	80
Crescimento posnatal excessivo – alta estatura pós-natal ()	85
Idade óssea avançada em relação à idade ()	100

Desenvolvimento	
Hipertonia ()	55
Hipotonia ()	27
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor ()	100
Choro rouco e grave ()	82

Craniofacial	
Frontal saliente e largo ()	94
Região occipital achatada ()	54
Orelhas grandes ()	88
Hipertelorismo ocular ()	100
Filtro longo ou proeminente ()	71
Micrognatia relativa ()	89

Membros	
Camptodactilia ()	68
‘Pads’ digitais proeminentes ()	66
Unhas finas, bastante convexas e encravadas ()	90
Polegares alargados ()	66
Clinodactilia em artelhos ()	80
Extensão reduzida de cotovelo ou joelho ()	76
Ossos longos com porção distal alargada ()	88
Deformidade em pés: em varo, em valgo, metatarso aduzido ()	70

Outros	
Pele redundante e frouxa ()	91
Hernia umbilical ou diástese de retos abdominais ()	70
Hérnia inguinal ()	28
Mamilos invertidos ()	75

- + Presente
- Ausente
? Não Observado

Síndrome de Beckwith-Wiedemann

	Frequência %
Um ou mais membros da família com diagnóstico clínico de SBW ou história de aspectos sugestivos para SBW	()
Crescimento	
Macrossomia	() 33
Prematuridade	()
Idade óssea avançada em relação à idade	() 21
Tumor embrionário: Tumor de Wilms, Hepatoblastoma, Rabdomiosarcoma	()
Desenvolvimento	
Polidramnio	()
Hipoglicemia neonatal	() 30
Craniofaciais	
Macroglossia	() 82
Fenda de palato	()
Fácie característica: hipoplasia de face media e prega em região de pálpebra inferior	()
Sulcos na parte anterior do lóbulo da orelha / pits em região posterior de hélice	() 38
Órgãos Internos	
Hemihiperplasia definida como crescimento assimétrico de regiões do corpo	() 13
Córtex adrenal com células gigantes a histologia	()
Anormalidades renais incluindo anormalidade estrutural, nefromegalia; nefrocalcinose	() 23
Onfalocele ou hérnia umbilical	() 75
Diástese de retos abdominais	()
Visceromegalia	()
Malformações vasculares de aspecto capilar	()
Cardiomegalia / anomalia cardíaca estrutural / raramente cardiomiopatia	() 16
Pele	
Nevos hemangiomatoso plano em face	()
Gemelaridade monozigótica	()
+ Presente	
- Ausente	
? Não Observado	

Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel

Neonatal		Frequência
		%
Macrossomia	()	93
Hidropsia fetal	()	
Craniofacial		
Macrocefalia	()	83
Fácie grosseira	()	80
Fendas palpebrais inclinadas para baixo	()	
Macrostomia/macroglossia	()	85
Má oclusão dentária	()	
Fenda labial ou de palato	()	36
Sulco central em região inferior ao lábio inferior	()	
Mãos		
Polidactilia	()	38
Unhas das mãos pequenas	()	75
Sindactilia cutânea	()	47
Tórax/Abdômen		
Mamilos supra-numerários	()	
Tórax excavatum	()	
Anormalidades de vértebras/costelas	()	
Diástese de músculos reto-abdominais	()	
Fosseta coccígea	()	
Hérnias umbilical ou inguinal	()	60
Genitália		
Hipospádia	()	
Criptorquidia	()	
Orgãos Internos		
Anormalidade cardíaca congênita	()	37
Arritmia cardíaca	()	
Hérnia diafragmática	()	
Hepatoesplenomegalia	()	70
Ilhotas de Langerhans hiperplásicas a histologia	()	
Displasia cística dos rins	()	
Neurológicos		
Hipotonia	()	
Retardo mental	()	5
Outros		
Idade óssea avançada em relação à idade	()	50
morte neonatal	()	
+ Presente		
- Ausente		
? Não Observado		

Syndromes de Bannayan-Zonana / Bannayan-Riley-Ruvalcaba

Crescimento	
Alta estatura ao nascimento	()
Altura de adulto normal	()
Peso de nascimento maior que 4 Kg	()
Craniofacial	
Macrocefalia	()
Fissuras palpebrais inclinadas para baixo	()
Pseudopalpiloedema	()
Corpo caloso alargado a neuroimagem	()
Estrabismo	()
Tórax/Abdômen	
Mamilos supra-numerários	()
Pele	
Acantose nigra	()
Máculas café-com-leite em pele	()
Angioqueratoma	
Máculas	()
Orgãos Internos	
Pólipos hamartomatosos em cólon	
Intussuscepção intestinal	()
Sangramento retal	()
Pólipos hamartomatosos no íleo	()
Lipomas	()
Hemangiomas	()
Tireoidite de Hashimoto	()
Tumor tireoidiano de células foliculares	()
Meningiomas	
Genitália	
Hipercrômias em glândula ou no pênis Hipotonia	()
Neurológicos	
Convulsões	()
Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor	()
Atraso no desenvolvimento da fala	()
Retardo mental leve ou moderado	()

+

-

?

Anexo IV

Descrições Clínicas

CASO 1

A.M.A., sexo feminino, nascida a termo de parto vaginal (37 semanas), de casal jovens não consanguíneo, foi encaminhada pelo Serviço de Genética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 2,890 Kg (<50%), comprimento de 47,0 cm (2.5%) e perímetro cefálico de 33,5 cm (<50%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 3 anos e 5 meses, revelou peso de 19,500 Kg (<97,5%), estatura de 105,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 53,0 cm (>98%). Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina e dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, palato alto e arqueado e erupção prematura dos dentes. Constatou-se, que o propósito não apresentou peso elevado ao nascimento, porém, crescimentos superiores ao normal mostraram-se evidentes à avaliação clínica, tais como: alta estatura e mãos e pés grandes. Foi realizado exame de RNMC que detectou dilatação ventricular. A avaliação radiológica evidenciou na idade cronológica de 3 anos e 5 meses a idade óssea de 4 anos e 8 meses. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Foi detectado o polimorfismo 1128C→A, este polimorfismo não é a causa do fenótipo macrossômico, por não conferir alteração à proteína.

CASO 2



A.M.D., sexo feminino, nascida a termo de parto cesariano, de casal não consanguíneo, foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,800 Kg (>97,5%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 10 anos e 6 meses, revelou peso de 82,000 Kg(>97,5%), estatura de 169,0 cm(>97,5%) e perímetro cefálico de 57,0 cm (>98%). Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e comprometimento da coordenação motora fina, mas não apresentou dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo e palato alto e arqueado. Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou peso elevado ao nascimento e crescimento superior ao normal, tais como: alta estatura; idade óssea avançada em relação à idade e mãos e pés grandes. Não foram verificados mento saliente e erupção prematura dos dentes. Foi realizado exame de TCC que não detectou neoplasia ou

suspeita. A avaliação radiológica evidenciou idade óssea de 13 anos e com idade cronológica de 10 anos e 6 meses. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa da mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Foi detectada a mutação 3607-08insG, no gene NSD1, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois ela gera um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 3



A.L.C.C., do sexo masculino, nascido a termo de parto cesariano, de casal não consanguíneo, foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,050 Kg (50%), comprimento de 48,0 cm (>50%) e perímetro cefálico de 36 cm (>97,5%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 4 anos e 9 meses, revelou peso de 17,000 Kg (50%), estatura de 104,0 cm (50%) e perímetro cefálico de 52,0 cm (75%). Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, mas não apresentou dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo e mento saliente. Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou crescimento superior ao normal além de alta estatura e mãos e pés grandes.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Foi detectada a mutação 1178delA, no gene NSD1, esta mutação é provável causa do fenótipo macrossômico, pois ela gera um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 4



B.L.S.P., do sexo feminino, nascida a termo de parto cesariano de casal não consanguíneo, foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 2,530 Kg (>50%) e 48,0 cm (>50%) de estatura. O propósito, submetido à avaliação clínica aos 10 anos e 9 meses, revelou peso de 37,000 Kg (>50%), estatura de 147,0 (<97,5%) cm e perímetro cefálico de 56,0 cm(>98%). Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e comprometimento da coordenação motora fina. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, palato alto e arqueado e mento saliente. Constatou-se, que o propósito apresentou crescimento superior ao normal, tal como, alta estatura, mas não apresentou peso elevado ao nascimento, assim como mãos e pés grandes. Não foram verificadas fendas palpebrais para baixo. Foram realizados exames de TCC e RNMC que não detectaram dilatação ventricular, neoplasia ou suspeita e assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou, com idade cronológica de 10 anos e 8 meses, idade óssea de 11 anos. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: foi detectada a mutação 4305-06insA, no gene NSD1, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois ela gera um códon de parada, gerando um proteína truncada.

