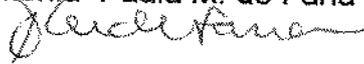


GISELE SANTOS DE OLIVEIRA

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Genética Médica da aluna **Gisele Santos de Oliveira**.

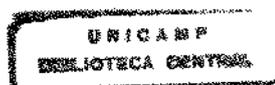
Campinas, 07 de abril de 2000.

Profa. Dra. Antonia Paula M. de Faria
Orientadora 

***ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DE
INDIVÍDUOS COM CARACTERÍSTICAS DA
SÍNDROME KABUKI***

CAMPINAS
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



GISELE SANTOS DE OLIVEIRA

***ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DE
INDIVÍDUOS COM CARACTERÍSTICAS DA
SÍNDROME KABUKI***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de concentração em Genética Médica.

Orientador: Profa. Dra. Antonia Paula Marques-de-Faria (DGM-FCM)

Co-Orientador: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato (CBMEG) UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

CAMPINAS
2000

DE BC
ARMADA:
M
41254
278/00
R.B.11,00
30-06-00
PD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M-00142281-0

O14e Oliveira, Gisele Santos de
Estudo genético-clínico de indivíduos com características da
Síndrome Kabuki / Gisele Santos de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.],
2000.

Orientadores : Antonia Paula Marques de Faria, Edi Lúcia
Sartorato
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Anomalias humanas – Aspectos genéticos. 2. Retardamento
mental. 3. Anomalia cromossômica. 4. Genética humana. I. Antonia
Paula Marques de Faria. II. Edi Lúcia Sartorato. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Paula Marques-de-Faria

Membros:

1.

Dr. Fernando Politi

2.

Dr. André Y. Gonçalves

3.

Dr. Marcelina

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07/04/02

Anjo

“Graças, Senhor, porque me ofertastes, em nome do amor, um anjo que me guarda.

Ele abranda a minha fome, não me permite o rancor.

*É sempre que se retarda a graça que tanto quero, me arma de paciência e, cheia de
fé, espero...*

*Surge sempre que a sombra da descrença, da tristeza, sobre minha alma desce.
Acende a luz da esperança, de novo o meu riso cresce: do mundo vejo a beleza e meu
pensamento dança.*

*Se um gesto cruel me fere, sua mão vem me curar e me faz inda mais viva para
amando caminhar...”*

Maria Meinelles

*À minha mãe, o anjo que me foi ofertado.
Sem ela, eu não seria o que sou, nem chegaria aonde estou.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós, pela presença constante a cada passo dado e decisão tomada, pela sabedoria e pelos ensinamentos recebidos. Porque acreditaram,

Aos pais dos pacientes atendidos e seus responsáveis, pois se meu trabalho aconteceu, foi por eles,

À Prof. Dra. Antonia Paula Marques-de-Faria, por sua paciência, conhecimento, análise, orientação e, acima de tudo, amizade,

À Prof. Dra. Edi Lúcia Sartorato, pois sem ela eu não conseguiria mudar de NDA para DNA,

Aos Profs. Drs. Andrea Trevas Maciel-Guerra, Rui Fernando Pilotto, Denise Yvone Javanowitz Norato e Ana Beatriz Alvarez Perez por terem, gentilmente, aceito participarem da banca examinadora,

Ao Prof. Dr. Roberto Benedito de Paiva e Silva, pelo apoio dado a mim e aos pacientes,

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna, pelo auxílio com os cálculos estatísticos,

Ao Dr. Raul C. Ribeiro, diretor do International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, pela confiança, suporte, incentivo e toda a ajuda recebida,

À Prof. Noemi que, gentil e prontamente, ofereceu seus conhecimentos para a correção deste manuscrito,

Aos amigos verdadeiros, os quais eu não preciso enumerar.

À Maria Celia e José Renato, simplesmente por estarem ali,

À Maria Madalena V. Rosa (Madá), pois sem suas "poções mágicas", eu não teria resultados,

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética e da Secretaria do Departamento de Genética Médica da FCM - UNICAMP, pela ajuda com os exames e com a parte burocrática,

Aos amigos Emerson e Leonardo, do Laboratório de Informática e à equipe da Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional, da FCM - UNICAMP. Se não fosse por eles, este trabalho seria em preto-e-branco,

À Carmen Sílvia dos Santos, secretária da Sub-Comissão da Pós-Graduação da FCM - UNICAMP, foram muitas idas-e-vindas e a ajuda, sempre presente,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo suporte financeiro,

Ao "Meu Natal". "If equal affection cannot be, let the more loving one be me"

(W.H. Auden - The More Loving One).

ACKNOWLEDGMENT

Special thanks to:

Dr. Susana Raimondi and Dr. Susan Mathew, Cytogenetics/Molecular Cytogenetics Laboratory, St Jude Children's Research Hospital, for their kindness and important contributions and discussions on the FISH results,

Dr. Norio Niikawa, Department of Human Genetics, Nagasaki University School of Medicine, for his kind and helpful comments on Kabuki syndrome,

The Kabuki Syndrome Network (<http://www.dlcwest.com/~kabuki>), specially Margot Schmiedge, for her long distance friendship, help and support, and Jos Vergouwen, for allowing use of the KSN logo,

Jim, for his valuable help in the FISH procedures, encouragement, and irreplaceable friendship.

"Despite of all the best interventions of modern Medicine, the death rate will always remain the same - precisely one per person". (Robert Buckman, 1992)

[A despeito das melhores intervenções da medicina moderna, o índice de mortalidade será sempre o mesmo – exatamente 1:1]

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HISTÓRICO E SINONÍMIA	3
1.2. EPIDEMIOLOGIA	5
1.3. ASPECTOS CLÍNICOS	6
1.3.1. Sinais principais.....	6
1.3.2. Anomalias associadas	7
1.3.3. Anomalias ocasionais.....	9
1.3.4. Evolução e complicações	11
1.3.5. Variabilidade fenotípica e diagnósticos associados.....	12
1.4. ETIOLOGIA	13
 2. JUSTIFICATIVA	 17
 3. OBJETIVOS.....	 21
1.1. GERAIS	23
1.2. ESPECÍFICOS	23
 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	 25
4.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	27
4.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA	27
4.3. ESTUDO CITOGENÉTICO	29
4.3.1. Técnica de obtenção de metáfases a partir do cultivo temporário de linfócitos de sangue periférico	29
4.3.2. Técnica para obtenção de metáfases em cultura de linfócitos periféricos favorecendo a expressão dos sítios frágeis sensíveis ao folato.....	29
4.3.3. Procedimento rápido da técnica de FISH (<i>fluorescence in situ hybridization</i>) para detecção de cromossomos X e Y em núcleos interfásicos.....	30
4.4. ANÁLISE MOLECULAR.....	31
4.4.1. Técnica para extração de DNA sanguíneo	31

4.4.2. Técnica para extração de DNA de saliva	32
4.4.3. Amplificação dos exons do gene TUBA2 a partir do DNA genômico	34
4.5. CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES CONSIDERANDO A CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE SK	37
4.6. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM DADOS DA LITERATURA	37
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS	39
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	41
5.1.1. Razão de sexo	48
5.1.2. Média das idades materna e paterna por ocasião do nascimento	49
5.1.3. Dados familiares	49
5.1.4. Antecedentes gestacionais	50
5.1.5. Antecedentes peri e neonatais	50
5.1.6. Desenvolvimento neuropsicomotor	51
5.1.7. Dados antropométricos	52
5.1.8. Alterações crânio-faciais	52
5.1.9. Alterações do sistema nervoso central	53
5.1.10. Anomalias esqueléticas	53
5.1.11. Dermatoglifos	54
5.1.12. Avaliação cardiológica	54
5.1.13. Avaliação oftalmológica	55
5.1.14. Avaliação otorrinolaringológica	55
5.1.15. Alterações imuno-hematológicas	56
5.1.16. Outros achados	56
5.2. ANÁLISE CROMOSSÔMICA	57
5.3. ANÁLISE MOLECULAR	57
5.4. DIAGNÓSTICOS DO GRUPO B	58
6. DISCUSSÃO	59
6.1. QUANTO À CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	63

6.1.1. Idade	63
6.1.2. Razão de sexo	64
6.1.3. Idade dos genitores	64
6.1.4. Dados familiares	64
6.1.5. Etnias.....	65
6.1.6. Antecedentes gestacionais, peri e neonatais.....	65
6.1.7. Desenvolvimento neuropsicomotor	66
6.1.8. Antropometria.....	66
6.1.9. Alterações de sistema nervoso central	67
6.1.10. Anomalias esqueléticas	67
6.1.11. Dermatóglifos	67
6.1.12. Avaliação cardiológica.....	68
6.1.13. Avaliação oftalmológica	68
6.1.14. Alterações otorrinolaringológicas.....	68
6.1.15. Alterações imuno-hematológicas.....	69
6.1.16. Outros achados	69
6.2. ANÁLISE CROMOSSÔMICA.....	69
6.3. ANÁLISE MOLECULAR.....	70
6.4. DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS DA SK	70
6.4.1. Aberrações cromossômicas	70
6.4.2. Síndrome de Noonan	74
6.4.3. Casos de etiologia não esclarecida	76
7. CONCLUSÕES	77
8. SUMMARY	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
10. ANEXOS	101
10.1. ANEXO 1 - CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO	103
10.2. ANEXO 2 - PROTOCOLO CLÍNICO PARA DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME KABUKI.....	107
10.3. ANEXO 3 - SOLUÇÕES.....	109

LISTA DE TABELAS

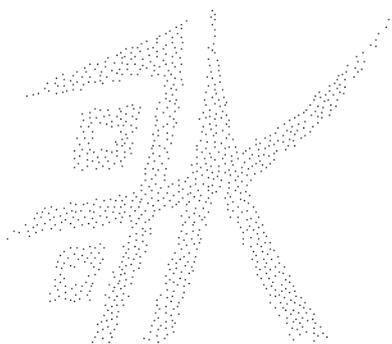
Tabela 4.1 – Seqüência e tamanho dos iniciadores (<i>primers</i>) do gene TUBA2.....	34
Tabela 4.2 - Tempos, temperaturas e números de ciclos dos iniciadores.....	35
Tabela 5.1 – Resultados da avaliação clínica dos pacientes do Grupo A.....	45
Tabela 5.2 – Resultados dos exames complementares dos pacientes do Grupo A.....	46
Tabela 5.3 – Resultados da avaliação clínica dos pacientes do Grupo B.....	47
Tabela 5.4 – Resultados dos exames complementares dos pacientes do Grupo B.....	48
Tabela 6.1 – Comparação entre as características clínicas dos pacientes avaliados no presente estudo, com as daqueles analisados por WILSON (1998)[n=13] e KAWAME <i>et al.</i> (1999)[n=18], bem como com as do total de indivíduos incluídos nesses 2 artigos[n=201].....	62
Tabela 6.2 – Comparação entre os resultados dos exames complementares dos pacientes avaliados no presente estudo, com os daqueles analisados por WILSON (1998)[n=13] e KAWAME <i>et al.</i> (1999)[n=18], bem como com os do total de indivíduos incluídos nesses dois artigos [n=201].....	63
Tabela 6.3 – Comparação dos sinais clínicos apresentados pela paciente 12, os da SK e os da monossomia 18p.....	71
Tabela 6.4 - Comparação entre os sinais clínicos das pacientes 11 e 15, os da SK e os da ST.....	73
Tabela 6.5 – Comparação entre os sinais clínicos dos pacientes 14, 16 e 18, os da SK e os da SN.....	74

Figura 1.1- Exemplos de maquiagem do teatro Kabuki © *Michael Spencer 1999*.....04

Figura 5.1 – Aspecto facial dos pacientes 1 a 10 do Grupo A.....43

Figura 5.2 – Aspecto facial dos pacientes 11 a 18 do Grupo B.....44

A síndrome Kabuki (SK), descrita pela primeira vez no Japão, em 1981, por NIIKAWA *et al.* e KUROKI *et al.*, é uma condição rara, de etiologia desconhecida, caracterizada por *facies* peculiar, com sobrancelhas arqueadas, fendas palpebrais alongadas e evertidas no terço distal, lembrando a maquiagem usada pelos atores do teatro Kabuki, além de retardo mental, baixa estatura, anomalias esqueléticas e de padrão dermatoglífico. Sua incidência no Japão foi estimada em 1:32.000, sendo considerada ainda mais rara fora desse país, dado que vem sendo contestado pelo registro crescente de casos em populações não orientais. No Brasil, são poucos os relatos a respeito, em geral correspondendo a descrições de casos esporádicos e não ao resultado de um estudo sistemático, o que motivou o presente trabalho. Entre junho de 1998 e dezembro de 1999, 18 indivíduos com características da SK, predominantemente caucasóides, foram examinados seguindo um protocolo específico de avaliação, desenvolvido a partir das principais manifestações da condição. Entre os exames complementares, foi incluída a análise molecular do gene TUBA2, devido à sugestão de que houvesse alguma relação do mesmo com a SK, o que não se confirmou. O diagnóstico foi mantido em 10 pacientes (3 meninas e 7 meninos), enquanto entre os 8 restantes (4 meninas e 4 meninos), 3 receberam diagnóstico de síndrome de Noonan (SN), 2 de síndrome de Turner (ST), 1 de monossomia 18p, e 2 ainda permaneceram sem etiologia definida. Entre aqueles com SK, 100% tinham o aspecto facial peculiar dessa condição e retardo mental em graus variados, 80% mostraram alterações dermatoglíficas, 60% apresentaram anomalias vertebrais e a baixa estatura foi evidenciada em 50%. Quando comparada a outros estudos, a presente amostra foi similar à maioria deles, praticamente em todos os aspectos. Não houve desvio da razão de sexo, bem como relato de consanguinidade entre os genitores ou de recorrência familiar. O protocolo de investigação utilizado mostrou-se adequado enquanto instrumento de caracterização da amostra, sendo sugerida sua aplicação sistemática na investigação diagnóstica de indivíduos com hipótese inicial de SK. Merece destaque o fato das características faciais ocorrerem ainda em outras entidades, apontando para um possível fenótipo Kabuki determinado pela associação de fenda palpebral alongada, eversão de terço distal de pálpebra inferior e sobrancelhas arqueadas. Ficou mais evidente a concomitância de sinais com relação à ST, em especial nos casos associados a anéis do cromossomo X, bem como com a SN, reforçando a necessidade de uma avaliação criteriosa que considere tais diagnósticos diferenciais. Estudos mais detalhados, envolvendo diferentes centros e levando em conta esses aspectos, poderiam contribuir para uma melhor caracterização da SK.



1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO E SINONÍMIA

A síndrome Kabuki (SK) (OMIM147920)*, também conhecida como síndrome da maquiagem do teatro Kabuki, ou ainda pelo epônimo de Niikawa-Kuroki, foi descrita pela primeira vez por NIIKAWA *et al.* (1981) e KUROKI *et al.* (1981), como uma condição rara, de causa desconhecida, caracterizada pela associação de *facies* peculiar, atraso do crescimento pós-natal e retardo mental, além de outras anomalias. Os dois grupos descreveram, de forma independente, um total de 10 crianças japonesas não aparentadas, cujos dismorfismos faciais lembravam a maquiagem utilizada pelos atores do teatro japonês conhecido como Kabuki.

Nessa forma de expressão teatral, os atores costumam pintar o rosto delineando de maneira expressiva o contorno das pálpebras e alongando-as, além de arquearem as sobrancelhas e tornarem-nas levemente mais afiladas no terço distal (figura 1.1). Daí a denominação inicial de síndrome da maquiagem do teatro Kabuki (NIIKAWA *et al.*, 1981). Entretanto, embora esse termo venha sendo usado desde então, alguns autores recomendaram que a expressão “maquiagem” fosse retirada da designação, pois poderia ser constrangedora e interpretada pelas famílias de forma equivocada, ou mesmo ofensiva. (SCHRANDER-STUMPEL *et al.*, 1994; BURKE & JONES, 1995; McKUSICK, 1996).

Em 1998, WILSON sugeriu que a melhor designação seria a de síndrome de Niikawa-Kuroki, por considerar que os pacientes de ascendência não-asiática teriam, em geral, dismorfismos faciais menos marcantes, ficando mais com uma “aparência oriental” e não com a *facies* semelhante a da maquiagem do teatro Kabuki.