CASO 5

B.H.M.M., do sexo masculino, nascida a termo de parto cesariano (39 semanas), de casal não consanguíneo, foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de exames moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,350 Kg (>50%), estatura de 52,0 cm (>50%) e perímetro cefálico de 35,0 cm (50%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 13 anos e 7 meses, revelou peso de 119,000 Kg (>97,5%), estatura de 174,0 cm (97,5%) e perímetro cefálico de 59,0 cm (>98%). Constatou-se, que o propósito apresentou durante o exame clínico, macrocefalia, desordem altística, avanço na idade óssea e auto-mutilação.. Foram realizados exames de TCC e RNMC que não detectaram dilatação ventricular, neoplasia ou suspeita e assimetria corpórea.

Diagnóstico: Macrosomia a esclarecer

Conclusão: foram detectados os polimorfismos 1128C →A e 1157T →A, no gene NSD1, para o segundo polimorfismo deverá ser realizado o teste nos pais do probando para confirmação desta mutação como fator etiológico da doença.

CASO 6

B.T.S., do sexo masculino, nascido pré-termo de parto cesariano (36 semanas), sem gemelaridade monozigótica foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de exames moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 2,500 Kg (<50%) e estatura de 46,0 cm (2,5%). O propósito, submetido à avaliação clínica ao 1 ano e 1 mês, revelou peso de 13,100 Kg (<97,5%), estatura de 79,4 cm (<97,5%) e perímetro cefálico de 47,2 cm (<97,5%). Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou macrossomia, prematuridade, e um quadro de polidramnio negativo. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: fâcie característica – hipoplasia de face média e prega em região de pálpebra inferior, sulcos na parte anterior do lóbulo da orelha. Nevos hemangiomaso plano em face presente na pele. Exames clínicos dos órgãos internos revelaram diástese de retos abdominais, visceromegalia e malformações vasculares de aspecto capilar, no entanto, não foram verificados alterações como: hemihiperplasia, definida como crescimento assimétrico de regiões do corpo; anormalidades renais, incluindo anormalidade estrutural, nefromegalia e nefrocalcinose; onfalocele ou hérnia umbilical e cardiomegalia ou anomalia cardíaca estrutural.

Diagnóstico: Síndrome de Beckwith-Wiedemann

Conclusão: foi detectada a mutação 210-11insT, no gene NSD1, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois ela gera um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 7

C.H.S.N.B., sexo masculino, nascida a termo de parto vaginal, (41 semanas), de casala não consangüíneo, foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo pesando 4,490 Kg (>97,5%) e comprimento de 58,0 cm (>97,5%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 7 anos, revelou peso de 63,500 Kg (>97,5%), estatura de 133,0 cm(>97,5%) e perímetro cefálico de 57,0 cm(>98%). além de apresentar idade óssea avançada em 49 meses. Foram realizados exames de RNMC e TCC que detectaram neoplasia ou suspeita e assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou, com idade cronológica de 6 anos e 11 meses, idade óssea de 11 anos. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 8



C.F., sexo feminino nascida a termo e de parto vaginal, de casal consanguíneo, foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências e o mesmo nasceu pesando 3,410 Kg (>50%), estatura de 50,0 cm(>50%) e perímetro cefálico de 35,0 cm(>50%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 12 anos e 4 meses, revelou peso de 43,000 (>50%)Kg, estatura de 155,0 cm (<97,5%) e perímetro cefálico de 59,0 cm (>98%). Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal, porém, sem comprometimento da coordenação motora fina. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, palato alto e arqueado, mas não foi verificada dolicocefalia e implantação do cabelo na região frontal elevada. Não se constatou, durante o exame clínico, peso elevado ao nascimento, mas sim crescimento superior ao normal, tais quais: alta estatura e mãos e pés grandes. Foram realizados exames de RNMC e TCC que não detectaram neoplasia ou suspeita e assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou idade óssea de 12 anos e com idade cronológica de 12

anos e 3 meses. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Foi detectada a mutação 2690-91insG, no gene NSD1, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois ela gera um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 9



I.J., sexo masculino, nascido a termo de parto cesariano (39 semanas), de casal não consanguíneo, foi encaminhado ao Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 4,400 Kg(>97,5%), comprimento de 52,0 cm(<97,5%) e perímetro cefálico de 38,0 cm(>97,5%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 11 anos e 10 meses, revelou peso de 92,000 Kg (>97,5%), estatura de 166,0 cm(>97,5%) e perímetro cefálico de 58,5 cm(>98%). Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou crescimento pré-natal excessivo – alta estatura ao nascimento – crescimento pós-natal excessivo – alta estatura pós-natal. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia, porém choro rouco e grave e hipertonia não foram verificados. Quanto aos aspectos craniofaciais presentes, podemos citar apenas: olhos grandes e micrognatia, relativa macrocrania, uma vez que frontal saliente e largo, região occipital achatada, hipertelorismo ocular e filtro longo e proeminente não estavam presentes. Em relação aos membros, apenas ossos longos com porção distal alargada e deformidades em pés – em varo, em valgo, metatarso aduzido estão presentes enquanto que camptodactilia, “pads” digitais proeminentes, unhas finas, bastante convexas e encravadas, polegares alargados, clinodactilia em artelhos – porém, extensão reduzida de cotovelo ou joelho não foram verificados no propósito. Outros aspectos

clínicos como: pele redundante e frouxa, hérnia umbilical ou diátese de retos abdominais, hérnia inguinal e mamilos invertidos não estão presentes. Foram realizados exames de RNMC e TCC que detectaram dilatação ventricular e ausência de neoplasia ou suspeita, assim como de assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou, na idade cronológica de 3 anos e 3 meses, a idade óssea de 5 anos. Foi realizada investigação de microdeleção no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Weaver

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes

CASO 10



J.G.S., sexo feminino, nascida a termo foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,350 Kg (>50%), estatura de 53,0 cm (>97,5%). O propósito submetido a avaliação clínica aos 5 anos e 3 meses revelou peso de 36,000Kg (>97,5%), estatura de 170,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 52,0 cm (98%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito apresentou crescimento pré-natal excessivo – alta estatura ao nascimento, crescimento posnatal excessivo – alta estatura pós-natal. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia, porém choro rouco e grave e hipertonia não foram verificados. Quanto aos aspectos craniofaciais presentes, podemos citar: frontal saliente e largo, micrognatia relativa, região occipital achatada, hipertelorismo ocular, no entanto não foram observados orelhas grandes e filtro longo e proeminente. Em relação aos membros apenas ossos longos com porção distal alargada e deformidades em pés – em varo, em valgo, metatarso aduzido, unhas finas, bastante convexas e encravadas e

polegares alargados estão presentes enquanto que camptodactilia, “pads” digitais proeminentes, clinodactilia em artelhos e extensão reduzida de cotovelo ou joelho não foram observados no propósito. Outros aspectos clínicos como: pele redundante e frouxa, hérnia umbilical ou diátese de retos abdominais, hérnia inguinal e mamilos invertidos não estão presentes. Foi realizado exame de TCC que não detectaram dilatação ventricular e ausência de neoplasia. A avaliação radiológica evidenciou, na idade cronológica de 5 anos e 2 meses, a idade óssea de 6 anos e 10 meses. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Weaver

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 11



J.M.J.B., sexo masculino, nascimento pré-termo de parto cesariano, de casal não consanguíneo, foi encaminhado ao Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrência, e o mesmo pesando 3,780 Kg(<97,5%), estatura de 52,0 cm(<97,5%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 21 anos e revelou peso de 83,000 Kg(>97,5%), estatura de 184,5 cm(<97,5%) e perímetro cefálico de 57,0 cm(>50%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito apresentou crescimento superior ao normal - alta estatura e mãos e pés grandes. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e comprometimento da coordenação motora final, porém sem dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, frontal saliente e largo, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, porém não apresentou

palato alto e arqueado e erupção prematura dos dentes, implantação do cabelo na região frontal elevada e hipertelorismo ocular.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: foi detectada a mutação 1972-73insG, no gene PTEN, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois gera um códom de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 12



J.H.B., sexo feminino, nascida a termo de parto cesariano, de casal não consanguíneo, foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 4,620 Kg(>97,5%), estatura de 56,0 cm(>97,5%) e perímetro cefálico de 40,0 cm(>97,5%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 8 anos e 9 meses revelou peso de 22,500 Kg(<50%), estatura de 120,0 cm(<2,5%) e perímetro cefálico de 54,5 cm(>98%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito apresentou tais sinais clínicos: macrocefalia, macroglossia, hipertelorismo, renomegalia prévia, ausência de avanço na idade óssea, moderado retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, sem flexão de interfalangeana distal sem macrossomia atual mas com macrossomia prévia, facie grosseiro e consangüinidade. Foi realizado exame de RNMC e TCC que detectaram dilatação ventricular e nefromegalia, sem apresentar assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou, na idade cronológica de 6 anos, a idade óssea de 5 anos e 9 meses. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Macrossomia a esclarecer

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 13



K.N.C., sexo feminino, parto cesariano e foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências. O propósito submetido à avaliação clínica aos 11 anos e 6 meses revelou peso de 47,500 Kg (>50%), estatura de 166,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 57,0 cm(>98%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito não apresentou peso elevado ao nascimento, porém, crescimento superior ao normal mostraram-se evidentes, tais quais: alta estatura e mãos e pés grandes. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, palato alto e arqueado. Assimetria corpórea ou neoplasia não foram diagnosticadas. A avaliação radiológica evidenciou, idade cronológica de 11 anos e 5 meses, a idade óssea de 12 anos. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: foi detectada a mutação 3693delG, no gene NSD1, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois gera um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 14



L.C.S., sexo masculino, nascido a termo de parto cesariano (37,3 semanas), de casal não consaguíneo, foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,320 Kg(>50%), estatura de 49,0 cm(<50%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 3 anos e 3 meses revelou peso de 18,000 Kg(>50%), estatura de 105,0 cm(<97,5%) e perímetro cefálico de 51,5 cm (50-98%). Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina e dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, frontal saliente e largo, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, palato alto e arqueado e não foram observados sinais clínicos com: implantação do cabelo na região frontal elevada, hipertelorismo ocular e erupção prematura dos dentes. Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito apresentou peso elevado ao nascimento, seguido de crescimento superior ao normal – alta estatura porém, sem avanço da idade óssea em relação à idade e mãos e pés grandes. Foram realizados

exames de RNMC e TCC que não detectaram neoplasia e assimetria corpórea. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 15



L.P.G., sexo feminino, nascida a termo de parto cesariano, de casal não consanguíneo, foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo pesando 3,380 Kg (>50%), comprimento de 49,0 cm(50%) e perímetro cefálico de 38,0 cm(>97,5%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 15 anos e 1 meses revelou estatura de 179,0 cm (97,5%) e perímetro cefálico de 62,50 cm (>98%). Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina e sem dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, palato alto e arqueado e erupção prematura dos dentes, porém, sem dolicocefalia. Não foi detectada nenhuma neoplasia/ ou suspeita. Constatou-se, assim, durante os exames clínicos, que o propósito não apresentou peso elevado ao nascimento, porém, crescimento superior ao normal mostrou-se evidentes, tais quais: alta estatura e mãos e pés grandes. Foi realizada

investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 16



L.F.O.N., sexo masculino, nascido a termo de parto cesariano, (36 semanas) foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo pesando 3,350 Kg (>50%), estatura de 54,0 cm (>97,5%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 9 anos revelou peso de 55,000 Kg (>97,5%), estatura de 150,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 57,0 cm (>98%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito apresentou crescimento pré-natal excessivo – alta estatura ao nascimento, crescimento posnatal excessivo – alta estatura pós-natal. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia, porém choro rouco e grave e hipertonia não foram verificados. Quanto aos aspectos craniofaciais presentes, podemos citar apenas: frontal saliente e largo e região occipital achatada uma vez que, orelhas grandes, hipertelorismo ocular, filtro longo e proeminente e micrognatia relativa não estavam presentes. Em relação aos membros apenas deformidades em pés – em varo, em valgo, metatarso aduzido estão presentes enquanto ossos longos com porção distal alargada, camptodactilia, “pads” digitais proeminentes, unhas finas, bastante convexas e encravadas, polegares alargados, clinodactilia em artelhos e extensão reduzida de cotovelo ou joelho não foram verificados no propósito. Outros aspectos clínicos como:

pele redundante e frouxa, hérnia umbilical ou diátese de retos abdominais, hérnia inguinal foram não verificados exceto mamilos invertidos, presentes. Foi realizado exame de RNMC e TCC que não detectaram dilatação ventricular, neoplasia assim como de assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou, na idade cronológica de 9 anos, a idade óssea de 12 anos e 6 meses. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Weaver

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 17



M.G., do sexo masculino nascimento a termo de parto vaginal foi encaminhado do Serviço de Genética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,200 Kg (50%), comprimento de 49,0 cm (<50%) e perímetro cefálico de 39,0 cm (>97,5%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 11 anos e 6 meses revelou peso de 63,000 Kg (>97,5%), estatura de 162,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 61,5 cm(>98%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito não apresentou alta estatura ao nascimento, altura de adulto normal e peso de nascimento maior que 4 Kg. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocefalia e fissuras palpebrais inclinadas para baixo. Mamilos supra-numerários, assim como, acantose nigrans, máculas café-com-leite em pele e angioqueratoma não foram verificados, porém máculas, presentes. Foi realizado exame de TCC que detectou dilatação no 3º ventrículo, sem neoplasia e assimetria corpórea. Exame clínico dos órgãos internos não revelaram sinais clínicos como: intussuscepção intestinal, sangramento retal, pólipos hamartomatosos no íleo, lipomas, tireoidite de Hashimoto e meningiomas. Foi verificada genitália hipercrômicas em glândula ou o pênis hipotonia. Quanto aos aspectos neurológicos, convulsões, atraso

no desenvolvimento da fala e retardo mental leve ou moderado mostraram se ausentes. Foi realizada investigação no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba

Conclusão: não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 18



M.H.B., sexo masculino, nascido a termo de parto cesariano (37 semanas) foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 2,930 Kg (<50%), estatura de 48,5 cm(<50%) e perímetro cefálico de 34,5 cm (<50%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 3 anos revelou peso de 20,000 Kg (>97,5%), estatura de 115,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 50,0 cm (<97,5%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito apresentou alta estatura, crises convulsiva e retardo no desenvolvimento neuropsicomotor. Foram realizados exames de RNMC e TCC que não detectaram dilatação ventricular, assim como, neoplasia ou suspeita e assimetria corpórea. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: macrossomias a definir.

Conclusão: Foi detectado o polimorfismo 943A→G, deverão ser testados os pais do probando para confirmação deste polimorfismo como causa etiológica da doença.