* On-line Mendelian Inheritance in Man – catálogo numerado de genes humanos e doenças genéticas

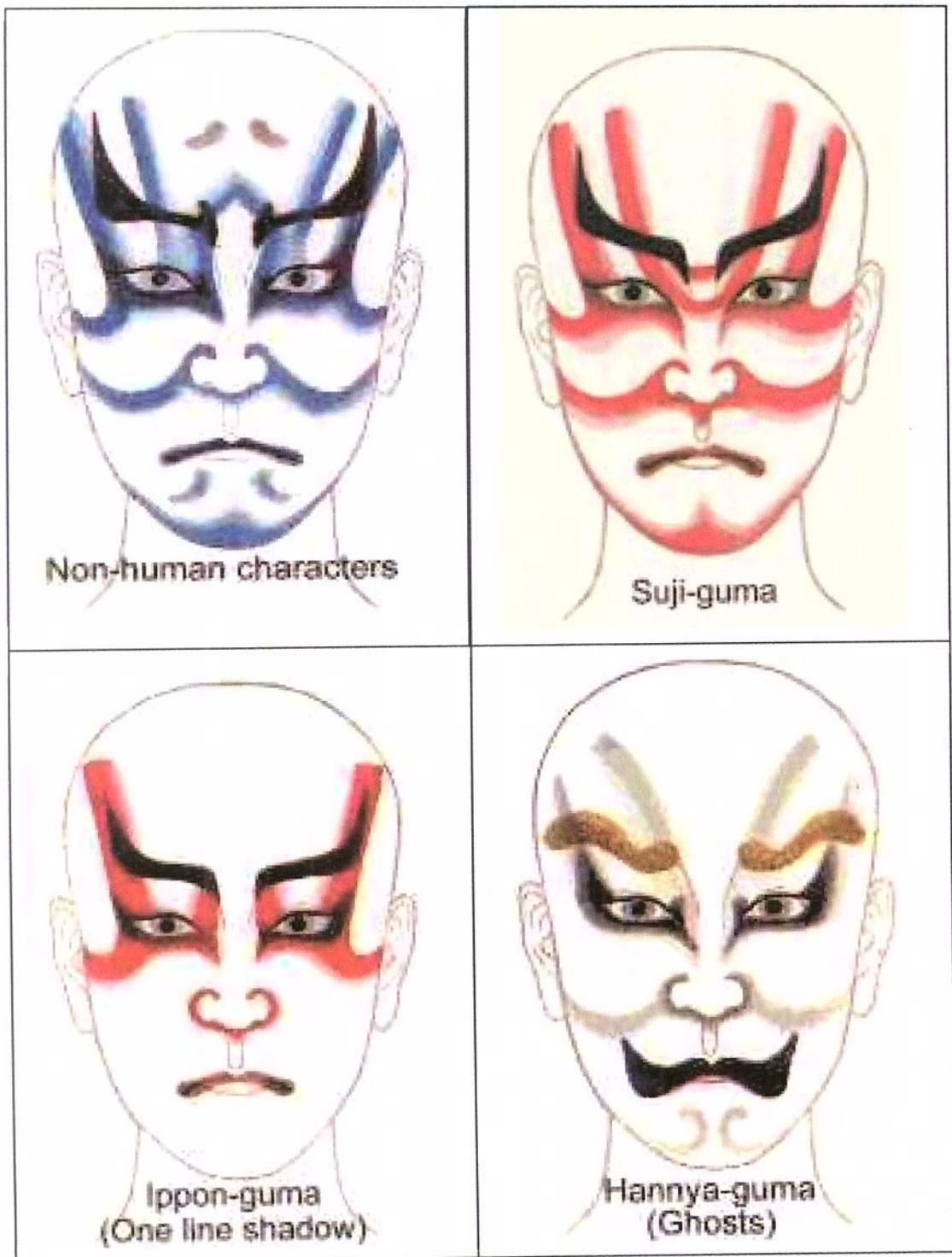


Figura 1.1- Exemplos de maquiagem do teatro Kabuki © Michael Spencer 1999

1.2. EPIDEMIOLOGIA

A freqüência da SK no Japão foi estimada em 1:32.000 nascidos-vivos, com base nos dados obtidos em um estudo extenso realizado por NIKAWA *et al.* (1988), no qual foram incluídos 62 indivíduos, sendo 58 japoneses e 4 caucasóides, oriundos de 33 instituições, 31 delas japonesas.

Para o cálculo, levou-se em conta que pelo menos 10 pacientes haviam sido avaliados em um serviço de referência da região central de Kanagawa (Kanagawa Children's Hospital), onde foram registrados $1,6 \times 10^6$ nascimentos no período de 1971 a 1986. Como esse hospital recebeu 20% das crianças com trissomia do cromossomo 18 nascidas no mesmo período, os autores inferiram que, sendo a SK também caracterizada pela associação de anomalias congênitas múltiplas e retardamento mental, o percentual de encaminhamento seria semelhante, estimando em cerca de 50 o número de indivíduos com tal diagnóstico na região e, a partir desse dado, determinando a freqüência de 1:32.000.

Nesse mesmo estudo, NIKAWA *et al.* (1988) sugeriram que a SK deveria ser mais freqüente no Japão, pelo número reduzido de casos registrados em outros países, em particular na Europa e nos Estados Unidos, após transcorrerem cerca de 6 anos desde a primeira descrição. Eles ainda questionaram se tal situação seria similar em outras regiões da Ásia, hipótese que foi corroborada por WANG *et al.* (1993), em relação à China e aos países asiáticos de um modo geral.

Entretanto, em outros países, apesar da freqüência não ter sido ainda estabelecida, o registro de casos não-japoneses tem crescido a cada ano, com descrições em indivíduos de diferentes etnias e regiões geográficas, incluindo latino-americanos (KOUTRAS & FISHER, 1982), árabes (GILLIS, KLAR, GROSS-KIESELSTEIN, 1990), europeus não-latinos (BRAUN & SCHMID, 1984; MEINECKE & RODEWALD, 1989; PHILLIP *et al.*, 1992; ILYINA *et al.*, 1995), europeus latinos (CARCIONE *et al.*, 1991; GALAN-GOMES *et al.*, 1995; LERONE *et al.*, 1997) e norte-americanos (PAGON, DOWNING, RUVALCABA, 1985; KAISER-KUPFER *et al.*, 1986; Pe BENITO & FERRETTI, 1989; PHILLIP *et al.*, 1992; KAWAME *et al.*, 1998), o que demonstraria que a SK não seria tão

rara fora do Japão (SCHRANDER-STUMPEL *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1993; OLNEY, SHAEFER, LOLODZIEJ, 1998).

1.3. ASPECTOS CLÍNICOS

1.3.1. Sinais principais

O estudo de NIKAWA *et al.* (1988) permitiu que o fenótipo da SK fosse estabelecido de forma definitiva, destacando cinco sinais, considerados como cardinais da entidade, que são:

- *facies* peculiar (100% dos pacientes), caracterizada pela associação de eversão da porção lateral da pálpebra inferior, sobrancelhas arqueadas com rarefação da pilificação no terço distal, nariz bulboso com ponta desviada para baixo e orelhas proeminentes;
- anomalias dermatoglíficas (93% dos casos), incluindo aumento de presilhas ulnares e padrões hipotenares, ausência de trirrádio digital em *c* e(ou) *d* e presença de *finger pads* (coxim adiposo em face palmar de falanges distais), em geral proeminentes;
- anomalias esqueléticas (92% dos casos), destacando-se braqui/clinodactilia de quinto quirodáctilo e desvio da coluna vertebral, com ou sem espinha bifida;
- retardamento mental de leve a moderado, associado ou não a hipotonia (92% dos casos) e
- atraso do crescimento pós-natal (73% dos pacientes).

1.3.2. Anomalias associadas

1.3.2.1. Cardiopatias congênitas

Em 1985, OHDO *et al.* sugeriram que a associação de cardiopatia congênita e SK não seria ocasional, descrevendo dois pacientes com essa hipótese diagnóstica; um deles apresentando comunicação inter-ventricular e o outro persistência de canal arterial, coarctação de aorta e ventrículo direito com dupla saída. Em seu estudo de 1988, NIIKAWA *et al.* (1988) relataram, entre as anomalias viscerais associadas à SK, cardiopatias congênitas em cerca de 31% dos pacientes.

Ainda que não tenha sido demonstrada uma alteração específica em associação com a SK, HUGHES & DAVIES (1994) sugeriram que a coarctação de aorta seria o defeito mais comumente encontrado nessa condição.

Outras anomalias descritas incluem tetralogia de Fallot, transposição de grandes vasos da base, alguns defeitos de septo e bloqueio de ramo direito (NIIKAWA *et al.*, 1988), bem como estenose pulmonar leve (CARCIONE *et al.*, 1991).

1.3.2.2. Alterações neurológicas

Anomalias estruturais do sistema nervoso central tais como atrofia do lobo anterior e ectopia do lobo posterior da hipófise (SATOHI *et al.*, 1993; TAWA *et al.*, 1994), atrofia cerebelar e de tronco cerebral (YANO *et al.*, 1997), agenesia de corpo caloso (ABD *et al.*, 1997), cisto aracnoideo (CHU *et al.*, 1997), além de hérnia de amígdalas e de hidrocefalia devido a estenose de aqueduto (KASUYA *et al.*, 1998), já foram relatadas em indivíduos com SK.

Convulsões haviam sido descritas em várias oportunidades (PAGON, DOWNING, RUVALCABA, 1986; NIIKAWA *et al.*, 1988; GILLIS *et al.*, 1990; PHILIP *et al.*, 1992; SCHARANDER-STUMPEL *et al.*, 1994) até que, em 1997, MITSUMODE *et al.* (1997)

incluiram a epilepsia entre as características mais comuns da SK, quando relataram um menino com essa condição e sinais eletrencefalográficos de síndrome de West.

Quanto aos aspectos cognitivos, além do retardamento mental, já mencionado entre os sinais cardinais, HO & EAVES (1997) descreveram 4 crianças com SK e graus variados de distúrbios de aprendizagem, comportamento autista e auto-mutilação. Existem, ainda, relatos de hipotonia neonatal, incoordenação motora e comportamento hiperativo, embora, em geral, afável (WILSON, 1998; KAWAME *et al.*, 1999).

1.3.2.3. Anomalias esqueléticas

Além da baixa estatura (NIKAWA *et al.*, 1988), identificaram-se atraso de idade óssea, hipoplasia de clavícula, costelas rudimentares, displasia acetabular, luxação recorrente de patela, luxação congênita de quadril e hemartrose (CARCIONE *et al.*, 1991; IKEGAWA *et al.*, 1993; FRYNS & DEVRIENDT, 1998).

Em 1989, MEINECKE & RODEWALD sugeriram que os pacientes com SK poderiam ter um padrão único de perfil metacarpofalangeano (PPMF), mas que estudos posteriores deveriam ser realizados. Confirmando essa hipótese, WILSON (1998) analisou o PPMF de 5 pacientes com SK e concluiu que o mesmo estava visivelmente alterado nesses indivíduos.

1.3.2.4. Alterações metabólicas

Relataram-se várias alterações endócrinas na SK, sendo puberdade (KUROKI *et al.*, 1987; FRANCESCHINI *et al.*, 1993) e telarca precoce (NIKAWA *et al.*, 1988; DEVRIENDT *et al.*, 1994; TUTAR *et al.*, 1994) as mais freqüentes, acometendo 23% das meninas no estudo de NIKAWA *et al.* (1988). Deficiência de hormônio de crescimento (SATOH *et al.*, 1993; TAWA *et al.*, 1994, DEVRIENDT *et al.*, 1995), diabetes insípido

(TAWA *et al.*, 1994), tireoidite de Hashimoto (EWART-TOLAND *et al.*, 1998) e hipotireoidismo (KAWAME *et al.*, 1999) também foram descritos.

Além disso, no estudo de NIKAWA *et al.* (1988), 7% dos pacientes tiveram hipoglicemia neonatal, igualmente observada por BURKE & JONES (1995) em 2 casos.

Existem ainda os relatos de DEVRIENDT & FRYNS (1994) sobre um paciente com SK que apresentava hiperfosfatasia transitória isolada e de DEVRIENDT *et al.* (1996) sobre uma menina recém-nascida com um cisto folicular congênito de grandes proporções e dosagens hormonais normais no período neonatal, o que suscitou a hipótese de ativação hipotalâmica transitória intra-uterina.

1.3.3. Anomalias ocasionais

1.3.3.1. Otorrinolaringológicas

São descritas fenda palatina, tanto posterior quanto anterior, úvula bifida, incompetência velofaringeana, fenda labial, micrognatia e fôveas labiais, à semelhança do que ocorre na síndrome de van der Woude (OMIM*119300) (HANDA *et al.*, 1991; SCHARANDER-STUMPEL *et al.*, 1994; BURKE & JONES, 1995; LAN *et al.*, 1995; COOLS & JAEKEN, 1997; PETERSON-FALZONE, GOLABI, LALWANI, 1997; KOKITSU-NAKATA *et al.*, 1999). Devido às alterações palatinas, alguns pacientes ainda podem apresentar incoordenação à deglutição e voz anasalada (WILSON, 1998; KAWAME *et al.*, 1999).

Há também relatos de anomalias de ouvido interno, como malformação coclear (TOUTAIN *et al.*, 1997), e de hipoacusia mista (SAY *et al.*, 1993; PETERSON-FALZONE, GOLABI, LALWANI, 1997). Com relação a essa última, existe a possibilidade de que, em alguns casos, seja conseqüente à recorrência de infecções de vias respiratórias, em especial a otite média aguda (KAWAME *et al.*, 1999).

1.3.3.2. Oculares

Além dos achados característicos que determinaram a associação com a maquiagem do teatro Kabuki, descreveram-se ptose palpebral, estrabismo, anomalia ocular de Peters[†], catarata, miopia, hipoplasia de nervo óptico, paralisia do terceiro par craniano e fenômeno de Marcus Gunn[‡] (WILSON, 1998; KAWAME *et al.*,1999).

1.3.3.3. Gastro-Intestinais

Identificaram-se hérnia diafragmática, varizes esofágicas, refluxo gastro-esofágico, colangite esclerosante, cirrose hepática, má-rotação intestinal, perfuração ileal, atresia anal, além de sintomatologia de má-absorção intestinal e de diarréia secretora (WILSON, 1998; EWART-TOLAND *et al.*,1998; KAWAME *et al.*,1999).

1.3.3.4. Genito-Urinárias

Quanto às anomalias genito-urinárias, relataram-se fistula anovestibular, megaureter, hidronefrose, atrofia e displasia renal, bem como micropênis, criptorquidia e saliências lábio-escrotais hipoplásicas (EWART-TOLAND *et al.*,1998; WILSON, 1998).

1.3.3.5. Dermatológicas

Algumas alterações ectodérmicas, tais como unhas hipoplásicas (BURKE *et al.*, 1991), tricorrexe nodosa (LERONE *et al.*, 1997) e anomalias dentárias, entre as quais ausência de dentes, especialmente de incisivos laterais (HALAL, GLEDHILL,

[†] - defeito de câmara anterior caracterizado por opacificação corneana e aderências iridolenticulocorneanas (CAMERA *et al.*, 1994)

[‡] - reflexo palpebral involuntário provocado pelo movimento mandibular

DUDKIEWICZ *et al.*, 1989; SILENGO *et al.*, 1996; LERONE *et al.*, 1997; MHANNI *et al.*, 1999) foram relatadas, além de alteração de pigmentação descrita como vitiligo (SCHARANDER-STUMPEL *et al.*, 1990 e 1993).

1.3.3.6. Imuno-Hematológicas

Alterações imuno e hematológicas do tipo púrpura trombocitopênica idiopática crônica (WATANABE *et al.*, 1994), hipogamaglobulinemia (HOSTOFFER *et al.*, 1996) e imunodeficiência (NIKAWA *et al.* 1988; WILSON, 1998; KAWAME *et al.*,1999) já foram mencionadas em alguns relatos.

1.3.4. Evolução e complicações

O diagnóstico da SK, que no período neonatal pode ser difícil, torna-se de reconhecimento mais fácil com o crescimento, já que, em geral, ocorre uma exacerbação dos dismorfismos faciais devido à perda da tonicidade da musculatura da face (BURKE & JONES, 1995).

Alguns pacientes têm dificuldade em ganhar peso durante os primeiros anos de vida, muitas vezes devido às anomalias congênitas múltiplas. Entretanto, na adolescência pode ocorrer obesidade (EWART-TOLAND *et al.*,1998).