CASO 19



M.S.S., sexo feminina, nascida a termo de parto cesariano, foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,750 Kg (<97,5%), comprimento de 52,0 cm (>97,5%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 8 anos e 1 mês revelou peso de 34,000 Kg (<97,5%), estatura de 139,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 60,0 cm (>98%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito não apresentou crescimento pré-natal excessivo – alta estatura ao nascimento, porém com crescimento pos-natal excessivo – alta estatura pós-natal. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia, porém hipertonia não foi verificada. Quanto aos aspectos craniofaciais presentes, podemos citar apenas: orelhas grandes, região occipital achatada, frontal saliente e largo e micrognatia relativa, uma vez que, hipertelorismo ocular e filtro longo e proeminente não estavam presentes. Em relação aos membros, unhas finas, bastante convexas e encravadas, clinodactilia em artelhos e deformidades em pés – em varo, em valgo, metatarso aduzido estão presentes e enquanto que camptodactilia e polegares alargados

não se mostraram evidentes. Outro aspecto clínico presentes é a pele redundante e frouxa. Foi realizado exame de TCC que não detectaram neoplasia ou suspeita assim como de assimetria corpórea. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Weaver

Conclusão: não foram encontradas alterações nesses genes

CASO 20



M.R.M.A., sexo feminino, nascido a termo de parto cesariano devido a distose de colo foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,400 Kg (<97,5 %), comprimento de 50,0 cm (<97,5%) e perímetro cefálico de 33,0 cm (<50%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 12 anos e 6 meses revelou peso de 80,500 Kg (>97,5%), estatura de 172,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 53,0 cm (>50%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito não apresentou crescimento pré-natal excessivo – alta estatura ao nascimento, porém com crescimento posnatal excessivo – alta estatura pós-natal e idade óssea avançada em relação à idade. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e hipotonia, porém hipertonia e choro rouco e grave não foram verificados. Quanto aos aspectos craniofaciais presentes, podemos citar apenas: orelhas grandes, região occipital achatada, frontal saliente e largo e micrognatia relativa, uma vez que, hipertelorismo ocular e filtro longo e proeminente não estavam presentes. Em relação aos membros, unhas finas, bastante convexas e encravadas, clinodactilia em artelhos e deformidades

em pés – em varo, em valgo, metatarso aduzido estão presentes e enquanto que camptodactilia e polegares alargados não se mostraram evidentes. Outro aspecto clínico presentes é a pele redundante e frouxa. Foram realizados exames de RNMC e TCC que não detectaram dilatação ventricular, neoplasia ou suspeita, assim como de assimetria corpórea. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Weaver

Conclusão: foi detectada a mutação 3693delG, no gene NSD1, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois ela gera um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 21



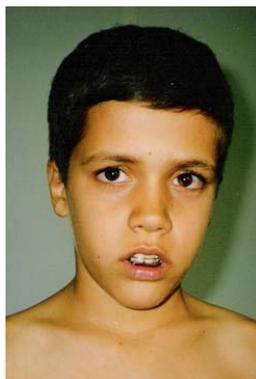
N.R.S., sexo feminino, nascida a termo de parto cesariano (40 semanas) ,foi encaminhada para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 2,900 Kg (<50%), comprimento de 50,0 cm (>50%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 7 anos e 7 meses, revelou peso de 36,000 Kg (97,5%), estatura de 140,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 53,5 cm (<98%). Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito não apresentou peso elevado ao nascimento, porém, crescimentos superiores ao normal mostraram-se evidentes, tais como: alta estatura e mãos e pés grandes. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina e dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, palato alto e arqueado, no entanto, sem erupção prematura dos dentes. Foram realizados exames de RNMC e TCC que não detectaram

neoplasia ou suspeita. A avaliação radiológica evidenciou, na idade cronológica de 2 anos e 7 meses, a idade óssea de 3 anos e 6 meses. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de microdeleções nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 22



N.S.T., sexo masculino, nascido a termo de parto cesariano, foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de exames moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,500 Kg (>50%), comprimento de 52,0 cm (<97,5%) e perímetro cefálico de 36,5 cm (<97,5%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 10 anos e 2 meses, revelou peso de 31,000 Kg (<50%), estatura de 137,0 cm (<50%) e perímetro cefálico de 55,5 cm (>98%). Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou peso elevado ao nascimento, crescimentos superiores ao normal mostraram-se evidentes, tais como: alta estatura e mãos e pés grandes. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, frontal saliente e largo, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, mento saliente e palato alto e arqueado dolicocefalia, porém sem implantação do cabelo na região frontal elevada e dolicocefalia. Foram realizados exames de RNMC e TCC que não detectaram dilatação ventricular, neoplasia/ ou suspeita ou assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou, idade cronológica de 9 anos e 9 meses, a idade óssea de 9 anos. Foi

realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 23

P.C.S., gêmea do caso 24, sexo feminino, nascida a termo, foi encaminhadas para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informação da mãe, a gestação dos propósitos foi sem intercorrências e o mesmo nasceu pesando 2,490 Kg (>2,5%), estatura de 49,0 cm (50%) e perímetro cefálico de 34,0 cm (50%). O propósito, submetida à avaliação clínica aos 7 anos e 2 meses, revelou peso de 30,500 Kg (<97,5%), estatura de 132,5 cm (97,5%) e perímetro cefálico de 55,5 cm (>98%). Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou peso elevado ao nascimento, crescimentos superiores ao normal mostraram-se evidentes, tais como: alta estatura e mãos e pés grandes. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina, porém, sem dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, mento saliente, porém não há sinais de hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, palato alto e arqueado e erupção prematura dos dentes. Não foram detectadas neoplasias ou assimetria corpórea.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Foi detectada a mutação 3693delG, no gene NSD1, esta mutação é a provável causa do fenótipo macrossômico, pois ela gera um códon de parada, gerando uma proteína truncada.

CASO 24

P.C.S., gêmea do caso 23, sexo feminino, nascida a termo, foi encaminhadas para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informação da mãe, a gestação dos propósitos foi sem intercorrências e o mesmo nasceu pesando 2,490 Kg (>2,5%), estatura de 47,0 cm (2,5%) e perímetro cefálico de 33,0 cm (<50%). O propósito, submetida à avaliação clínica aos 7 anos e 2 meses, revelou peso de 32,500 Kg (<97,5%), estatura de 136,5 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 57,0 cm (>97%). Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou peso elevado ao nascimento, crescimentos superiores ao normal mostraram-se evidentes, tais como: alta estatura e mãos e pés grandes. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo e mento saliente, no entanto, hipertelorismo ocular, fendas palpebrais para baixo, palato alto e arqueado e erupção prematura dos dentes não foram observados. Foi realizado exame de TCC que não detectou neoplasia ou suspeita ou assimetria corpórea.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Não foram encontradas alterações nos genes pesquisados.

CASO 25

P.V.S., sexo masculino, nascido a termo de parto cesariano, foi encaminhado para o Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 4,250 Kg (>97,5%), comprimento de 51,0 cm (>50%) e perímetro cefálico de 34,0 cm (<50%). O propósito submetido à avaliação clínica aos 13 anos e 5 meses revelou peso de 71,200 Kg (>97,5%), estatura de 159,0 cm (<97,5%) e perímetro cefálico de 57,0 cm (>98%). Constatou-se, assim, durante o exame clínico, que o propósito apresentou alta estatura ao nascimento, altura de adulto normal e peso de nascimento maior que 4 Kg. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocefalia e estrabismo, porém, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, pseudopalpiloedema e corpo caloso alargado a neuroimagem. Mamilos supra-numerários não foram observados. Foram verificados sinais clínicos como: acantose nigra e máculas café-com-leite em pele. Foi realizado exame de RNMC que detectou dilatação ventricular, sem neoplasia/ ou suspeita e assimetria corpórea. Exame clínico dos órgãos internos não revelou sinais clínicos como: sangramento retal, pólipos hamartomatosos no íleo, hemangiomas, tireoidite de Hashimoto e Tumor tireoidiano de células foliculares. Não foi verificada genitália hipercrômica em glândula ou o pênis hipotonia. Quanto aos aspectos neurológicos, convulsões, atraso no desenvolvimento da fala e retardo mental leve ou moderado mostraram-se presentes. A avaliação radiológica evidenciou na idade cronológica da 13 anos, a idade óssea de 14 anos e. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Bannayan-Zonana

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

CASO 26

Y.V.E., sexo feminino, nascimento pré-termo de parto cesariano devido ao feto macrossômico e a onfaloce fetal (36 semanas), foi encaminhada ao Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de exames moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,180 Kg (>50%), comprimento de 48,0 cm (<50%) e perímetro cefálico de 31,0 cm (<2,5%). O propósito, submetido à avaliação clínica aos 2 anos e 10 meses, revelou peso de 15,000 Kg (>50%), estatura de 97,0 cm (97,5%) e perímetro cefálico de 47,0 cm (50%). Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: fâcie característica – hipoplasia de face média e prega em região de pálpebra inferior; sulcos na parte anterior do lóbulo da orelha / pits em região posterior de hélice e fenda de palato não foram observados. Nevos hemangiomaso plano em face presente na pele. Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou macrossomia, prematuridade e hipoglicemia neonatal, porém, sem apresentar Tumor embrionário ou um quadro de polidramnio. Exames clínicos dos órgãos internos revelaram hemihiperplasia, definida como crescimento assimétrico de regiões do corpo; onfalocele ou hérnia umbilical; diástese de retos abdominais e visceromegalia, no entanto, não foram verificados alterações como: malformações vasculares de aspecto capilar, anormalidades renais, incluindo anormalidade estrutural, nefromegalia e nefrocalcinose e cardiomegalia ou anomalia cardíaca estrutural. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Beckwith-Wiedmann

Conclusão: foi detectado o polimorfismo 23C→A, deverão ser testados os pais do probando para a confirmação como este polimorfismo como causa etiológica da doença.