A recorrência de infecções de vias aéreas tem sido descrita e poderia ser associada à imunodeficiência detectada em alguns casos. Dentre essas infecções, a otite média aguda parece ser a mais comum e, por sua vez, poderia estar relacionada à hipoacusia em alguns casos, conforme mencionado anteriormente (CHRZANOWSKA *et al.*, 1998; EWART-TOLAND *et al.*,1998; KAWAME *et al.*, 1999).

IJICHI *et al.* (1996) descreveram um menino com diagnóstico de linfoma de Burkitt, a partir de massa abdominal observada aos 3 anos de idade, sendo o vírus Epstein-Barr detectado como agente etiológico do tumor por técnica de hibridação *in situ*.

1.3.5. Variabilidade fenotípica e diagnósticos associados

Além do acometimento em graus variados de diferentes órgãos ou sistemas, observa-se variação significativa no que concerne à gravidade dos dismorfismos descritos na SK e, segundo alguns autores, isso estaria, em parte, relacionado à miscigenação da população (BURKE & JONES, 1995; WILSON, 1998; KAWAME *et al.*, 1999). Uma possível indicação da influência étnica na variabilidade clínica da SK está no relato de KAISER-KUPFER *et al.* (1986), sobre um adolescente afro-americano que apresentava vários sinais da SK, como fenda palpebral alongada e evertida no terço distal, *finger pads*, ausência do trirádio em *c* e *spina bifida*, mas cuja estatura era normal, provavelmente em virtude do maior potencial para estatura final na raça negra. Do mesmo modo, PE BENITO & FERRETTI (1989) descreveram uma criança de ascendência negróide com retardamento mental grave, *facies* com aparência oriental e estatura dentro do limite da normalidade, cujo diagnóstico foi de SK.

Vários registros da SK em indivíduos caucásóides vêm sendo feitos e, a despeito de não ter sido determinada a sua freqüência em etnias não orientais, alguns autores consideraram que estaria sendo sub-diagnosticada fora do Japão, pelo fato de os profissionais da área da saúde não estarem totalmente familiarizados com a síndrome, ou com as diferenças fenotípicas em indivíduos não-orientais (PAGON *et al.*, 1985; MEINECKE & RODEWALD, 1989; CARCIONE *et al.*, 1991; PHILLIP *et al.*, 1992; SCHRANDER-STUMPEL *et al.*, 1994; BURKE & JONES, 1995; GALAN-GOMES *et al.*, 1995; ILYINA *et al.*, 1995; WILSON, 1998).

Outro aspecto observado entre as várias descrições analisadas é o de que a hipótese diagnóstica de SK não foi formulada no primeiro atendimento, ou melhor, só foi aventada a partir da reavaliação clínica dos pacientes, após a descrição inicial feita por NIIKAWA *et*

al. (1981) e KUROKI *et al.* (1981) (WELLESLEY & SLANEY, 1994; BURKE & JONES, 1995; VERLOES *et al.*, 1996; COOLS & JAEKEN, 1997). É interessante destacar que alguns relatos consideram a ocorrência simultânea da SK e de algumas condições como as síndromes de Turner (WELLESLEY & SLANEY, 1994), de Peters (OMIM*604229) (CAMERA *et al.* 1994), de Cornelia de Lange (OMIM122470) (VERLOES, *et al.*, 1996), de Hardikar[§] (COOLS & JAEKEN, 1997) e de van der Woude (OMIM*119300) (MAKITA *et al.*, 1999).

1.4. ETIOLOGIA

A etiologia da SK ainda não está esclarecida. A maioria dos casos tem sido esporádica, não havendo desvio da razão de sexo ou aumento do coeficiente de consangüinidade (NIKAWA *et al.*, 1988; Pe BENITO & FERRETTI, 1989; WILSON, 1998). Contudo, relatou-se recorrência familiar em pelo menos 6 oportunidades, sendo a distribuição sugestiva de herança autossômica dominante com expressividade variável (HALAL *et al.*, 1989; SAY *et al.*, 1993; SILENGO *et al.*, 1996; KOBAYASHI, 1996; McKUSICK, 1996; TSUKAHARA, 1997).

Em alguns poucos indivíduos com diagnóstico de SK detectaram-se anomalias cromossômicas, tanto autossômicas quanto de cromossomos sexuais. Entre as anomalias autossômicas, todas estruturais, não foi verificado um padrão que permitisse considerar a hipótese de uma etiologia cromossômica específica, sendo descritos uma translocação não balanceada envolvendo o braço curto do cromossomo 6 e o braço longo do cromossomo 12 (JARDINE *et al.*, 1993), inversão pericêntrica do braço curto do cromossomo 4 (FRYNS, VAN DEN BERGHE, SCHRANDER-STUMPEL, 1994), cromossomo 13 pseudocêntrico (LYNCH *et al.*, 1995), translocação aparentemente equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 15 e 17 (GALAN-GOMEZ *et al.*, 1995) e duplicação intersticial no braço curto do cromossomo 1 (LO *et al.*, 1998).

[§] caracterizada por fenda labio-palatina, retinopatia pigmentar, hidronefrose e colestase

Quanto aos cromossomos sexuais, no seu estudo de 62 pacientes NIKAWA *et al.* (1988) relataram 3 com anomalias dos cromossomos X e Y, descritas como um anel de X, um anel de Y e ainda uma inversão pericêntrica de Y. Nessa inversão, como o ponto de quebra encontrava-se na região pseudoautosômica, considerou-se a possibilidade de que a mesma estivesse relacionada à etiologia da SK, sendo sugeridos estudos moleculares para a confirmação dessa hipótese.

DENNIS *et al.* (1993) e MCGINNIS *et al.* (1997) também descreveram 4 pacientes que, além dos sinais da SK, possuíam um anel do cromossomo X e quadro fenotípico bem mais grave do que o comumente observado na síndrome de Turner (ST), em especial quanto ao déficit cognitivo, sugerindo que a exacerbação das manifestações da ST determinaria um fenótipo mais próximo ao descrito na SK. O mesmo foi observado por WELLESLEY & SLANLEY (1994), em uma menina com cariótipo 45,X, descrita por esses autores como tendo, concomitantemente, as síndromes de Turner e Kabuki. Além disso, ABD *et al.* (1996) descreveram uma outra menina com mosaïcismo 45,X/46,XX,r(X), que apresentava dismorfismos faciais da SK, distúrbio de aprendizagem e agenesia de corpo caloso.

É oportuno ressaltar que, usualmente, a ST não se associa a retardamento mental. Entretanto, dentre as pacientes que possuem anomalias estruturais, tais como anéis de pequenas dimensões ou translocações envolvendo o cromossomo X e um autossomo, ou ainda marcadores presumivelmente derivados desse cromossomo, o comprometimento intelectual costuma ser mais acentuado. A maior gravidade dessa manifestação tem sido atribuída à falta de inativação do cromossomo X, o que poderia levar à superexpressão de genes presentes nesse cromossomo ou a uma dissomia funcional de parte das seqüências gênicas do X (DENNIS *et al.*, 1993; WELLESLEY & SLANLEY, 1994; ABD *et al.*, 1996; MCGINNIS *et al.*, 1997).

Considerando essa hipótese e ainda com o objetivo de determinar a origem parental do material cromossômico extra-numerário, bem como uma região candidata à etiologia da SK, ABD *et al.* (1996) e MCGINNIS *et al.* (1997) realizaram estudos citogenéticos e moleculares de 4 pacientes com constituição cromossômica 45,X/46,X,r(X), retardamento

mental acentuado e diversas manifestações da ST associadas a sinais dismórficos faciais da SK.

O trabalho de ABD *et al.* (1996) utilizou o método de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH-*fluorescence in situ hybridization*) com iniciadores (*primers*) do gene XIST**, bem como estudos de replicação tardia do cromossomo X. Já no de MCGINNIS *et al.* (1997), além do gene XIST, utilizaram-se sondas específicas de regiões pseudoautossômicas do cromossomo Y e sonda de cromossomo X, além de técnicas para determinação de microssatélites, de *Southern-blot* e de PCR (*polymerasis chain reaction*).

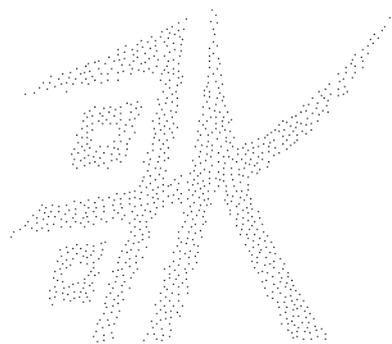
Os resultados acabaram por não permitir uma conclusão, pois no primeiro trabalho (ABD *et al.*, 1996), a análise pelo método de FISH indicou que o anel do cromossomo X possuía o gene XIST e uma banda de replicação precoce. No segundo (MCGINNIS *et al.*, 1997), foi verificado que o gene XIST não se expressava e a técnica de PCR confirmou a supressão do mesmo, bem como a origem paterna do anel.

Outros estudos moleculares têm sido feitos na tentativa de identificação de um ou mais genes responsáveis pela SK. A hipótese de que pudesse ser uma síndrome de genes contíguos foi considerada e, pela associação com anomalias de linha média como palato fendido, cardiopatias congênitas, alterações do trato urinário, bem como imunodeficiência, foi realizada análise citogenética utilizando técnica de FISH específica para a região 22q11, tentando correlacionar a seqüência de DiGeorge (OMIM*188400) ou a síndrome velocardiofacial (OMIM#192430) com a SK, sendo os resultados negativos (LI *et al.*, 1996; CHZARNOWSKA *et al.*, 1998).

Em 1999, MAKITA *et al.* descreveram uma menina com evidências da síndrome de van der Woude e com sinais sugestivos da SK. Para se confirmar que a concomitância dessas duas síndromes pudesse então estar relacionada a uma microdeleção na mesma região do cromossomo 1 (1q32-q41), foi empregado o método de FISH e a análise de microssatélites, não sendo encontrada qualquer deleção que confirmasse tal hipótese.

** - *X inactivation specific transcript* - gene localizado no centro de inativação do cromossomo X que se expressa exclusivamente no X inativo (DUNCAN *et al.*, 1993)

Ainda na área molecular, em virtude do gene α -tubulina humano (TUBA2) ter sido mapeado na região 13q12.11 (DODÉ *et al.*,1998) e considerando o fato de alguns pacientes com diagnóstico de SK apresentarem um cromossomo 13 pseudodicêntrico, com ponto de quebra na região mencionada [46,XY,psudic(13)(13pter→13q12.11::13p12→13q11.00::13q12.11→13qter)] (LYNCH *et al.*, 1995), Dodé *et al.* (1998) sugeriram que essa região e, conseqüentemente, o referido gene, poderiam estar relacionados à etiologia da SK.



2. JUSTIFICATIVA

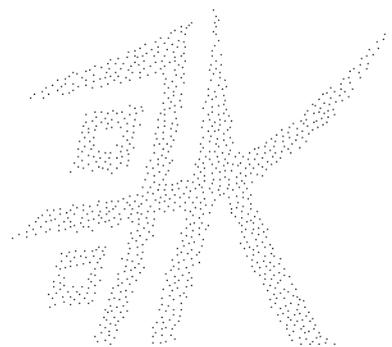
Tendo em vista o que foi exposto, pelo menos 4 aspectos relacionados à SK merecem destaque. O primeiro diz respeito à variabilidade fenotípica da entidade, que parece ser considerável e, possivelmente, relacionada às características étnicas da população de origem dos indivíduos afetados. Essa variabilidade justificaria o seu estudo em populações miscigenadas.

Um outro aspecto relaciona-se ao fato de algumas manifestações fenotípicas ainda não estarem bem caracterizadas, no sentido de serem ou não valorizadas para o diagnóstico clínico da entidade.

Além disso, vale ressaltar que, no Brasil, são poucos os estudos relacionados à SK, todos eles mais voltados para o registro de casos novos (VAN BEVER & VAN DEN ENDE, 1992; HAJE, 1996; SOUZA, RIBEIRO, RIBEIRO, 1996; KOKITSU-NAKATA *et al.*, 1999) e não para o resultado de um estudo sistemático dessa condição, levando em conta seus principais achados clínicos e laboratoriais (MARQUES-DE-FARIA & OLIVEIRA, 1998).

Finalmente, como se trata de condição de etiologia ainda indefinida, considerar-se-iam oportunos os estudos moleculares a respeito, incluindo a análise do gene TUBA2, cuja metodologia encontra-se disponível em nosso laboratório.

Sendo assim, pela perspectiva de contribuir para o conhecimento da SK, tanto com relação ao exame dismorfológico quanto à investigação diagnóstica complementar, bem como pela oportunidade de avaliar, de forma padronizada, uma amostra de indivíduos oriundos de uma população etnicamente heterogênea como a brasileira, é que foi elaborado o presente trabalho.



3. OBJETIVOS

3.1. GERAIS

- Caracterizar, com base em critérios clínicos e resultados de exames complementares, uma amostra de indivíduos com hipótese diagnóstica inicial de SK.

3.2. ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo de avaliação clínica específico para a SK;
- Fazer a análise molecular do gene TUBA2 nos pacientes com características clínicas da SK;
- Correlacionar os achados clínicos com os resultados dos exames complementares;
- Estabelecer os principais diagnósticos diferenciais da SK.



4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

A seleção foi realizada no período de junho de 1998 a dezembro de 1999, no ambulatório de Genética Geral do Departamento de Genética Médica da FCM-UNICAMP, entre:

- indivíduos que já estavam sendo acompanhados com hipótese diagnóstica de SK e foram convocados para reavaliação;
- indivíduos que estavam sendo investigados devido a quadro dismórfico associado a déficit neuropsicomotor de etiologia não esclarecida, que retornaram para reavaliação no período mencionado e cujas características clínicas foram consideradas sugestivas desse diagnóstico, e
- indivíduos que corresponderam aos casos novos avaliados no período, para os quais a hipótese diagnóstica de SK foi estabelecida.

Todos os pacientes incluídos na amostra tiveram sua participação previamente autorizada pelos responsáveis, mediante assinatura do consentimento pós-informação (Anexo 1), após terem recebido esclarecimentos sobre o estudo a ser realizado, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCM - UNICAMP.

4.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Cada caso-índice foi submetido a avaliação clínica, iniciada por meio de anamnese, sendo que os dados foram obtidos pela autora junto aos pais ou responsáveis, dando-se atenção especial aos antecedentes gestacionais, aos perinatais e às intercorrências mórbidas, tais como debilidade de sucção, infecções recorrentes e puberdade precoce.

Quanto aos antecedentes familiares, além da elaboração dos heredogramas, enfatizaram-se aspectos como a eventual recorrência de casos com características similares. Também obtiveram-se informações quanto à origem étnica de cada paciente, levando em

conta a ascendência de europeus latinos, não-latinos, bem como negróides, ameríndios e asiáticos.

Na investigação de infecções recorrentes, consideraram-se todos os tipos, fossem de vias aéreas superiores e inferiores, trato urinário e(ou) gastro-intestinal, entre outras, com destaque para as de vias aéreas superiores, visto serem as mais freqüentemente descritas em estudos anteriores (WILSON, 1998).

O exame físico, em particular o dismorfológico, levou em conta os sinais mais freqüentemente descritos na SK, incluídos no protocolo de avaliação clínico-laboratorial (Anexo 2).

Na avaliação diagnóstica complementar, os pacientes foram submetidos aos exames abaixo relacionados, realizados, em sua maioria, conforme a rotina de atendimento dos serviços do Hospital de Clínicas da FCM – UNICAMP:

- inventário ósseo;
- avaliação cardiológica, com raio-X de tórax, eletrocardiograma e ecocardiografia;
- ultra-som abdominal;
- tomografia axial computadorizada de crânio;
- dosagens de imunoglobulinas;
- avaliação oftalmológica com fundoscopia;
- audiometria e
- para as meninas em idade pré-puberal, dosagens de hormônio luteinizante (LH) e hormônio estimulante folicular (FSH).

4.3. ESTUDO CITOGENÉTICO

Conforme o protocolo de investigação, todos os pacientes selecionados foram inicialmente submetidos a exame de cariótipo com técnica de bandamento G, em preparações obtidas a partir de cultura rotineira de linfócitos de sangue periférico. Em 2 casos, devido a quadro de retardamento mental com recorrência na família, esse estudo foi complementado pela pesquisa de sítios frágeis, em particular o da região Xq27.3 [fra(X)], citada no item 4.3.2. Em outros 2, houve a necessidade da utilização da técnica de FISH, descrita no item 4.3.3.