CASO 27



G.S.M., sexo masculino, nascido a termo de parto vaginal (36 semanas), foi encaminhado ao Serviço de Aconselhamento Genético de Botucatu (SAG) para a realização de análises moleculares nos genes NSD1 e PTEN. Segundo informações da mãe a gestação do propósito foi sem intercorrências, e o mesmo nasceu pesando 3,575 Kg (<97,5%), comprimento de 52,0 cm (<97,5%) e perímetro cefálico de 36,0 cm (>50%). O propósito, submetido à avaliação clínica ao 1 anos e 6 meses, revelou peso de 14,500 Kg (<97,5%), estatura de 89,0 cm (>97,5%) e perímetro cefálico de 53,0 cm (>97,5%). Constatou-se, durante o exame clínico, que o propósito apresentou peso elevado ao nascimento, crescimentos superiores ao normal mostraram-se evidentes, tais como: alta estatura e mãos e pés grandes. Além disso, demonstrou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da coordenação motora fina e dificuldades respiratórias e de alimentação no período neonatal. Quanto aos aspectos craniofaciais que estavam presentes, podemos citar: macrocrania, dolicocefalia, implantação do cabelo na região frontal elevada, frontal saliente e largo, fendas palpebrais para baixo, mento saliente, palato alto e arqueado, porém, não foi observada erupção prematura dos dentes e hipertelorismo ocular. Foi realizado exame de TCC que

detectou dilatação ventricular e nenhuma neoplasia/ ou suspeita, assim como assimetria corpórea. A avaliação radiológica evidenciou, na idade cronológica de 1 ano e 6 meses, a idade óssea de 2 anos. Foi realizada investigação de microdeleções no gene NSD1 e pesquisa de mutações nos genes NSD1 e PTEN.

Diagnóstico: Síndrome de Sotos

Conclusão: Não foram encontradas alterações nesses genes.

Anexo V
Resultados
Moleculares

**Géis de poliacrilamida utilizados para a realização de análise de
microdeleções por microssatélites polimórficos**

FIGURA 1. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 1. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de poliacrilamida 6% desnaturante *a*.

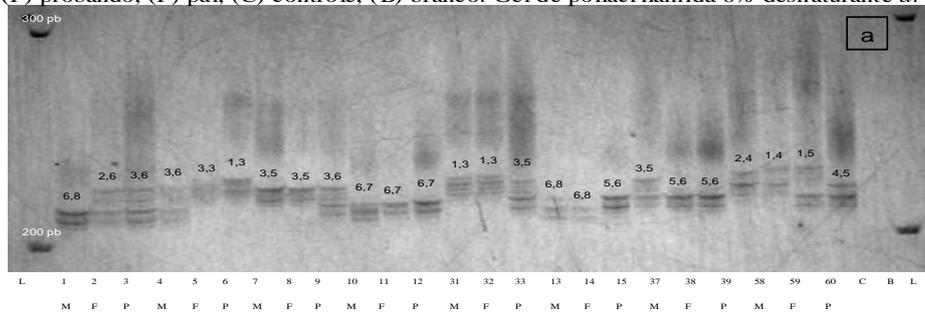


FIGURA 2. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 01. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de poliacrilamida 6% deanaturante *b*.

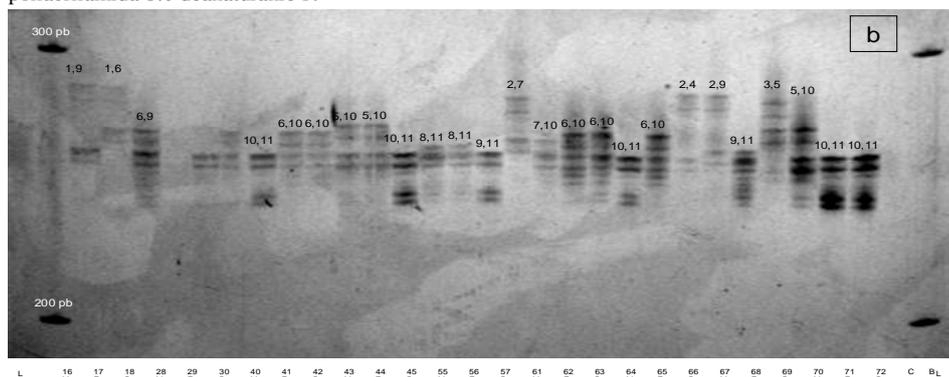


FIGURA 3. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 1. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante *c*.

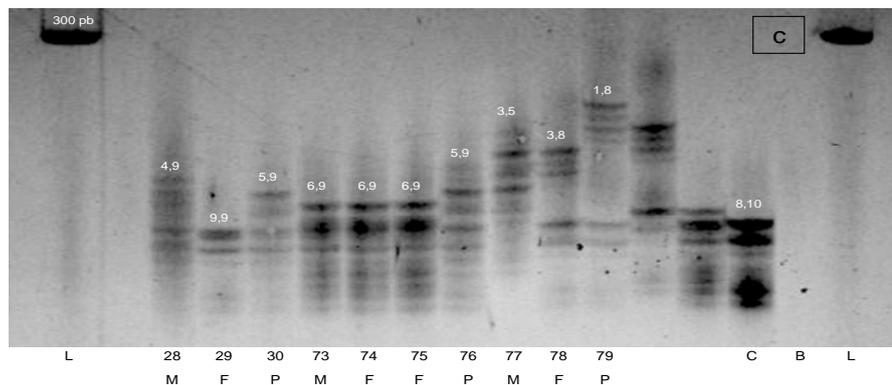


FIGURA 4. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 10. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante *a*.

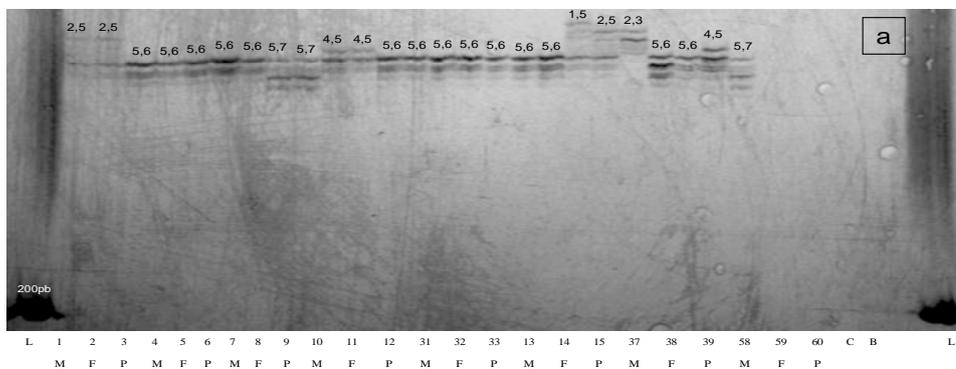


FIGURA 5. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 10. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de poliacrilamida 6% desnaturante *b*.

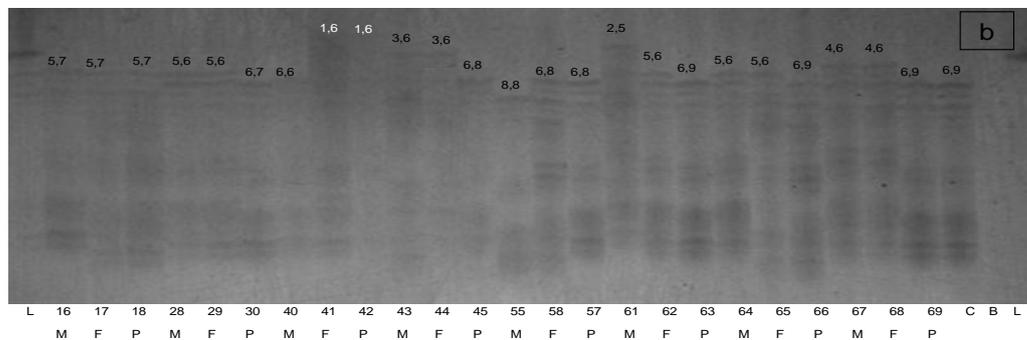


FIGURA 6. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 10. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco; gel de poliacrilamida 6% desnaturante *c*.