4.3.1. Técnica de obtenção de metáfases a partir do cultivo temporário de linfócitos de sangue periférico.

Foi empregada a técnica modificada de MOOREHEAD *et al.* (1960), rotineiramente utilizada no laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, sendo o bandamento G realizado segundo a técnica adaptada de SANCHEZ, ESCOBAR, YUNIS (1973).

4.3.2. Técnica para obtenção de metáfases em cultura de linfócitos periféricos favorecendo a expressão dos sítios frágeis sensíveis ao folato.

Quando necessário, complementou-se a análise cromossômica pela pesquisa de sítios frágeis sensíveis ao folato, em particular o Xq27.3 [fra(X)], segundo técnica modificada de SUTHERLAND (1977; 1979) e as orientações preconizadas por JACKY *et al.* (1991), rotineiramente utilizada no laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

4.3.3. Procedimento rápido da técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) em núcleos interfásicos para detecção de cromossomos X e Y*

Indicou-se esse procedimento para duas pacientes, em cujo cariótipo foi detectado mosaicismo cromossômico [45,X/46,X,+mar]. Após a obtenção de metáfases a partir do cultivo temporário de linfócitos de sangue periférico, ao término da lavagem com fixador, encaminhou-se cada sedimento ao Laboratório de Citogenética, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA, para análise do marcador por técnica de FISH para detecção de cromossomos X e Y em núcleos interfásicos e em metáfases. O procedimento foi executado pela autora, seguindo o protocolo do referido laboratório.

Utilizou-se a sonda CEP SO X/SG Y (Vysis®), em solução de estocagem, diluída com 600µl da solução Oncor *Hybrisol VI* (cat.# S1370-30), mantida em freezer a -20°C. Depois de homogeneizada, distribuiu-se tal solução em 4 tubos de microcentrifuga de 1,5ml, contendo 150µl cada um, os quais foram selados, identificados e estocados em freezer -20°C. Cada tubo foi suficiente para o preparo de cerca de 12 lâminas.

Prepararam-se 6 lâminas de cada paciente e de um controle sabidamente normal, gotejando-se o sedimento fixado de cada tubo. Essas lâminas foram feitas sobre uma placa quente à temperatura não superior a 50°C.

A seguir, pipetaram-se, cuidadosamente, 15µl da solução da sonda em cada uma das lâminas, cobrindo-as com lamínulas de 24 X 30mm e colocando-as sobre uma placa quente a 95°C por 1 minuto, para desnaturaçãõ simultânea dos cromossomos e da sonda. Imediatamente após esse procedimento, colocaram-se as lâminas em câmara úmida a 37°C por 1 hora, para hibridação.

Preparou-se uma solução de lavagem com 32ml de água estéril e 8ml de tampão salino de citrato de sódio (SSC) 2X e colocou-se em banho-maria a 72°C. Uma vez completada a hibridação e tendo a solução de lavagem atingido 72°C, procedeu-se à

* protocolo utilizado no Laboratório de Citogenética, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA

retirada da lamínula, com cuidado, para que a mesma não escorregasse pela superfície da lâmina.

Colocou-se, a seguir, cada lâmina na solução de lavagem por 2 minutos e banhou-se em água deionizada por 5 vezes para remoção do tampão. Após o excesso de água ter sido retirado, adicionaram-se 20µl de DAPI II (4,6-diamidino 2-fenilindol), que estava estocado em *freezer*, para contra-coloração. Cobriram-se as lâminas com novas lamínulas, levando-as para análise em microscópio de fluorescência, utilizando-se um filtro de 3 bandas.

A fim de que a sonda não degradasse, realizou-se todo o procedimento em ambiente de penumbra.

4.4. ANÁLISE MOLECULAR

As técnicas de análise molecular foram realizadas pela autora do projeto, no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) – UNICAMP, conforme especificado a seguir.

4.4.1. Técnica para extração de DNA sangüíneo

Coletou-se, na maioria dos casos, cerca de 10ml de sangue periférico, em tubos estéreis Vacuntainer[®] contendo 8 gotas de EDTA 10% como agente anti-coagulante. O sangue foi transferido para tubos de centrifuga estéreis de fundo cônico de 50ml, aos quais adicionaram-se 35ml da solução A, composta por Triton-X 1%, MgCl₂ 5mM, Sacarose 0,32M e Tris-HCl 10mM pH 8,0. Procedeu-se, então, a lise das hemáceas colocando-se a mistura em gelo por 30 minutos. A mistura foi centrifugada a 2.500rpm, por 10 minutos a 4°C, retirando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 20ml da solução A ao sedimento com o objetivo de ressuspendê-lo. Centrifugou-se essa nova mistura a 2.500rpm, por 15 minutos, em temperatura ambiente. Repetiu-se tal procedimento diversas vezes até que o sobrenadante estivesse incolor.

A seguir, adicionou-se ao sedimento 1ml da solução B 2X concentrada (Na₂EDTA 20mM, NaCl 20mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0) e 250µl da solução C, feita com Solução B 1ml, Proteinase K[®] (Boehringer Mannheim, Germany) 1mg e SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% 0,5ml, preparada no momento do experimento, incubando-se em banho-maria a 37°C, durante a noite.

No dia seguinte, tratou-se a solução com 1,25ml de fenol saturado e tampão Tris-HCl 10mM pH 8,0 e agitou-se por inversão, durante 5 minutos, centrifugando-se após a 2.500rpm, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Retirou-se a fase aquosa e transferiu-se para outro tubo, repetindo-se o procedimento anterior por 2 vezes. Procedeu-se a extração do DNA com clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção 24:1.

Precipitou-se o DNA com o auxílio de 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. Retirou-se o precipitado do DNA com a ajuda de um bastão de plástico e lavou-se com etanol 70% para eliminar o excesso de sal. Dissolveu-se o DNA em quantidade apropriada (200-500µl) de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0, TAE – tris-acetato de EDTA) e determinou-se a concentração por leitura de absorção óptica a 260nm em espectrofotômetro.

4.4.2. Técnica para extração de DNA de saliva

Como o pai de um dos pacientes não autorizou a punção venosa para a coleta de DNA, ofereceu-se a opção da coleta de saliva, obtida de mucosa oral, com o auxílio de esponja estéril, e distribuída em papel filtro FTA[®] (Gibco) e em 3 tubos Eppendorf, no volume total de 200µl por frasco.

Adicionou-se 1ml de água destilada a cada tubo e deixou-se em incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, invertendo-se ocasionalmente para mistura da solução. Foram então levados à centrifugação por 3 minutos a 10.000rpm.

Retirou-se o sobrenadante cuidadosamente e adicionaram-se 200µl de Chelex® 100 5% (Bio-Rad). Os frascos foram incubados a 56°C por 30 minutos e a suspensão, agitada em Vortex®, em alta velocidade, durante 10 segundos.

Levaram-se os frascos à incubação em água fervente por 8 minutos e foram centrifugados a 15.000rpm por 3 minutos.

Para a técnica da PCR, utilizaram-se cerca de 20µl do sobrenadante. Estocou-se a reação em geladeira, na temperatura de 2 a 8°C, para que pudesse ser utilizada nas reações de rastreamento dos exons.

Com relação ao papel filtro FTA® (Gibco), deixou-se secar pelo período mínimo de 1 noite, removendo-se amostras de 1mm² do meio dos círculos demarcados e colocando-as em tubos de microcentrífuga junto com 500µl de TE. Centrifugaram-se os tubos a 2000rpm, por 30 segundos, desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante.

Adicionaram-se 500µl do reagente DNAzol® (Gibco) a cada tubo, que foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 2000rpm, por 30 segundos, desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante. Repetiu-se esse procedimento mais 1 vez.

A cada tubo, incubado em gelo por 10 minutos, adicionaram-se 500µl de cloreto de lítio (LiCl) 7,5M à temperatura de congelamento. Centrifugou-se a 2000rpm por 30 segundos e desprezou-se cuidadosamente o sobrenadante.

Para a lavagem do papel filtro, a cada tubo, adicionaram-se, por 3 vezes, 500µl de TE. A seguir, centrifugaram-se os tubos a 2000rpm por 30 segundos, desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante.

Depois de secarem à temperatura ambiente, utilizou-se cada amostra de papel filtro para a técnica de PCR, da mesma forma que o DNA sangüíneo usado para rastreamento dos exons.

4.4.3. Amplificação dos exons do gene TUBA2 a partir de DNA genômico

Cada um dos 4 exons do gene TUBA2 foi amplificado, usando iniciadores (*primers*) relacionados na tabela 4.1, pela técnica de PCR. Para a reação de amplificação utilizaram-se, em um volume final da reação de 50µl:

- 1µl de DNA genômico;
- 5µl de tampão de reação para a enzima (Gibco BRL®);
- 5µl de dNTP 2mM (trifosfato de didesoxi-nucleotídeo);
- 0,1µg de iniciador (*primer*) direto;
- 0,1µg de iniciador (*primer*) inverso;
- 1,5µl de cloreto de magnésio;
- 5µl de DMSO (dimetil-sulfóxido);
- 0,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco BRL®).

Tabela 4.1 – Seqüência e tamanho dos iniciadores (*primers*) do gene TUBA2

PRIMER	SEQÜÊNCIA	ENZIMA	FRAGMENTO
Exon 2	TATAGCTTCAAGTTGCCCTGAA	-	397
Exon 3	CCATCTTGGTGAGGATAGGC	-	242
Exon 4	GTGTACTGCGTGTTTATTATG	MboI	959
Exon 5	AAAGCAGCCACCATTCCA	MboI	517

Após uma fase de desnaturação a 94°C, durante 5 minutos, seguiram-se 35 ciclos compostos das seguintes temperaturas e durações: desnaturação a 94°C, anelamento dos iniciadores (*primers*) entre 50-55°C, por 45 a 75 segundos e extensão, ou incorporação dos nucleotídeos, a 72°C, por 45 a 75 segundos (tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Tempos, temperaturas e números de ciclos dos iniciadores

EXONS	ETAPA INICIAL		35 CICLOS				ETAPA FINAL			
	Desnaturação		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão	
	Tempo (min)	Temp °C	Tempo (min)	Temp °C	Tempo (min)	Temp °C	Tempo (min)	Temp °C	Tempo (min)	Temp °C
2	5:00	94	0:45	94	0:45	50	0:45	72	5:00	72
3	5:00	94	0:45	94	0:45	55	0:45	72	5:00	72
4	5:00	94	0:45	94	0:45	50	1:15	72	5:00	72
5	5:00	94	0:45	94	0:45	55	0:45	72	5:00	72

4.4.3.1. Detecção de mutação por análise da conformação da fita simples

A fim de se detectar possíveis mutações pontuais, rastream-se os exons amplificados utilizando-se a análise da conformação da fita simples de DNA, por meio do método de SSCP (*single-strand conformation polymorphism*).

Separaram-se os fragmentos de DNA obtidos em fita simples por aquecimento, em um tampão desnaturante, e fracionaram-se em géis de poli-acrilamida a 10%, contendo 10% de glicerol (*PAGE-polyacrilamide gel eletroforesis*), feitos por método manual, logo após submetidos à coloração com prata (ORITA *et al.*, 1989).

Utilizaram-se placas de vidro de 165mm X 140mm e uma solução de volume final de 30ml com:

- 15ml de glicerol 20%;
- 7,5ml de acrilamida/bisacrilamida 40%;
- 0,6ml de TAE 50X

Polimerizaram-se os géis com a adição de 192µl de persulfato de amônio 10% e 38,5µl de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina). Adicionaram-se 5µl do produto da reação a 5µl de uma solução contendo formamida 95%, EDTA 20mM pH 8,0 e azul de

bromofenol 0,005%, e aplicou-se nos géis, que foram submetidos à eletroforese com 300V, por 3,5 horas, em tampão TAE 1X e temperatura aproximada de 20°C.

Os passos da coloração foram feitos da seguinte forma, segundo técnica modificada de ORITA *et al.* (1989):

- Fixação: solução de 10% de etanol e 5% de ácido acético, imergindo o gel por um período de 20 minutos, à temperatura ambiente;
- Impregnação: utilizando uma solução de nitrato de prata 0,15%, por um tempo de 10 minutos de imersão;
- Lavagem com 200ml de água destilada;
- Revelação: uma solução aquosa total de 200ml contendo 6g de NaOH e 1,2ml de formaldeído, mantendo o gel imerso até o aparecimento das bandas;
- Para a interrupção da revelação, foi repetida a imersão com a solução de fixação.

Quando não foi possível realizar o preparo manual dos géis de SSCP, utilizou-se o equipamento *PhastSystem*[®] (PHARMACIA LKB) com géis pré-moldados 12,5% (*PhastGel*[®]) e tampão nativo (L-alanina 0,88M; tris 0,25M; pH 8,8), submetidos às condições de 150V/h, temperatura de 4°C, sem pré-corrida. A seguir, realizou-se a coloração por prata, segundo técnica modificada de ORITA *et al.* (1989), descrita acima.

Os géis foram secos à temperatura ambiente e analisados visualmente conforme o padrão de migração de bandas.

Digeriram-se os exons 4 e 5 com a enzima *MboI* para redução do tamanho do fragmento, na tentativa de obtenção de resultados mais informativos, já que o método de SSCP é mais sensível na detecção de alterações moleculares em fragmentos de até 350 pares de bases, sendo que a partir deste tamanho, perde-se a confiabilidade dos resultados obtidos pelo método.

4.5. CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES CONSIDERANDO A CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE SK

Após a conclusão da avaliação clínica e laboratorial, considerando que a hipótese diagnóstica de SK não foi mantida para todos os casos analisados, optou-se pela classificação dos pacientes em 2 grupos, segundo os critérios abaixo especificados.

O grupo A foi composto por aqueles cujo diagnóstico final foi de SK, levando em conta que apresentavam *facies* característica, tinham pelo menos uma anomalia associada e(ou) ocasional e o resultado dos exames complementares, incluindo o cariótipo, não foi sugestivo de alguma etiologia específica.

Especialmente quanto ao último exame, decidiu-se pela inclusão daqueles pacientes com cariótipo normal no presente grupo, considerando que a quase totalidade dos indivíduos descritos na literatura tendo a SK não apresentavam anomalias cromossômicas. Nos raros casos em que houve relato de cromossomopatias, as mesmas eram heterogêneas, excetuando os 5 com alterações estruturais do cromossomo X (NIIKAWA *et al.*, 1988; WELLESLEY & SLANLEY, 1994; MCGINNIS *et al.*, 1997), um deles inclusive descrito como tendo concomitância das síndromes de Turner e Kabuki.

No grupo B, foram incluídos os indivíduos para os quais outro diagnóstico passou a ser considerado, pelo fato de o conjunto de sinais e(ou) o resultado dos exames complementares sugerir outra condição que não a SK.

4.6. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM DADOS DA LITERATURA

Compararam-se os resultados obtidos, tanto da avaliação clínica quanto dos exames complementares dos pacientes do grupo A, com dados da literatura, que incluíram um artigo de revisão que envolveu a quase totalidade dos casos publicados até agosto de 1998 (WILSON, 1998), complementados pelos apresentados em outro artigo publicado em julho

de 1999 (KAWAME et al, 1999), bem como com os dados relativos às amostras especificamente estudadas por esses autores.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística incluiu a comparação entre dois valores médios, pela aplicação do teste *t* de Student, após a demonstração de que as variâncias não diferiam significativamente ao nível de 5% (cf. BEIGUELMAN, 1988).

Realizou-se também a análise descritiva dos dados obtidos, sendo as proporções verificadas para as diversas variáveis analisadas comparadas pela aplicação de testes de qui-quadrado, com nível de significância de 5%, e teste exato de Fisher em tabelas 2X2, com $\alpha=0,01$ (cf. BEIGUELMAN, 1988).



5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram avaliados 18 pacientes no período compreendido entre junho de 1998 a dezembro de 1999, distribuídos da seguinte forma:

- 8 indivíduos que já estavam sendo acompanhados com hipótese diagnóstica de SK e foram convocados para reavaliação;
- 5 indivíduos que estavam sendo investigados devido a quadro dismórfico associado a déficit neuropsicomotor de etiologia não esclarecida, que retornaram para reavaliação no período mencionado e cujas características clínicas foram consideradas sugestivas desse diagnóstico, e
- 5 indivíduos que corresponderam aos casos novos avaliados no período, para os quais a hipótese diagnóstica de SK foi estabelecida.

É oportuno esclarecer que, com relação aos pacientes que corresponderam aos casos já em acompanhamento, nenhum teve sua avaliação anterior a 1993, o que define um intervalo de 6 anos para os diagnósticos definidos como SK em um único serviço.

Os 18 pacientes estudados tiveram idades que variaram de 7 meses a 12 anos, sendo a média de $\bar{x}=5,15$ anos com desvio padrão $s=4,19$. Como citado anteriormente (tópico 4.5), a amostra foi classificada em 2 grupos de pacientes, levando em conta a manutenção ou não do diagnóstico da SK, após serem avaliados os resultados obtidos a partir da observação clínica e dos exames complementares. Entretanto, pela oportunidade de realizar uma análise comparativa dos dados relativos a cada grupo, optou-se pela apresentação dos resultados já considerando esse diagnóstico final.

No grupo A estão 10 indivíduos (3 do sexo feminino e 7 do masculino) (figura 5.1), para os quais foi estabelecido o diagnóstico de SK. Sobre esses pacientes, ressalta-se que 9 foram considerados desde o início como portadores dessa condição e apenas 1 teve outra hipótese diagnóstica inicial, a de síndrome de Aarskog (paciente 4). Um dos pacientes era adotado (paciente 7); assim, apenas 9 casos foram informativos quanto a antecedentes

familiares, gestacionais e peri/neonatais. Os resultados da avaliação clínica desse grupo, incluindo os exames complementares, encontram-se nas tabelas 5.1 e 5.2.

Já no grupo B (figura 5.2), foram incluídos 8 pacientes (4 do sexo feminino e 4 do masculino) para os quais, ao término da investigação, foi considerada outra hipótese diagnóstica. Os resultados da avaliação clínica desse grupo estão nas tabelas 5.3 e 5.4.

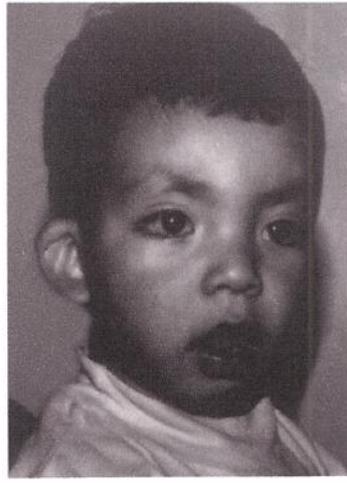
As informações mais relevantes, levando em conta esses dois grupos, serão relatadas a seguir, nos itens 5.1.1 a 5.1.16.



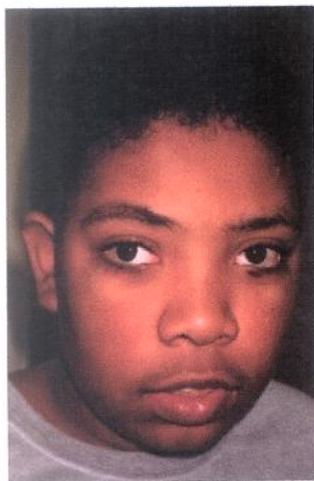
Paciente 1



Paciente 2



Paciente 3



Paciente 4



Paciente 5



Paciente 6



Paciente 7



Paciente 8

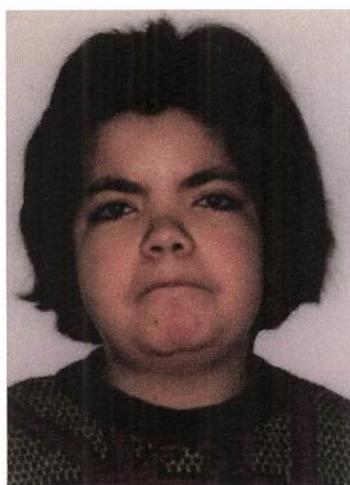


Paciente 9



Paciente 10

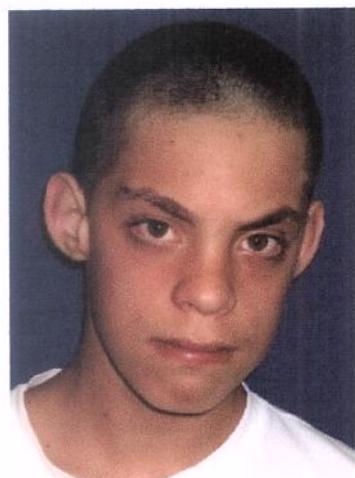
Figura 5.1 – Aspecto facial dos pacientes 1 a 10 do Grupo A.



Paciente 11



Paciente 12



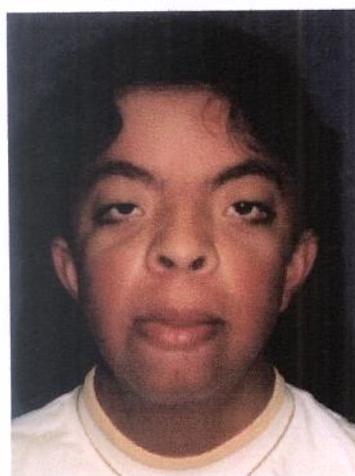
Paciente 13



Paciente 14



Paciente 15



Paciente 16



Paciente 17



Paciente 18

Figura 5.2 – Aspecto facial dos pacientes 11 a 18 do Grupo B

Tabela 5.1 – Resultados da avaliação clínica dos pacientes do Grupo A

PACIENTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Sexo	F	M	M	M	F	F	M	M	M	M	3F:7M
Idade em anos	1,1	2	2,9	9,4	11,8	1,1	2,7	1,5	0,8	2,5	3,6
Idade paterna	39	36	34	30	25	39	*	23	32	36	32,7
Idade materna	30	32	26	31	23	35	*	21	24	33	28,3
Intercorrências gestacionais	-	+	-	+	+	+	*	-	+	+	6/9
Intercorrências neonatais	-	+	+	+	+	+	*	-	+	+	7/9
Sucção débil	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	9/10
Hipotonia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
Convulsões	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	5/10
Retardamento mental	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
Incoordenação motora	+	+	ND	+	+	+	+	+	NA [†]	+	8/8
Dificuldade de fala	+	+	ND	+	+	+	+	+	NA [†]	+	8/8
Infecções recorrentes	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	6/10
Baixa estatura	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	5/10
<i>Facies</i> característica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
Eversão da pálpebra inferior	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
Fenda palpebral alongada	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
Sobrancelhas arqueadas	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9/10
Ponta nasal voltada p/ baixo	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	9/10
Lábio inferior evertido	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	7/10
Palato alto/fendido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10
Anomalias dentais	+	+	-	+	+	-	+	‡	‡	-	5/8
Braquidactilia	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	6/10
Clinodactilia de 5º dedo	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	7/10
Ausência de trirrádio <i>c</i> e/ou <i>d</i>	<i>c</i>	<i>c/d</i>	-	<i>c/d</i>	<i>c/d</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c/d</i>	<i>c</i>	-	8/10
Excesso de pregas palmares	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	6/10
<i>Finger pads</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10/10

*- sem informações, paciente adotado

ND – não determinado

NA – não analisável

† - retardamento mental grave

‡- dentição incompleta

Tabela 5.2 – Resultados dos exames complementares dos pacientes do Grupo A

PACIENTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Anomalia de SNC à TCC	-	-	NR	+	+	-	-	+	-	-	3/9
Fundo de olho alterado	-	-	NR	-	-	-	-	-	+	-	1/9
Escoliose	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	4/10
Hemivértebras	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	3/10
Cardiopatía	-	+	-	+	-	-	-	-*	+	-	3/10
Anomalia renal	-	+	-	+	-	-	-†	-	-	-	2/10
Imunodeficiência	-	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	0/8
Hipoacusia	-	-	NR	+	-	NR	-	+‡	NR	NR	1/6
Cariótipo alterado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10
Análise molecular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/10

SNC - sistema nervoso central

TCC - tomografia computadorizada de crânio

NR - exame não realizado

* - ecocardiografia mostrando uma redução de fluxo de válvula aorta, mas não caracterizando coartação.

† - baço acessório

‡ - perda auditiva pela audiometria condicionada

Tabela 5.3 – Resultados da avaliação clínica dos pacientes do Grupo B

PACIENTES	11	12	13	14	15	16	17	18	Total
Sexo	F	F	M	M	F	F	M	M	4F:4M
Idade em anos	0,6	8,5	12,1	4,6	3	10,9	7,9	9,3	7,1
Idade paterna	32	39	33	61	23	22	19	23	31,5
Idade materna	26	29	24	20	15	22	18	22	22
Intercorrências gestacionais	-	-	-	+	+	-	-	+	3/8
Intercorrências neonatais	-	-	-	-	+	+	-	+	3/8
Sucção débil	+	-	-	+	-	-	+	-	3/8
Hipotonia	+	+	-	+	+	-	+	+	6/8
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8
Retardamento mental	+	-	+	+	+	-	+	+	6/8
Incoordenação motora	+	-	-	-	+	-	-	+	3/8
Dificuldade de fala	-	-	-	+	+	-	-	+	3/8
Infecções recorrentes	+	-	-	-	+	+	+	+	5/8
Baixa estatura	+	+	+	-	+	-	-	+	5/8
<i>Facies</i> característica	+	+	+	+	+	+	+	+	8/8
Eversão da pálpebra inferior	+	+	+	+	+	+	+	+	8/8
Fenda palpebral alongada	+	+	+	+	+	+	+	+	8/8
Sobrancelhas arqueadas	-	+	+	-	+	+	+	+	6/8
Ponta nasal voltada p/ baixo	-	+	+	-	+	+	-	+	5/8
Lábio inferior evertido	-	-	+	-	-	+	+	+	4/8
Palato alto/fendido	+	+	+	+	+	+	+	+	8/8
Anomalias dentais	-	-	-	+	+	-	-	-	2/8
Braquidactília	+	-	+	-	+	-	-	+	4/8
Clinodactília de 5 ^o dedo	+	-	-	-	+	-	-	-	2/8
Ausência de trirrádio <i>c</i> e/ou <i>d</i>	-	<i>c</i>	-	-	<i>c</i>	<i>c</i>	-	<i>c/d</i>	4/8
Excesso de pregas palmares	-	-	-	-	+	-	-	+	2/8
<i>Finger pads</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	8/8

Tabela 5.4 – Resultados dos exames complementares dos pacientes do Grupo B.

PACIENTES	11	12	13	14	15	16	17	18	Total
Anomalia de SNC à TCC	-	NR	NR	-	-	NR	NR	-	0/4
FO alterado	-	NR	NR	NR	-	NR	NR	-	0/3
Escoliose	-	-	NR	-	-	-	NR	-	0/6
Hemivértebras	-	-	NR	-	*	-	NR	-	0/6
Cardiopatía	+	-	-	+	-	NR	NR	+	2/6
Anomalia renal	-	-	NR	-	-	†	-	-	0/7
Imunodeficiência	+	-	NR	NR	-	-	NR	-	1/5
Hipoacusia	-	NR	NR	NR	-	-	NR	NR	0/3
Cariótipo alterado	45,X/46,X,+mar	46,XX,del 18p	-	-	45,X/46,X,+mar	-	-	-	3/8
Análise molecular	-	-	-	-	-	-	-	-	0/8
Diagnóstico	ST	Monos. 18p	RM a/e	SN	ST	SN	RM a/e	SN	

SNC - sistema nervoso central

TCC - tomografia computadorizada de crânio

NR - exame não realizado

* - osteopenia evidenciada no raio-X de coluna e na cintilografia

† - útero bicornio

FO - fundo de olho

ST - síndrome de Turner

RM a/e - retardamento mental a esclarecer

SN - síndrome de Noonan

5.1.1. Razão de sexo

Entre os 18 indivíduos estudados, 11 (61,1%) são do sexo masculino e 7 (38,9%) são do sexo feminino, desvio esse que não chega a ser significativo ($\chi^2_{(1)} = 0,889$; $0,30 < P < 0,50$). Esse predomínio do sexo masculino, também não significativo, foi observado no grupo A, composto por 7 meninos e 3 meninas ($\chi^2_{(1)} = 1,6$; $0,20 < P < 0,30$), enquanto no grupo B não houve desvio da razão de sexo.

5.1.2. Média das idades materna e paterna por ocasião do nascimento

A idade materna média por ocasião do nascimento dos pacientes que compõem o grupo A foi de $\bar{x}=28,3$ com $s=4,95$, para 9 casos informativos, valor que não difere significativamente do verificado em amostras de caucasóides da região de Campinas, SP, ($\bar{x}=26,6$; $s=5,91$; $n=10912$), segundo os dados de BEIGUELMAN & VILLAROEL-HERRERA (1993) ($t=1,05$; $0,20 < P < 0,30$).

Já para o grupo B, a média da idade materna ao nascimento dos propósitos foi de $\bar{x}=22$, com $s=4,44$, sendo os 8 casos informativos, valor este que mostra diferença significativa ao nível de 5%, quando comparado ao obtido por BEIGUELMAN & VILLAROEL-HERRERA (1993) ($t=2,929$; $0,001 < P < 0,01$).

Quanto à idade paterna, o valor médio obtido para o grupo A, sendo 9 casos informativos, foi de $\bar{x}=32,67$ com $s=5,74$, valor que não difere do observado por PILOTTO, MAGNA, BEIGUELMAN (1993) ($\bar{x}=30,20$; $s=8,76$; $n=1011$) em amostra da população de Curitiba, PR ($t=1,28$; $0,20 < P < 0,30$). Para o grupo B, a média foi de $\bar{x}=31,5$ com $s=13,73$, também não diferindo significativamente da amostra mencionada ($t=0,27$; $0,30 < P < 0,40$).

5.1.3. Dados familiares

Nos antecedentes familiares, levando em conta informações como recorrência de quadro semelhante e(ou) retardamento mental e(ou) anomalias congênitas, não se constataram alterações dignas de nota nos grupos A e B. Todos os casos foram considerados esporádicos e não houve qualquer relato de consangüinidade entre os genitores.

Quanto à origem étnica, no grupo A, 1 paciente tinha ascendência negróide, tanto materna quanto paterna, 1 tinha ascendentes asiáticos e os demais eram predominantemente caucasóides, porém com relato de miscigenação entre europeus latinos e não-latinos, sem

informações mais específicas que permitissem caracterizar melhor as diferentes etnias. No grupo B, 2 pacientes tinham ascendentes negróides, 1 tinha ascendência ameríndia e para os demais, como no grupo A, houve relato de miscigenação entre etnias caucasóides, também sem dados mais específicos.

5.1.4. Antecedentes gestacionais

No grupo A, houve referência a episódios de sangramento vaginal e ameaça de abortamento no primeiro trimestre em 2 casos, febre em períodos intermitentes no segundo trimestre em 2, doença hipertensiva específica da gestação em outros 2 e, em 1, sofrimento fetal agudo devido a acidente automobilístico no terceiro trimestre, que evoluiu para trabalho de parto prematuro.

No grupo B, houve relato de sangramento vaginal com ameaça de abortamento no primeiro trimestre em 1 caso, febre em períodos intermitentes durante o segundo trimestre em 1 e referência não confirmada a uso de *Cannabis sativa* e cocaína em outro.

5.1.5. Antecedentes peri e neonatais

Como intercorrências neonatais, no grupo A, houve relato de 1 neonato hidrópico, 1 com artéria umbilical única, além de 3 prematuros, os quais desenvolveram icterícia, sendo que 2 deles tiveram broncoaspiração meconial e 1 teve o diagnóstico de atresia parcial de vias biliares demonstrado pelo ultra-som abdominal. Posteriormente, os resultados da avaliação da função hepática desse paciente foram normais.

No grupo B, foi relatado 1 parto com apresentação pélvica, além de 2 recém-natos com icterícia neonatal, 1 deles também com impetigo bolhoso.

5.1.6. Desenvolvimento neuropsicomotor

Todos os pacientes do grupo A tinham retardamento mental em graus variados, considerando as informações das instituições onde eram acompanhados, já que não foram submetidos a avaliação específica durante a aplicação do protocolo. Todos eles freqüentavam instituições para indivíduos treináveis, educáveis e semi-dependentes, ou mesmo independentes para as atividades cotidianas, à exceção de um (paciente 4) que manifestou alguma dificuldade de aprendizado, mas teve condição de ser matriculado em classe normal de escola da rede pública, com suporte psicopedagógico. Com relação a esse indivíduo, a despeito de não ter sido avaliado objetivamente, possuía boa memória visual e auditiva, opiniões bem formadas e senso crítico apurado, além de capacidade para leitura, embora não conseguisse expressar-se pela linguagem escrita, possivelmente pelos tremores intencionais e pela incoordenação motora que apresentava.