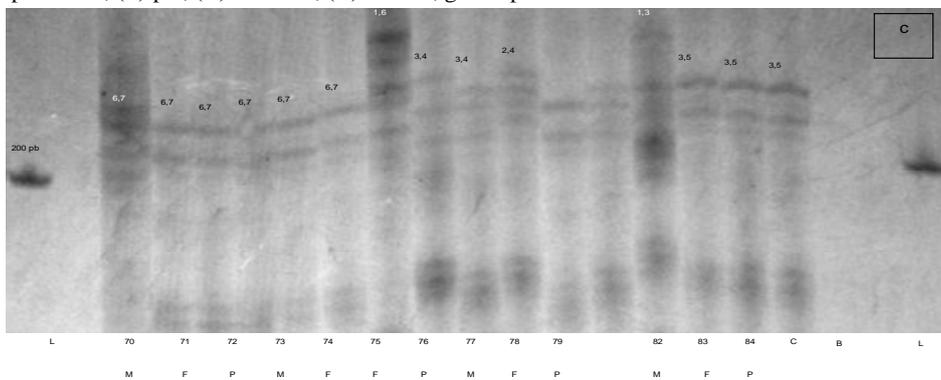


FIGURA 7. Genotipagem do marcador microsatélite SOT 11. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de poliacrilamida 6% desnaturante a.

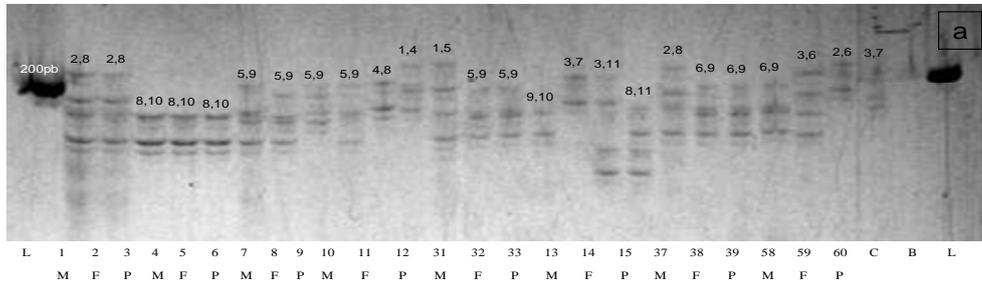


FIGURA 8. Genotipagem do marcador microsatélite SOT 11. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante b.

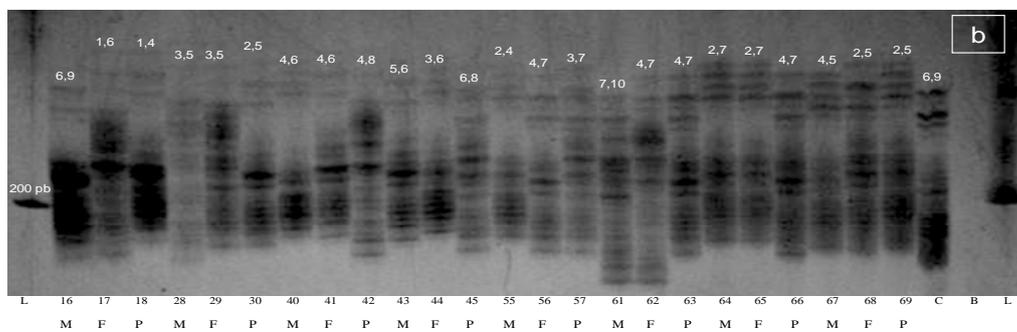


FIGURA 9. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 11. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante c.

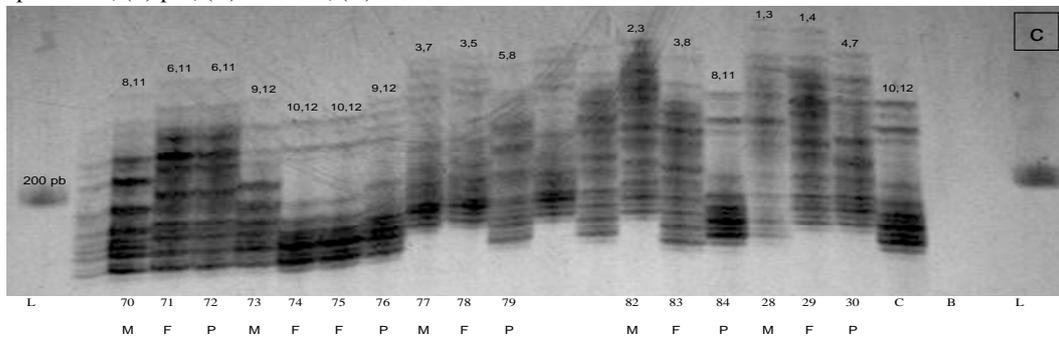


FIGURA 10. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 12. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante a.

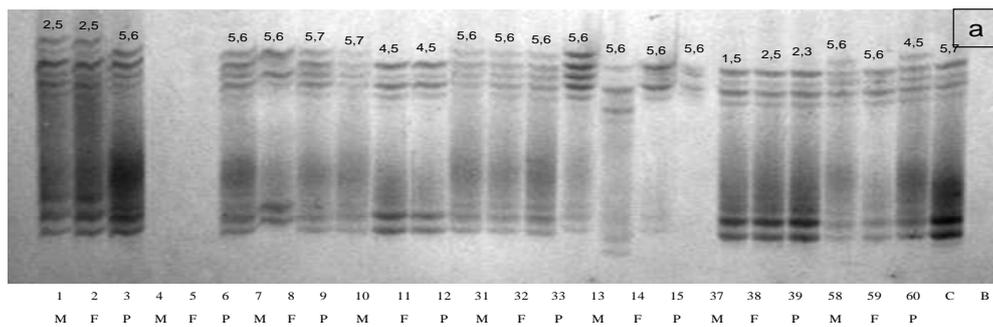


FIGURA 11. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 12. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante b.

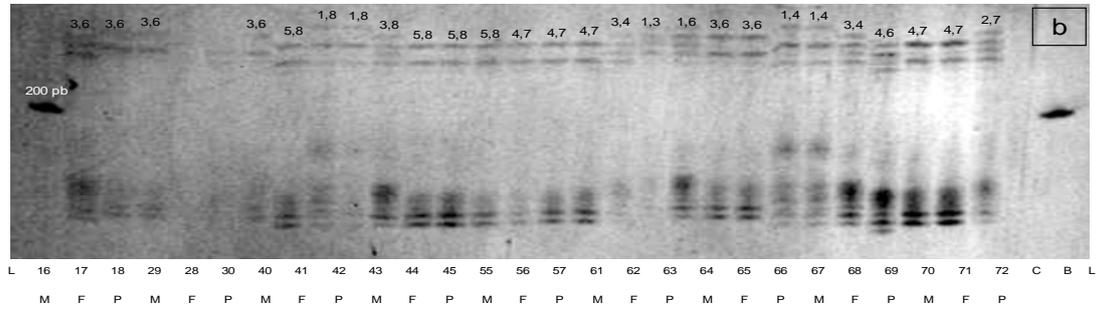


FIGURA 12. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 12. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante c.

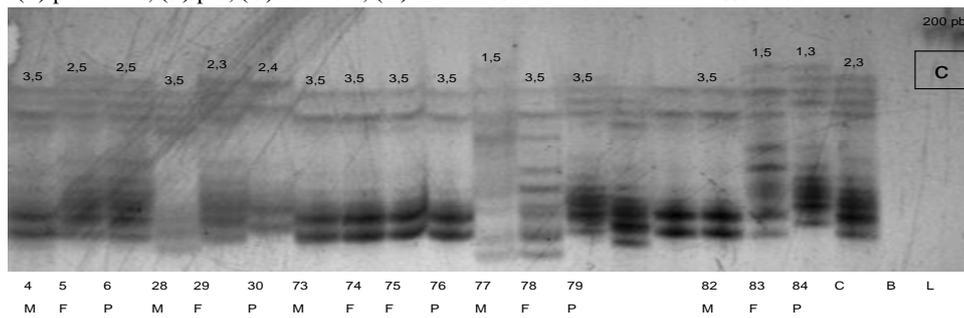


FIGURA 13. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 13. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante a.

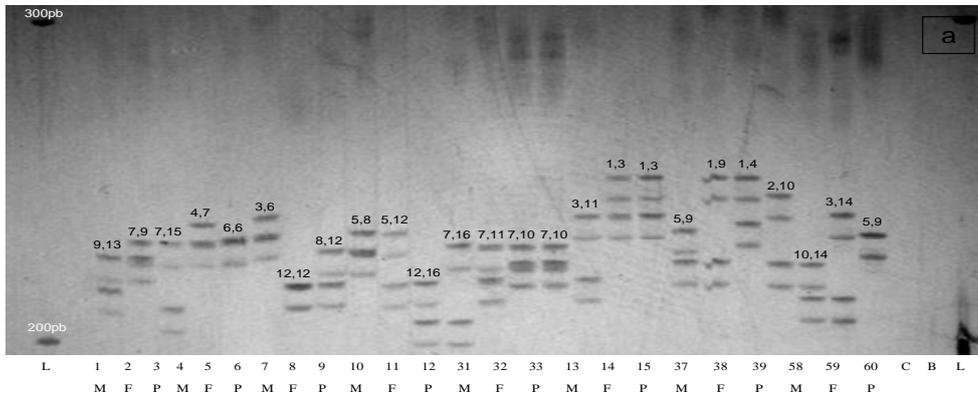


FIGURA 14. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 13. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante b.

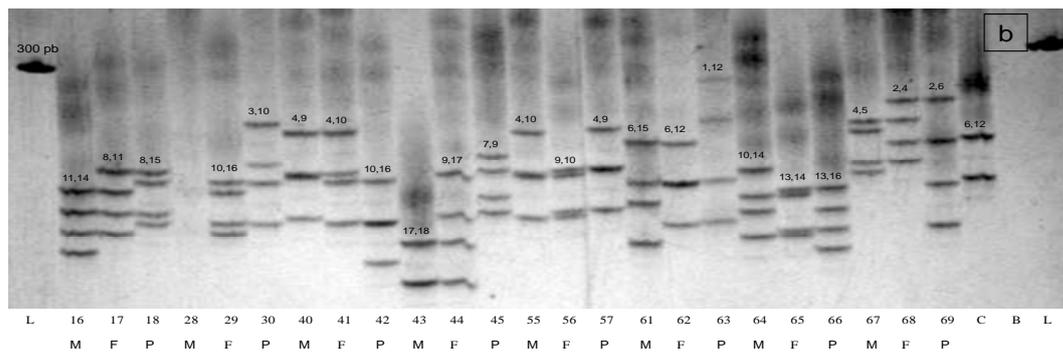


FIGURA 15. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 13. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de poliacrilamida 6% desnaturante c

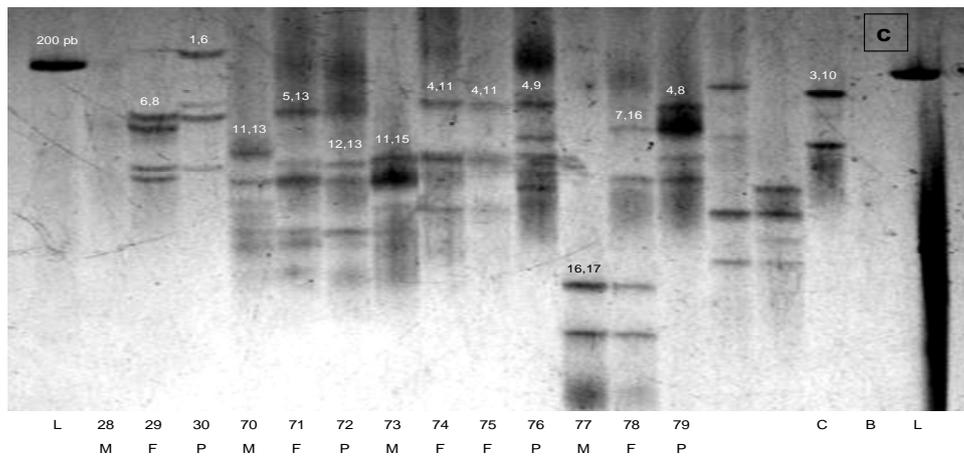


FIGURA 16. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 13. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco; gel de poliacrilamida 6% desnaturante d.

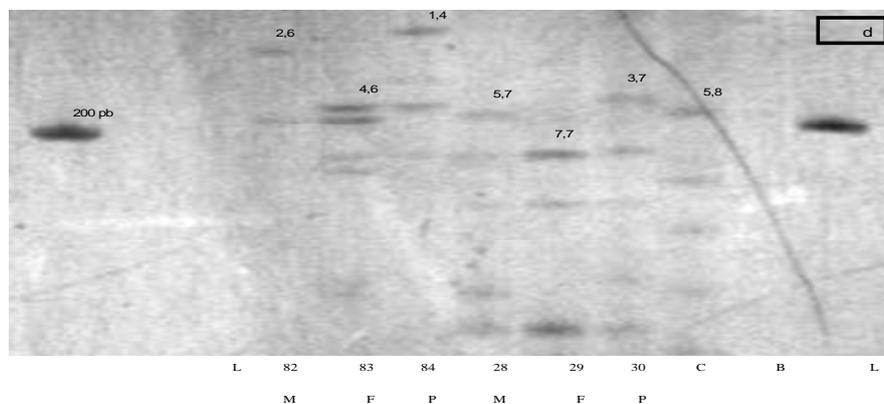


FIGURA 19. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 17. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco. Gel de Poliacrilamida 6% desnaturante c.

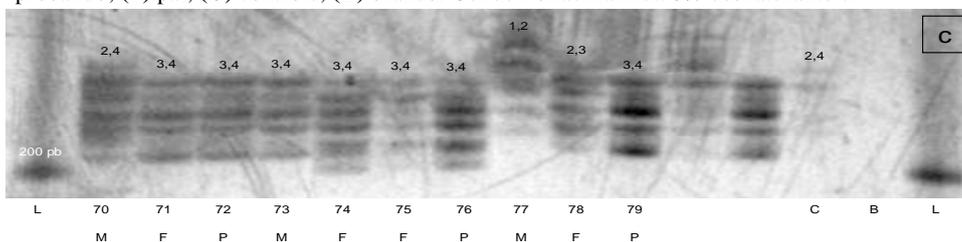
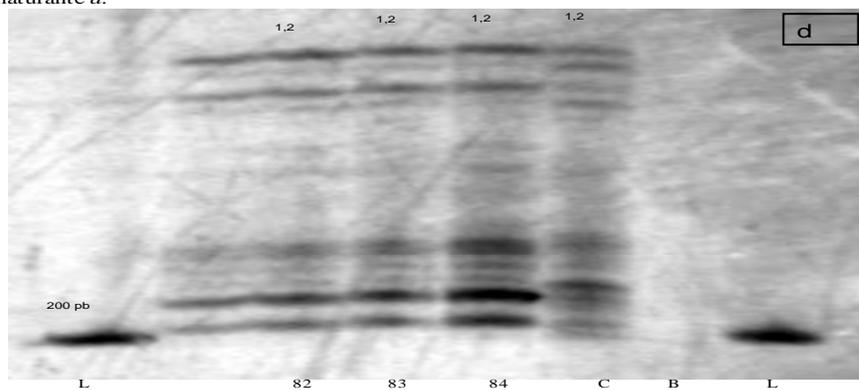


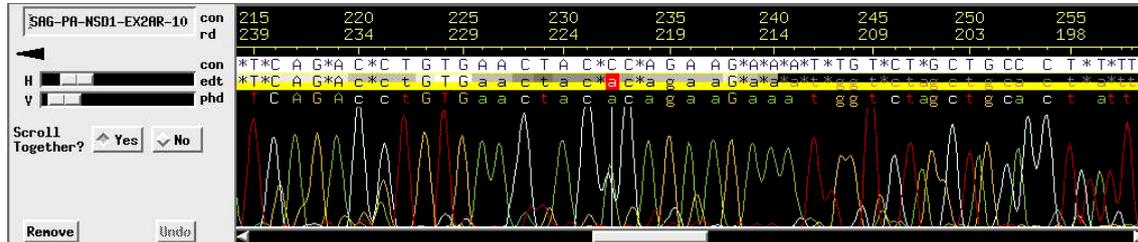
FIGURA 20. Genotipagem do marcador microssatélite SOT 17. Sendo (L) *ladder*; (M) mãe; (F) probando; (P) pai; (C) controle; (B) branco; Gel de poliacrilamida 6% desnaturante d.