Dois dos pacientes desse grupo (9 e 10) tiveram atraso importante no desenvolvimento neuropsicomotor, mas ambos nasceram prematuramente e tiveram complicações, nos períodos peri e neonatal, que poderiam ter contribuído para a exacerbação do comprometimento neurológico.

A dificuldade de sucção esteve presente em 9 indivíduos do grupo A, e todos tiveram hipotonia durante os primeiros meses de vida. O atraso e(ou) dificuldade na área da linguagem também foram observados em todos os pacientes desse grupo, sendo que 3 iniciaram crises convulsivas na primeira infância.

Quanto ao grupo B, 6 dos 8 pacientes apresentaram retardamento mental em graus variados. É importante destacar que, contrariamente ao esperado entre indivíduos com perda cromossômica similar, a paciente 12, com monossomia 18p, tinha desempenho escolar e interação social satisfatórios, apesar do comportamento introspectivo. Três indivíduos tiveram atraso e(ou) dificuldade na área da linguagem. Nenhum paciente apresentou convulsão, havendo relato de sucção débil em apenas 3 e de hipotonia em 6.

5.1.7. Dados antropométricos

Entre os dados antropométricos avaliados, enfatizaram-se especialmente a estatura, o perímetro cefálico e as medidas das distâncias intercantais interna e externa, além do comprimento da fenda palpebral, tendo em vista as características da SK.

Dos 10 pacientes do grupo A, 4 apresentaram baixa estatura, considerando o canal de crescimento da família, quando foi possível calculá-lo. É oportuno ressaltar que esses pacientes possuíam estatura normal no início do acompanhamento e, com a evolução, apesar das medidas estarem dentro da curva de normalidade (JONES, 1997), encontravam-se abaixo do canal da família. Com relação ao peso, 2 pacientes estavam abaixo do percentil 3 (JONES, 1997). Encontrou-se microcefalia em 3 indivíduos deste grupo.

Quanto às distâncias intercantal externa e interna e à distância interpupilar, assim como ao comprimento da fenda palpebral, todos os pacientes apresentaram medidas acima do percentil 97 (JONES, 1997).

No grupo B, também considerando o canal de crescimento da família, constatou-se baixa estatura em 5 dos 8 pacientes. Nenhum indivíduo apresentou baixo peso e a microcefalia não foi observada em nenhum deles. Com relação às medidas das distâncias intercantal externa e interna, bem como ao comprimento da fenda palpebral e distância interpupilar, todas estavam acima do percentil 97.

5.1.8. Alterações crânio-faciais

A *facies*, descrita como peculiar na SK, foi observada em todos os 18 pacientes, sendo o principal elemento na seleção da amostra. Todos apresentaram eversão da pálpebra inferior em graus variados e fendas palpebrais alongadas. As sobrancelhas só não eram arqueadas em 1 paciente do grupo A e em outro do grupo B, mas eram rarefeitas distalmente em 9 indivíduos do grupo A e em 4 do grupo B. Todos os pacientes do grupo A e 5 do grupo B possuíam ponta nasal voltada para baixo, devido ao encurtamento da columela.

O lábio inferior apresentava-se evertido em 7 pacientes do grupo A e em 4 do grupo B, na maioria dos casos devido à hipotonia da musculatura facial.

Quanto às anomalias dentais detectadas nos pacientes do grupo A, 1 apresentou caninos bífidos, 2 tinham apinhamento dentário e 3 mostraram falhas, principalmente de incisivos laterais superiores. Quanto ao grupo B, 3 apresentaram má-oclusão dentária e 1 tinha ausência dos incisivos laterais superiores e dos caninos, tanto superiores quanto inferiores.

5.1.9. Alterações do sistema nervoso central

Com relação às anomalias estruturais do sistema nervoso central, dentre os 9 indivíduos do grupo A que realizaram tomografia axial computadorizada de crânio, detectaram-se alterações sugestivas de infarto isquêmico em 1, hipodensidade de substância branca também em 1, além de lesão cística em região frontal e dilatação ventricular em outro.

Já no grupo B, para os 3 pacientes que puderam realizar tomografia axial computadorizada de crânio, os resultados foram normais.

5.1.10. Anomalias esqueléticas

No grupo A, 6 pacientes apresentavam braquidactilia[†] de todos os dedos, 7 tinham clinodactilia de 5º dedo e, no exame radiológico, ao qual todos foram submetidos, 4 mostraram escoliose, 4 tinham hemivértebras e *spina bífida*, predominantemente em segmento torácico e, dentre esses, 3 apresentavam luxação congênita de quadril.

[†] - relação dedo médio/mão menor que 40%, segundo JONES, 1997

Quanto aos 8 pacientes do grupo B, além de braqui e clinodactilia de 5^o dedo, verificada em 3, entre os 6 que realizaram raio-X observou-se apenas luxação congênita de quadril em 1.

Embora o PPMF não tivesse sido originalmente incluído no protocolo de investigação (Anexo 2), 16 pacientes submeteram-se a exame de raio-X de mão e punho esquerdo para avaliação do mesmo, mas por dificuldades técnicas o estudo não pôde ser concluído a tempo de os resultados serem incluídos neste trabalho.

5.1.11 Dermatóglifos

A pesquisa de coxins adiposos em face palmar de falange distal, ou *finger pads*, foi positiva em todos os pacientes da amostra, variando, entretanto, quanto ao grau de manifestação, sendo mais proeminentes e(ou) ocorrendo em todos os dedos em 9 indivíduos, sendo 5 do grupo A e 4 do grupo B.

Quanto às impressões dermatoglíficas palmares, dos 10 pacientes do grupo A, 4 não apresentaram trirrádio somente na região *c* e 4 tiveram-no ausente nas regiões *c* e *d*. No grupo B, 3 tinham ausência de trirrádio em *c* e 1 paciente, nas regiões *c* e *d*.

5.1.12 Avaliação cardiológica

No grupo A, coartação de aorta foi evidenciada em 1 indivíduo, enquanto outro apresentou comunicação inter-atrial tipo *ostium secundum* e 1 teve dilatação de átrio esquerdo com abaulamento do septo para átrio direito. Em 1 dos pacientes desse grupo, apesar do resultado da ecoDopplercardiografia ser considerado normal, mencionou-se que o arco aórtico possuía redução no fluxo e não era completamente analisável, sendo indicada nova avaliação após 1 ano.

Entre os pacientes do grupo B, foram constatados 3 indivíduos com cardiopatia, 1 deles com válvula aórtica bicúspide, 1 com incompetência da válvula tricúspide e 1 com

estenose pulmonar e comunicação inter-atrial, valendo ressaltar que esses 2 últimos pacientes tiveram como diagnóstico final a síndrome de Noonan (SN).

5.1.13 Avaliação oftalmológica

No grupo A, dos 9 pacientes submetidos à avaliação específica, 1 apresentou palidez difusa de retina, 3 tinham estrabismo convergente, necessitando de correção por meio de tampão, e 1 desenvolveu miopia e astigmatismo. No grupo B, somente 3 pacientes realizaram exame oftalmológico e nenhum deles mostrou alteração.

5.1.14 Avaliação otorrinolaringológica

O palato era alto e(ou) estreito em todos os pacientes do grupo A, sendo que 2 deles tinham palato fendido. Já no grupo B, além do palato alto e(ou) estreito em todos os indivíduos, não houve ocorrência de fenda palatina.

Infecções recorrentes de vias aéreas foram relatadas em 6 pacientes do grupo A, em especial a otite média aguda, sendo necessária a colocação de tubo de ventilação em 2, além da realização de adenoidectomia em 1 deles. No grupo B, infecções recorrentes foram descritas em 5 indivíduos, não sendo necessário qualquer procedimento cirúrgico.

Nos 6 pacientes do grupo A submetidos a audiometria, detectou-se hipoacusia condutiva em 2, sendo que 1 deles realizou audiometria condicionada devido à pouca idade. Já no grupo B, dos 3 pacientes que puderam ser submetidos a esse exame, nenhum mostrou perda auditiva.

5.1.15 Alterações imuno-hematológicas

No grupo A, entre os 10 pacientes estudados, 6 tiveram infecções recorrentes, com relato de uso freqüente de antibióticos. Oito realizaram dosagens de imunoglobulinas, sendo os resultados normais para todos.

Quanto ao grupo B, 5 pacientes tiveram infecções recorrentes de vias aéreas, estando 4 deles entre os 5 que realizaram dosagem de imunoglobulinas, com imunodeficiência comprovada em apenas 1, que possuía níveis baixos de imunoglobulina A.

Não se constataram alterações hematológicas no grupo A, enquanto no grupo B um dos pacientes apresentou sangramentos espontâneos freqüentes, com epistaxes, gengivorragia, petéquias e equimoses, sendo verificada deficiência de fator XII de coagulação em investigação realizada no setor de Hematologia.

5.1.16. Outros achados

Confirmou-se refluxo gastro-esofágico em 3 pacientes do grupo A, tornando necessária a cirurgia de funduplicatura de Nissen em 1 deles.

Ainda no grupo A, uma das crianças tinha rim em ferradura e imperfuração anal, sendo submetida a correção cirúrgica. Atualmente, segundo estudo ecográfico, apresenta rim esquerdo com imagem “em bolo” e atrofia cortical à direita, com a função renal aparentemente preservada, conforme avaliação laboratorial específica. Também ao exame ecográfico, constatou-se um baço acessório em um outro paciente.

Realizou-se herniorrafia inguinal bilateral em 3 pacientes do grupo A, 1 deles também apresentava criptorquidia e hidrocele unilateral.

Com relação a anomalias ocasionais, no grupo B encontrou-se 1 paciente com útero bicornio e linfedema de membro inferior esquerdo, com uso de malha de contenção.

5.2. ANÁLISE CROMOSSÔMICA

Todos os indivíduos que compõem a amostra foram submetidos a exame de cariótipo em linfócitos de sangue periférico com técnica de bandamento G, na resolução de 400-500 bandas por lote haplóide.

Como citado anteriormente, sendo um dos critérios de classificação entre os grupos A e B, a análise citogenética dos pacientes do grupo A não revelou nenhuma alteração.

No grupo B, constataram-se aberrações estruturais em 3 cariótipos. A paciente 12 apresentou uma deleção do braço curto do cromossomo 18 [46,XX,del(18)(qter→p11:)] e, nas pacientes 11 e 15, detectou-se um mosaicismo (45,X/46,X,+mar), com o marcador identificado pela técnica de FISH como um provável anel derivado do cromossomo X [45,X/46,X,+?r.ish r(X)(DXZ1+)]. Analisaram-se 500 células de cada paciente, sendo de 38,2% e 61,8%, na paciente 11, e de 35% e 65%, na paciente 15, as proporções observadas entre as linhagens 45,X e [46,X,+?r.ish r(X)(DXZ1+)], respectivamente.

5.3. ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular do gene TUBA2 foi realizada em todos os pacientes da amostra, à exceção de um (paciente 3) que não retornou para coleta de material.

Com relação aos controles normais, nenhum dos 17 pacientes estudados apresentou qualquer diferença quanto à mobilidade eletroforética (*shift*) do padrão de bandas que pudesse ser identificada pela técnica de SSCP, não sendo então necessário aplicar a técnica de seqüenciamento do gene TUBA2.

5.4. DIAGNÓSTICOS DO GRUPO B

Os indivíduos do grupo B foram aqueles para os quais se estabeleceu outra hipótese diagnóstica, após reavaliação clínica fundamentada pelos critérios diagnósticos da SK e(ou) pelo resultado dos exames complementares.

Pelo exame de cariótipo, 3 pacientes tinham cromossomopatia, uma delas, monossomia 18p (paciente 12) e as outras 2 (pacientes 11 e 15), mosaicismo que incluía linhagem monossômica do cromossomo X, com diagnóstico de ST.

Para os pacientes 14, 16 e 18 considerou-se o diagnóstico da SN. A paciente 16 apresentava vários sinais dessa condição, tais como nevus pigmentados, ptose palpebral moderada, retrognatía e linfedema de membro inferior esquerdo. A investigação não revelou anomalias viscerais ou esqueléticas e na análise citogenética, sendo analisadas 50 células, bem como no estudo molecular do gene TUBA2, não se evidenciaram quaisquer alterações. Os pacientes 14 e 18, além de retardamento mental e de alguns dismorfismos faciais, apresentavam baixa estatura e cardiopatia congênita comprometendo coração direito, alterações comumente encontradas na SN. Além disso, o paciente 14 apresentou deficiência do fator XII de coagulação, também descrita na SN (SHARLAND *et al.*, 1992).

Outros 2 pacientes (13 e 17), cujos sinais clínicos, apesar de sugestivos, não foram interpretados como suficientes para definir o diagnóstico de SK, e que não concluíram a investigação complementar, também foram incluídos no grupo B. É importante mencionar que esses 2 indivíduos submeteram-se a exame de cariótipo complementado pela pesquisa de sítios frágeis, em especial o Xq27 [fra(X)], por estarem sendo acompanhados devido a retardamento mental de etiologia não esclarecida, sendo que um deles apresentava ecolalia, distúrbio de comportamento, um irmão supostamente afetado, além do comprometimento intelectual da genitora. O resultado, nos 2 casos, foi negativo.



6. DISCUSSÃO

Entre os 18 pacientes que puderam ser avaliados conforme o protocolo de investigação proposto (Anexo 1), 10 tiveram diagnóstico final de SK (grupo A).

Compararam-se os resultados desse grupo com dados da literatura obtidos em revisão que incluiu a quase totalidade dos casos publicados até agosto de 1998 (WILSON, 1998), complementados pelos apresentados em outro artigo publicado em julho de 1999 (KAWAME *et al.*, 1999), bem como com os dados relativos às amostras especificamente estudadas por esses autores, pois o número de pacientes e os critérios de seleção utilizados foram semelhantes aos empregados no atual estudo (WILSON, 1998; KAWAME *et al.*, 1999). Todas essas informações encontram-se nas tabelas 6.1 e 6.2.

Os itens 6.1.1 a 6.1.16 incluem, além de outros aspectos, a discussão correspondente a essa análise comparativa.

Tabela 6.1 – Comparação entre as características clínicas dos pacientes avaliados no presente estudo, com as daqueles analisados por WILSON (1998)[n=13] e KAWAME *et al.* (1999)[n=18], bem como com as do total de indivíduos incluídos nesses dois artigos [n=201].

PACIENTES	Presente estudo	Dados combinados*	Total de pacientes publicados†
Sexo feminino	3F:7M	15F:16M	104F:97M
Intercorrências gestacionais	6/9	ND	ND
Intercorrências neonatais	7/9	11/13	62/155
Sucção débil	9/10	12/18	ND
Hipotonia	10/10	25/31	61/150‡
Convulsões	3/10	7/31	16/106
Retardamento mental	10/10	31/31	189/199
Incoordenação motora	7/7	ND	ND
Dificuldade de fala	7/7	ND	ND
Baixa estatura	5/10	19/31	147/201
Infecções recorrentes	6/10	21/31§	95/155
<i>Facies</i> característica	10/10	31/31	201/201
Eversão da pálpebra inferior	10/10	28/31	177/193
Fenda palpebral alongada	10/10	30/31	197/199
Sobrancelhas arqueadas	9/10	27/31	153/182
Ponta nasal deprimida	9/10	30/31	141/176
Lábio inferior evertido	7/10	ND	ND
Palato alto/fendido**	10/10	18/31	102/144
Anomalias dentais	5/8	9/13	94/156
Braquidactilia	6/10	5/13	107/143††
Clinodactilia de 5 ^o dedo	7/10	5/13	107/143††
Ausência de trirrádio <i>c</i> e/ou <i>d</i>	8/10	ND	ND
Excesso de pregas palmares	6/10	ND	ND
<i>Finger pads</i>	10/10	29/31	158/194

* - Dados combinados das amostras avaliadas por WILSON, 1998 e KAWAME *et al.*, 1999.

† - Total de pacientes revisados por WILSON, 1998 (n=183), além dos 18 apresentados por KAWAME *et al.*, 1999.

ND – não determinado

‡ - dados nos quais o χ^2 foi significativo

§ - somente otites médias recorrentes

** - palato alto + palato fendido

†† - braquidactilia + clinodactilia

Tabela 6.2 – Comparação entre os resultados dos exames complementares dos pacientes avaliados no presente estudo, com os daqueles analisados por WILSON (1998)[n=13] e KAWAME *et al.* (1999)[n=18], bem como com os do total de indivíduos incluídos nesses dois artigos [n=201].