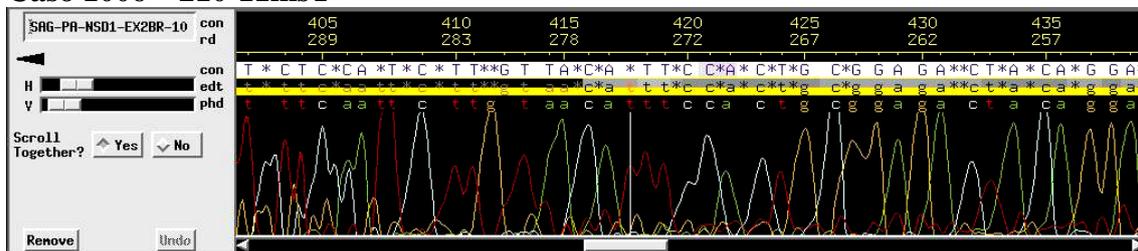
Eletoferogramas mostrando as mutações encontradas na amostra estudada

Gene NSD1

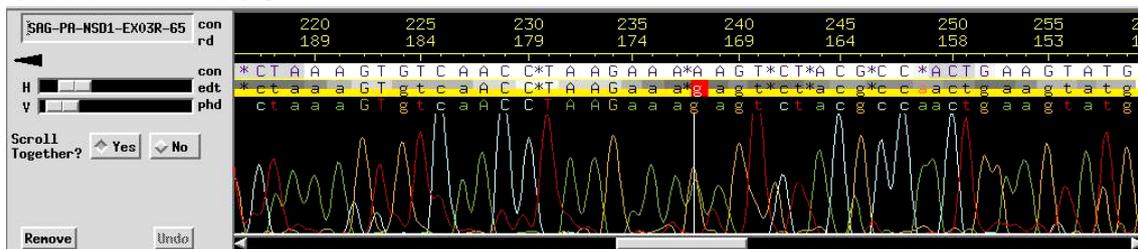
Caso 1009 – 23C→A



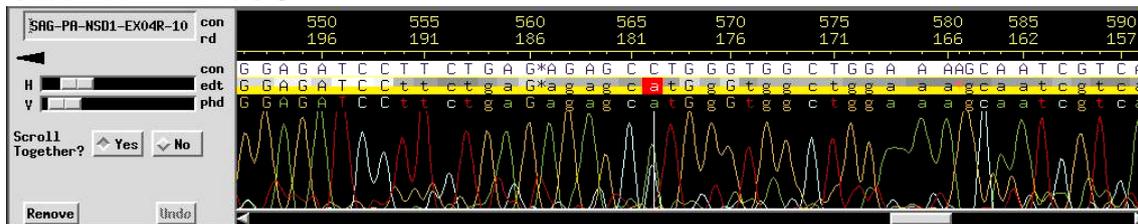
Caso 1006 – 210-11insT



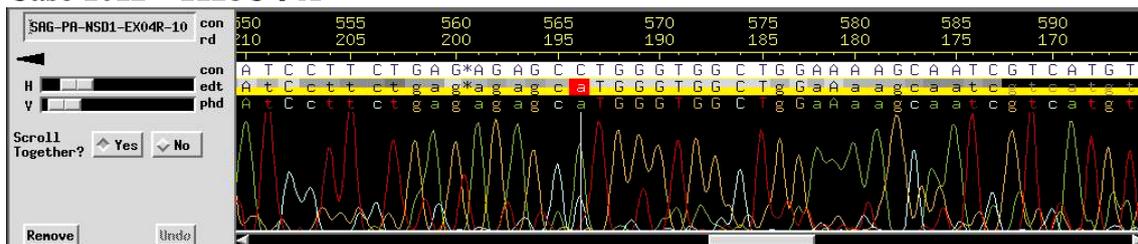
Caso 6571 - 943C→A



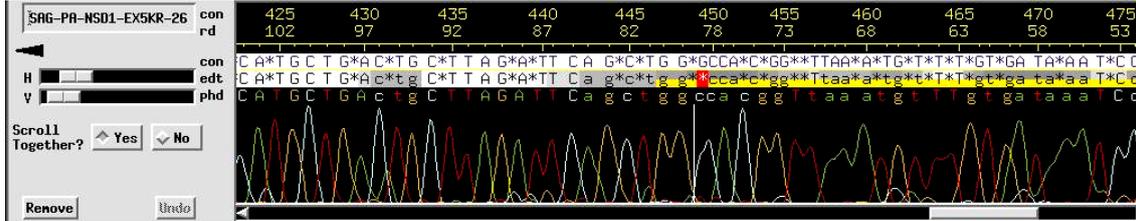
Caso 1007 – 1128C→A



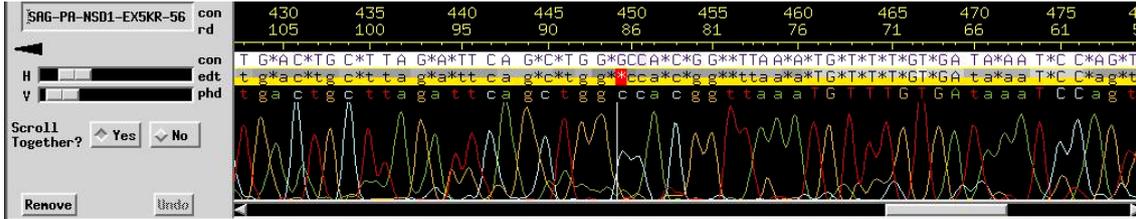
Caso 1012 – 1128C→A



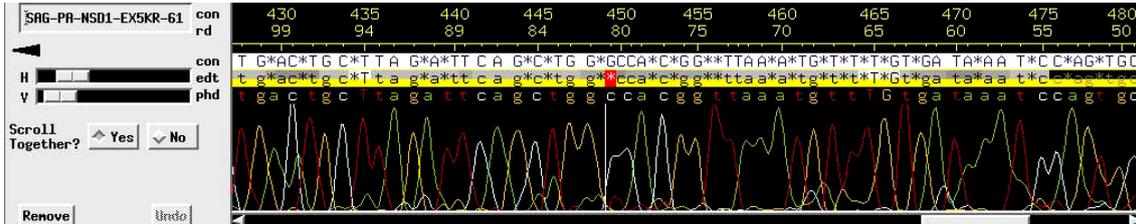
Caso 2365 – 3693delG



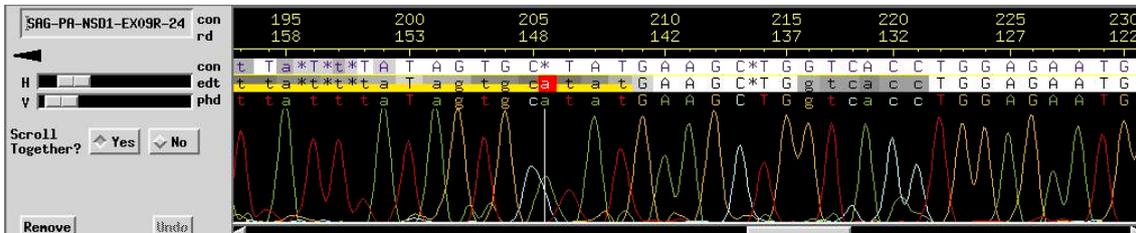
Caso 5657 – 3693delG



Caso 6136 – 3693delG



Caso 2419 – 4305insA



Gene PTEN

Caso 1108 – 1918-19insG