PACIENTES	Presente estudo	Dados combinados*	Total de pacientes publicados†
Alteração de fundo de olho	1/9	2/18	ND
Anomalia de sistema nervoso	3/9	0/18	ND
Escoliose	4/10	1/31	43/186
Hemivértebras	4/10	0/18	ND
Cardiopatía	3/10	13/31	62/184
Anomalia renal	2/10	14/31‡	45/189‡
Imunodeficiência	0/8	ND	ND
Hipoacusia	1/6	7/18	ND
Anomalia cromossômica	0/10	0/31	ND

* - Dados combinados das amostras avaliadas por WILSON, 1998 e KAWAME *et al.*, 1999.

†- Total de pacientes revisados por WILSON, 1998 (n=183), além dos 18 apresentados por KAWAME *et al.*, 1999.

ND – não determinado

‡ - anomalias genito-urinárias

6.1. QUANTO À CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

6.1.1. Idade

Trata-se de uma amostra correspondente à faixa etária inferior a 12 anos, similar ao observado em estudos anteriores que relacionam predomínio de indivíduos com idades semelhantes (NIKAWA *et al.*, 1981; KUROKI *et al.*, 1981; NIKAWA *et al.*, 1988; entre outros).

6.1.2. Razão de sexo

Houve um predomínio do sexo masculino que, além de não significativo, foi observado em amostra com um número pequeno de indivíduos. Em todo caso, trata-se de resultado que não se contrapõe ao verificado nas diversas amostras de pacientes com hipótese diagnóstica de SK, nas quais não foi constatado desvio significativo da razão de sexo havendo, inclusive, um predomínio do sexo feminino, também não significativo, quando se considera a totalidade dos casos publicados.

6.1.3. Idade dos genitores

A idade dos genitores não diferiu significativamente da população geral, resultado também observado em diversos outros estudos relativos à SK (NIKAWA *et al.*, 1981; KUROKI *et al.*, 1981; NIKAWA *et al.*, 1988; entre outros).

6.1.4. Dados familiares

Para nenhum dos 10 indivíduos analisados houve informação de recorrência familiar ou consangüinidade entre os genitores. Tal observação está de acordo com a literatura, tendo em vista que a maioria dos casos de SK é relatada como esporádica.

De todo modo, é importante mencionar que o padrão de herança sugerido em algumas genealogias nas quais houve recorrência da SK é o autossômico dominante com expressividade variável (HALAL *et al.*, 1989; SAY *et al.*, 1993; SILENGO *et al.*, 1996; KOBAYASHI, 1996; McKUSICK, 1996; TSUKAHARA, 1997). No presente estudo, o relato da ocorrência exclusiva de casos esporádicos, acometendo ambos os sexos em proporção semelhante, encontrando-se a maioria dos indivíduos fora da idade reprodutiva e, portanto, sem informações relativas a uma eventual descendência, não fala contra o padrão de transmissão em questão.

6.1.5. Etnias

A caracterização da amostra foi dificultada com relação à especificação das etnias, que foi considerada como predominantemente caucasóide, existindo miscigenação entre europeus latinos e não-latinos, negros, asiáticos e ameríndios, não sendo constatada diferença quando comparada aos dados da literatura (WILSON, 1998; KAWAME *et al.*, 1999; MHANNI, CROSS, CHUDLEY, 1999).

É importante notar que, a despeito da subjetividade que envolve esse tipo de avaliação, ao analisar a *facies* dos indivíduos não-orientais da amostra atual, cujas características de fendas palpebrais e sobrancelhas são, de um modo geral, até mais evidentes do que as do único oriental (paciente 3), não dispomos de elementos que nos permitam concordar com WILSON (1998), que sugeriu ser o aspecto fisionômico dos indivíduos orientais mais próximo ao da máscara do teatro Kabuki do que o dos não-orientais.

6.1.6. Antecedentes gestacionais, peri e neonatais

As intercorrências gestacionais não foram especificadas nos estudos anteriores de modo a permitir a comparação com a amostra atual. No entanto, analisando alguns outros relatos, foi possível verificar que as intercorrências mencionadas são similares (NIKAWA, *et al.*, 1988; SCHRANDER-STUMPEL *et al.*, 1994; BURKE & JONES, 1995; KAWAME, 1999).

Os pacientes 9 e 10 foram prematuros e tiveram várias intercorrências neo e perinatais, com permanência prolongada em unidade de terapia intensiva neonatal, relato de paradas cardio-respiratórias e intubações, além da necessidade de oxigenioterapia e antibioticoterapia. Essas complicações podem ter contribuído para o retardamento mental grave que ambos apresentam.

Com relação ao paciente 9, que também teve o diagnóstico de atresia parcial de vias biliares, há a descrição de um recém-nato com colangite esclerosante, tendo os autores sugerido uma avaliação mais acurada para SK em casos com colestase neonatal (EWART-

TOLAND *et al.*, 1998). Foi descrita ainda uma outra criança com aspecto facial sugestivo da SK que apresentou colestase intra-hepática por obstrução de ductos biliares principais, mas cujo diagnóstico final foi de síndrome de Hardikar (COOLS & JAEKEN, 1997).

6.1.7. Desenvolvimento neuropsicomotor

Observa-se retardamento mental em cerca de 94% dos casos de SK, sendo descrito como de leve a moderado (WILSON, 1998). A presente amostra não diferiu significativamente do esperado, com base nos dados da literatura, exceto pelos dois casos de retardamento grave, possivelmente exacerbado pelas intercorrências peri e neonatais, conforme mencionado no tópico anterior.

Com relação às convulsões, 3 pacientes desenvolveram crises convulsivas durante a primeira infância, sendo que 1 deles sofreu intercorrências peri e neonatais graves. Além disso, 2 outros tiveram exame eletrencefalográfico alterado, mesmo sem manifestação clínica. Tal resultado também se assemelha ao verificado em estudos anteriores.

Quanto à hipotonia, não houve diferença significativa entre a amostra atual e os pacientes previamente publicados por WILSON (1998) e KAWAME *et al.* (1999). Já com relação ao número total de pacientes com SK identificados, o oposto acontece. Isso poderia ser atribuído ao fato de que, no presente trabalho, assim como nos 2 estudos mencionados, os pacientes foram avaliados pelo mesmo examinador, ou grupo de examinadores, sempre com atenção especial à ocorrência dessa manifestação, enquanto na maioria dos estudos anteriores, os indivíduos que compuseram as amostras são oriundos de centros diferentes.

6.1.8. Antropometria

Entre os resultados relativos à antropometria, merecem menção os que permitem concluir quanto à proporção de baixa estatura e de microcefalia verificado nas amostras anteriores, correspondendo a 75% e 23%, respectivamente, e que não diferiram do observado na amostra atual (WILSON, 1998).

Além desses, deve-se destacar a medida da fenda palpebral, pois o alongamento da mesma é um sinal cardinal da SK. No presente grupo, essa medida esteve acima do percentil 97 em todos os pacientes.

6.1.9. Alterações de sistema nervoso central

As alterações constatadas não são sugestivas de uma anomalia estrutural específica do sistema nervoso central na SK, à semelhança de relatos anteriores.

6.1.10. Anomalias esqueléticas

Com relação às anomalias esqueléticas, os resultados estão de acordo com o comumente encontrado na SK.

6.1.11. Dermatóglifos

Quanto aos trirrádios palmares de regiões *c* e *d*, ausentes em 7 dos 10 pacientes, essa frequência não consta dos estudos realizados para análise comparativa, mas tem sido mencionada em outros trabalhos como um sinal cardinal para a SK (NIIKAWA *et al.*, 1981; KUROKI *et al.*, 1981; NIIKAWA, KUROKI, KAJI, 1982; NIIKAWA *et al.*, 1988), ocorrendo em proporção similar à atual.

Os coxins adiposos em face palmar de falange distal, ou *finger pads*, foram pesquisados especificamente, visto que também são um sinal cardinal na SK, apresentando-se como maiores e mais pronunciados nessa condição do que os observados em outras entidades (NIIKAWA *et al.*, 1982; 1988). Entretanto, vale ressaltar que podem ser vistos também como uma variação eventual da normalidade, ocorrendo em 3% da população (JONES, 1997). Trata-se de uma alteração *minor* associada a ocorrência de edema linfático durante os períodos embrionário e(ou) fetal, e que pode auxiliar no diagnóstico de várias condições (WITT *et al.*, 1987).

No presente estudo, todos os pacientes do grupo A tinham *finger pads*, em sua maioria, proeminentes. Contudo, não está afastada a possibilidade de um desvio de averiguação, já que tal sinal mereceu atenção especial, sendo considerado positivo sempre que constatado, a despeito de, em alguns casos, ser menos evidente.

6.1.12. Avaliação cardiológica

Também quanto às anomalias cardíacas, não houve discordância com relação aos dados da literatura, visto que foi identificada coartação de aorta em 1 caso, além de redução de fluxo em arco aórtico em outro, o que poderia corresponder a uma expressão branda dessa cardiopatia. É importante salientar que esta pode ser uma manifestação da seqüência da obstrução linfática jugular.

6.1.13. Avaliação oftalmológica

Não foi constatada qualquer alteração específica que pudesse ser relacionada à SK, à semelhança do verificado na literatura.

6.1.14. Alterações otorrinolaringológicas

Todos os pacientes apresentaram palato alto e estreito, mas somente 2 tinham fenda palatina. Em estudos anteriores, esses 2 dados são mencionados de forma conjunta, não permitindo uma comparação específica. De todo modo, é importante ressaltar que BURKE & JONES (1995) sugeriram que a SK devesse ser pesquisada em qualquer paciente com fenda palatina, já que constataram essa alteração numa frequência considerável (7/8). Entretanto, a amostra estudada por esses autores foi obtida em um serviço de Otorrinolaringologia, o que sugere a possibilidade de um desvio de averiguação.

Quanto às anomalias dentárias, confirmando outros dados de literatura (MFIANNI *et al.*, 1999), os pacientes com diagnóstico de SK que mostraram falhas, tiveram-nas nos incisivos laterais superiores.

Com relação às infecções recorrentes de ouvido médio, tonsilas palatinas e seios paranasais, houve relato em 6 pacientes do grupo, o que está em concordância com dados da literatura que mostram um aumento na frequência dessas infecções em indivíduos com SK (WILSON, 1998; KAWAME *et al.*, 1999).

6.1.15. Alterações imuno-hematológicas

A maioria dos trabalhos consultados mencionam somente a frequência das otites médias agudas, o que dificulta uma análise objetiva da recorrência das infecções em geral. Em todo caso, os dados verificados não deixam de estar de acordo com a literatura (WILSON, 1998), que ressalta a imunodeficiência e a recorrência de infecções na SK.

6.1.16. Outros achados

Algumas alterações constatadas nos pacientes da amostra, como refluxo gastroesofágico, hérnia inguinal, criptorquidia, hidrocele, rim em ferradura, imperfuração anal, baço acessório e atresia parcial de vias biliares, estão de acordo descrições anteriores, o que reforça sua condição de anomalias ocasionalmente presentes na SK.

6.2. ANÁLISE CROMOSSÔMICA

Como o resultado do cariótipo foi utilizado entre os critérios de classificação dos indivíduos em 2 grupos, nenhum paciente do grupo A apresentou anomalia cromossômica, em consonância com o descrito nas últimas publicações (WILSON, 1998; KAWAME *et al.*, 1999; MHANNI *et al.*, 1999). Entretanto, existem relatos esporádicos de anomalias estruturais, tanto de autossomos, quanto de cromossomos sexuais, entre indivíduos de amostras definidas como de pacientes portadores da SK. Tal aspecto merece maior atenção e revisão, não apenas no sentido de melhor caracterizar a SK, ou uma eventual etiologia da mesma, mas principalmente pela similaridade fenotípica com outras entidades, que serão ainda abordadas no item relativo aos diagnósticos diferenciais da SK.

6.3. ANÁLISE MOLECULAR

A pesquisa de mutações do gene TUBA2 foi negativa para todos os pacientes, não confirmando a hipótese sugerida por DODÉ *et al.* (1998) de que esse gene poderia estar relacionado à etiologia da SK.

6.4. DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS DA SK

Alguns diagnósticos diferenciais da SK podem ser discutidos à luz dos resultados observados entre os pacientes do grupo B, que serão detalhados a seguir, em itens específicos.

6.4.1. Aberrações cromossômicas

Dentre os 8 pacientes analisados, 3 apresentaram aberrações cromossômicas. A comparação entre as principais características clínicas dessas cromossomopatias com a SK será apresentada a seguir.

6.4.1.1. Monossomia 18p

Com relação à paciente 12, é importante ressaltar o fato da SK ter sido a hipótese diagnóstica inicial. Realmente, ela apresenta vários sinais dessa condição, conforme pode ser verificado na Tabela 6.3, utilizando dados de JONES (1997) e do programa POSSUM (BANKIER, CHEMKE, ROSE, 1999). Entretanto, considerando o resultado da análise citogenética associada ao quadro clínico da paciente, o diagnóstico final foi estabelecido como de monossomia 18p. Analisando os sinais descritos nessa entidade, relacionados na tabela 6.3, observa-se que existem vários aspectos em comum com a SK, especialmente os faciais.

Tabela 6.3 – Comparação dos sinais clínicos apresentados pela paciente 12, entre a SK e a monossomia 18p.

Sinais clínicos	Paciente 12	Síndrome Kabuki*	Monossomia 18p*
Aberração cromossômica	+	-	+
Baixa estatura	+	+	+
Sucção débil	+	+	+
Microcefalia	+	+	+
Retardamento mental leve	+	+	+
Hipotonia	+	+	+
Infecções recorrentes	+	+	-
Alterações pigmentares	-	-	+
Sobrancelhas arqueadas e rarefeitas	+	+	+
Fenda palpebral alongada	+	+	+
Eversão da pálpebra inferior	+	+	+/-
Ptose palpebral	+	+/-	+
Orelhas grandes e proeminentes	+	+	+
Ponta nasal deprimida	+	+	-
Lábio inferior evertido	-	+	-
Palato alto/fendido	+	+	+
Anomalias dentais (má oclusão)	+	+	+
Escoliose	-	+	+
Clinodactilia de 5 ^o dedo	-	+	+
Anomalia de sistema nervoso central	NR	+	+
Convulsões	-	+	+
Cardiopatias	NR	+	+
Alterações endócrinas	-	+	+

* - Sinais listados conforme POSSUM (BANKIER *et al.*, 1999)

NR – exame não realizado

É importante assinalar que a monossomia 18p não foi descrita em nenhum dos estudos anteriores sobre a SK. Contudo, considerando a heterogeneidade das anomalias autossômicas já relatadas nessa entidade, o que parece mais plausível supor é que o fenótipo descrito na SK poderia, eventualmente, ocorrer em outras condições, incluindo algumas cromossomopatias e, sendo assim, surgem dúvidas quanto a ser oportuna, ou não, a manutenção do diagnóstico de SK nesses casos.

6.4.1.2. Mosaicismo com monossomia e anel de X

Esses dois cariótipos merecem destaque especial, pois a descrição de anomalias estruturais envolvendo os cromossomos sexuais em pacientes com diagnóstico de SK já foi registrada nos trabalhos de NIKAWA *et al.* (1988), DENNIS *et al.* (1993), ABD *et al.* (1996) e MCGINNIS *et al.* (1997).

Particularmente no caso dos anéis de dimensões reduzidas, derivados do cromossomo X, supõe-se a ocorrência de uma super-expressão de seqüências gênicas derivadas do cromossomo X, em conseqüência da perda do centro de inativação em Xq13.2, determinando uma dissomia funcional da região pericêntrica do X. Tal alteração, por sua vez, estaria relacionada a uma possível exacerbação do fenótipo descrito na ST, que passaria a ter semelhanças com o da SK, em especial quanto ao comprometimento cognitivo, embora não seja sempre que pacientes com anel de X e retardamento mental manifestem o fenótipo da SK (MCGINNIS *et al.*, 1997).

No presente estudo, a despeito do quadro clínico justificar a hipótese de SK, o diagnóstico final foi de ST para as 2 pacientes, levando em conta o resultado da análise cromossômica, além dos aspectos clínicos. Sobre isso, ressalta-se que, em pelo menos 3 oportunidades, a ST foi descrita em associação ou concomitante à SK (WELLESLEY & SLANLEY, 1994; ABD *et al.*, 1996; MCGINNIS *et al.*, 1997). Contrariamente a esses artigos, DENNIS *et al.* (1993) afirmam que o quadro clínico de pacientes que possuem um anel de X poderia lembrar o da SK, mas seria diferente dessa condição como um todo.

Analisando em detalhes o fenótipo da ST, comparando às pacientes da presente amostra e aos dados do programa POSSUM (BANKIER *et al.*, 1999) referentes à SK e ao anel de X [46,X,r(X)], podemos observar que vários sinais são compartilhados por essas condições (Tabela 6.4). E, à semelhança do que foi comentado no tópico anterior, surge a dúvida quanto a ser adequada a manutenção da hipótese diagnóstica de SK nessa situação.

Tabela 6.4 – Comparação entre os sinais clínicos das pacientes 11 e 15, os da SK e os da ST

Sinais clínicos	Paciente 11	Paciente 15	Anel de X*	Síndrome Kabuki*	Síndrome de Turner*
Anomalia cromossômica	+	+	+	-	+
Baixa estatura	+	+	+	+	+
Linfedema	+	+	+	-	+
Microcefalia	-	-	+	+	-
Retardamento mental	+	+	+	+	-
Hipotonia	+	+	+	+	-
Sucção débil	+	-	+	+	+/-
Infecções recorrentes	+	-	-	+	-
Sobrançelas arqueadas	-	+	+	+	-
Fenda palpebral alongada	+	+	+	+	+
Eversão da pálpebra inferior	+	+	-	+	+/-
Ptose palpebral	-	-	-	+/-	+
Orelhas grandes e proeminentes	-	-	+	+	-
Ponta nasal deprimida	+	+	+	+	-
Lábio inferior evertido	-	+	-	+	-
Palato alto/fendido	+	+	+	+	+
Anomalias dentais	+	+	-	+	+/-
Anomalias vertebrais	-	-		+	-
Osteopenia de coluna vertebral	-	+	+	-	+
Clinodactilia de 5 ^o dedo	+	+	+	+	+
Anomalia de sistema nervoso central	-	-	+	+	+/-
Convulsões	-	-	+	+	+/-
Cardiopatias	+	-	+	+	+
Alterações endócrinas	+	+	+	+	+

* - Sinais listados conforme POSSUM (BANKIER *et al.*, 1999)

6.4.2. Síndrome de Noonan

Para três pacientes considerou-se o diagnóstico de SN que, além dos dismorfismos faciais, ainda compartilha várias características com a SK, conforme pode ser constatado na tabela 6.5, onde foram comparados os sinais clínicos desses pacientes com aqueles descritos nas síndromes de Noonan e Kabuki.

Tabela 6.5 – Comparação entre os sinais clínicos dos pacientes 14, 16 e 18, os da SK e os da SN

Sinais clínicos	Paciente 14	Paciente 16	Paciente 18	Síndrome Kabuki*	Síndrome de Noonan*
Autossômica dominante				?	+
Baixa estatura	-	-	+	+	+
Sucção débil	+	-	+	+	+/-
Linfedema	-	+	-	-	+
Microcefalia	-	-	-	+	-
Retardamento mental	+	+	+	+	+
Hipotonia	+	-	+	+	+/-
Infecções recorrentes	-	-	+	+	-
Sobrancelhas arqueadas	+	+	+	+	-
Fenda palpebral alongada	+	+	+	+	+
Eversão da pálpebra inferior	+	+	+	+	+/-
Ptose palpebral	+	+	+	+/-	+
Orelhas grandes e proeminentes	+	+	+	+	-
Ponta nasal deprimida	+	+	+	+	-
Lábio inferior evertido	-	+	+	+	-
Palato alto/fendido	+	+	+	+	+
Anomalias dentais	+	-	+	+	+
Anomalias vertebrais	-	-	-	+	+
Clinodactilia de 5 ^o dedo	+	+	+	+	+
Anomalia de SNC	-	NR	-	+	+/-
Convulsões	-	-	-	+	-
Cardiopatias	+	NR	+	+	+
Alterações hematológicas	+	-	-	+	+

* - Sinais listados conforme POSSUM (BANKIER *et al.*, 1999)

NR – exame não realizado

SNC – sistema nervoso central

A propósito dos diagnósticos de SN e ST, os mesmos não chegaram a causar surpresa, dada a similaridade fenotípica entre essas 2 condições e a já mencionada associação entre a ST e a SK (WELLESLEY & SLANLEY, 1994; DENNIS *et al.*, 1993; ABD *et al.*, 1996; MCGINNIS *et al.*, 1997). Uma hipótese que poderia justificar os sinais compartilhados pelas três entidades seria a da ocorrência de anomalias linfáticas e linfedema durante a embriogênese e(ou) o desenvolvimento fetal, eventos que afetariam o desenvolvimento e a migração de diversos tecidos nesse período.

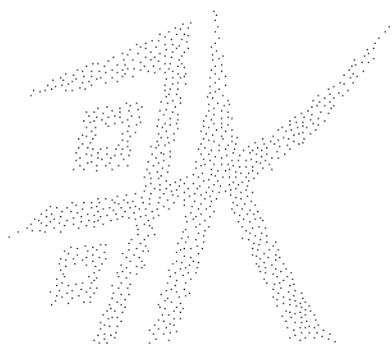
Referindo-se em particular às síndromes de Turner e Noonan, alguns autores sugerem que a ocorrência de obstrução linfática jugular poderia ter papel fundamental na determinação de alguns dismorfismos secundários faciais, tais como hipertelorismo, inclinação posterior de orelhas, pescoço alado, implantação baixa de cabelos na nuca, presença de padrões em verticilo das polpas digitais e, inclusive, a manutenção dos coxins adiposos das mesmas (*finger pads*), além de anomalias *major* como cardiopatias, em particular a coartação de aorta (MENDEZ & OPITZ, 1985; WITT *et al.*, 1987; GUERRA, 1998).

Ainda quanto aos diagnósticos diferenciais da SK, merece menção o fato de um dos pacientes do grupo A (paciente 4) ter recebido o diagnóstico inicial de síndrome de Aarskog (OMIM100050), que acabou sendo afastado durante a investigação. A síndrome de Aarskog é determinada por um gene do cromossomo X, supostamente localizado em Xp11 e transmitido de forma dominante, caracterizando-se por hipertelorismo, braqui e sindactilia, anomalias de genitais com destaque para a inversão peno-escrotal (escroto "em cachecol"), sendo que alguns pacientes podem ter baixa estatura pós-natal, retardamento mental leve, anomalias renais e cardíacas, entre outras. Já se observou que, em algumas ocasiões, a síndrome de Aarskog chegou a ser confundida com a de Noonan (JONES, 1997), pois compartilham várias características, as quais, em parte, podem ser conseqüentes à ocorrência de eventos semelhantes durante a embriogênese, relacionadas à obstrução linfática jugular, já mencionada (MENDEZ & OPITZ, 1985; WITT *et al.*, 1987; GUERRA, 1998).

6.4.3 Casos de etiologia não esclarecida

Ainda no grupo B, 2 pacientes permaneceram sem diagnóstico específico. Um deles, o paciente 13, apresentava baixa estatura e algumas características faciais de SK, além de déficit intelectual, mas não chegou a concluir sua avaliação complementar, sendo os dados disponíveis insuficientes para uma definição diagnóstica. Além disso, havia a informação de recorrência familiar do retardo mental, sendo a distribuição sugestiva de herança ligada ao X, o que falaria mais a favor de outra condição que não a SK.

Com relação ao paciente 17, embora tenha sido encaminhado com suspeita diagnóstica de SK, durante a aplicação do protocolo essa hipótese diagnóstica foi afastada. A estatura encontrava-se dentro do canal de crescimento da família, não apresentava outras anomalias esqueléticas, como braquí e clinodactilia, além dos demais sinais cardinais da SK, sendo o aspecto facial muito semelhante ao da mãe e da avó materna, cuja ascendência é ameríndia, o que poderia justificar o alongamento da fenda palpebral. Além disso, houve relato de intercorrências gestacionais que favoreceriam a hipótese de etiologia não genética.



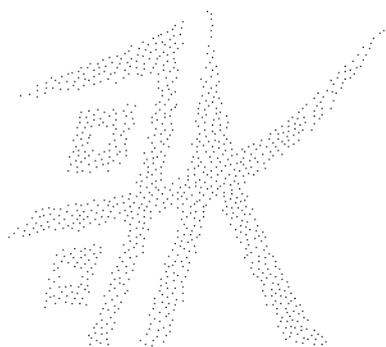
7. CONCLUSÕES

Após a aplicação de um protocolo específico, desenvolvido a partir das principais manifestações da SK, 10 indivíduos tiveram o diagnóstico final dessa condição, entre os 18 selecionados para análise, enquanto 8 receberam outros diagnósticos. Analisando dados relativos aos 2 grupos, pôde-se concluir que:

- À exceção da análise do gene TUBA2, o protocolo de investigação utilizado mostrou-se adequado enquanto instrumento de caracterização da amostra, sendo sugerida sua aplicação sistemática, se possível complementada pela análise do PPMF, em indivíduos com hipótese diagnóstica de SK;
- O gene TUBA2 não apresentou qualquer alteração e, portanto, não deve ser relacionado à etiologia da SK;
- Não foi possível definir com clareza a composição étnica da amostra estudada, mas sua heterogeneidade ficou bem estabelecida, apesar de predominantemente caucasóide;
- Mesmo sendo a amostra composta predominantemente por indivíduos não-orientais, o aspecto facial da máscara do teatro Kabuki pareceu bem evidente, contrariando o sugerido por WILSON (1998), de que isso ocorreria mais entre os indivíduos de ascendência japonesa, enquanto os não-japoneses teriam apenas um fenótipo mais orientalizado. Sobre esse aspecto, seria interessante verificar até que ponto a associação com o teatro Kabuki, manifestação cultural típica do Japão, não seria feita com mais facilidade entre os examinadores japoneses;
- O número de 10 pacientes oriundos de uma população miscigenada, porém predominantemente caucasóide, avaliados durante um período de 18 meses, corrobora o verificado por outros autores quanto ao fato da SK não ser tão rara fora do Japão, como foi inicialmente sugerido por NIIKAWA *et al.* (1988);

- Quanto às características clínicas da SK, a presente amostra se mostrou similar a várias outras descritas na literatura, em praticamente todos os aspectos;
- Entre os sinais que se mostraram divergentes estão a hipotonia e a fenda palatina, o que poderia ser decorrente dos critérios de seleção; de todo modo, seria importante que a avaliação criteriosa de tais características fosse incluída em estudos futuros;
- Quanto à etiologia, a ausência de consangüinidade entre os genitores, bem como de recorrência familiar, além da incidência similar em ambos os sexos, não contraria a hipótese mais comumente sugerida para a SK, que seria a de mutação nova em um gene de transmissão autossômica dominante;
- O fato de 8 pacientes terem recebido outros diagnósticos justifica uma avaliação sistemática dos indivíduos com sinais sugestivos da SK, principalmente quando os mesmos são predominantemente faciais, já que essas características podem estar presentes em outras condições, o que poderia definir um fenótipo Kabuki, conferido pela associação de fenda palpebral alongada, eversão do terço distal da pálpebra inferior e sobrancelhas arqueadas;
- Pela análise realizada quanto aos diagnósticos diferenciais ora considerados, assim como aqueles descritos na literatura, as associações mais consistentes parecem ocorrer com as síndromes de Turner e de Noonan;
- A sobreposição de sinais observada entre as síndrome de Kabuki, Turner e Noonan, sugere a ocorrência de mecanismos semelhantes durante a embriogênese, em parte relacionados ao desenvolvimento do sistema linfático, que poderiam contribuir para o surgimento de alguns desvios da morfogênese, particularmente envolvendo estruturas craniofaciais e cardíacas;

- Considerando as aberrações cromossômicas detectadas na literatura e aquelas verificadas no presente estudo, o aspecto mais significativo diz respeito a ocorrência de anéis do cromossomo X, cuja presença em pacientes com diagnóstico de síndrome de Turner determinaria uma exacerbação do quadro clínico, o que poderia justificar uma aparente concomitância da SK;
- Levando em conta o exposto no item anterior, seria oportuna a revisão do quadro clínico de pacientes com anéis de dimensões reduzidas derivados do cromossomo X, com a determinação da frequência da associação com o fenótipo da SK;
- A monossomia 18p não está entre as cromossomopatias autossômicas anteriormente descritas em pacientes com sinais da SK, mas sua detecção na atual amostra merece menção, pela possibilidade de incluí-la entre as que poderiam cursar com fenótipo semelhante ao da SK;
- Em pacientes com aberrações cromossômicas de um modo geral, ou mesmo entre aqueles com cariótipo normal, cujo conjunto de sinais acaba sendo sugestivo de outra condição, poder-se-ia considerar a ocorrência de manifestações faciais que corresponderiam ao já mencionado fenótipo Kabuki, ficando a designação de SK reservada para os casos nos quais outras características dessa entidade estivessem presentes, incluindo aquelas verificadas pela investigação complementar;
- Estudos mais detalhados envolvendo amostras maiores e oriundas de diferentes centros brasileiros, ou mesmo da América Latina, utilizando metodologia semelhante, seriam oportunos no sentido de melhor caracterizar a SK em nossas populações.



8. SUMMARY

The Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome (KS), first and independently described in Japan in 1981 by Niikawa *et al.* and Kuroki *et al.*, is a multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome. This syndrome is characterized by a peculiar *facies* which resembles the Kabuki theatre make-up, with long palpebral fissures and eversion of lower lids, arched eyebrows, depressed nasal tip and prominent ears, mild to moderate mental retardation, postnatal growth retardation, skeletal abnormalities and dermatoglyphic anomalies. The incidence in Japan was estimated around 1:32,000 newborns; the frequency of non-Japanese patients is not available, although the number of cases has been increasing each year. The etiology remains undetermined and most cases have been sporadic. In Brazil, there have been a few reports of this condition, all of them corresponding to isolated descriptions. In order to better characterize KS among the children referred to the Department of Genetics, we applied strict clinical and laboratory criteria. Between June, 1998 and December, 1999, 18 patients were found to have KS. The molecular analysis of TUBA2 gene was included because some investigators have suggested that it could be related to this syndrome. Of 17 patients examined all of them did not have mutations of the TUBA2 gene, which had not confirmed the previous suggestion. Three females and seven males, mostly Caucasians, fulfilled the clinical criteria for KS. The remaining four females and four males were considered to have Noonan syndrome (3), Turner syndrome (2), monosomy 18p (1). Two patients did not complete their clinical evaluation. Among the KS patients, 100% presented the peculiar facial aspect, besides mental retardation in different degrees, 80% had dermatoglyphic abnormalities, 60% had vertebral anomalies and 50% presented with short stature. There was no sex predilection, family history of other cases, parental consanguinity or familial recurrences suggesting that these cases occur sporadically. Taken together these data support the hypothesis that the etiology of KS results from a *de novo* mutation in a dominant gene. The clinical and laboratory assessment developed in our study is useful by characterizing patients with KS and should be applied to patients with clinical features suggestive of KS. The high degree of overlapping clinical features between KS and Noonan and Turner syndrome, especially in patients with chromosome X rings, reinforces the necessity of a thorough evaluation when one of these conditions are contemplated as a possible diagnosis. Until a specific genetic marker is available, multicenter studies might contribute to a better characterization of KS.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD, S.E.; WILSON, L.; HOWLIN, P.; PATTON, M.A.; WINTGENS, A.M.; WILSON, R. - Agenesis of the corpus callosum in Turner syndrome with ring X. **Dev. Med. Child. Neurol.**, **39**:119-124, 1997.
- BANKIER, A.; CHEMKE, J.; ROSE, M. – **POSSUM – Pictures of standard syndromes and undiagnosed malformations**. Version 5.01. Melbourne. The Murdoch Institute for Research into Birth Defects, Royal Children's Hospital. 1999.
- BEIGUELMAN, B. – **Curso prático de bioestatística**. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética. 1988. 242p.
- BEIGUELMAN, B. & VILARROEL-HERRERA, H. - Factors influencing the decline of twinning incidence in a Southeastern Brazilian population. **Rev. Bras. Genet.**, **16**:793-801, 1993.
- BRAUN, O.H. & SCHMID, E. - Kabuki make-up syndrome in Europe. **J. Pediatr.**, **105**:848-850, 1984. [Letter]
- BURKE, L.W. & JONES, M.C. - Kabuki syndrome: underdiagnosed recognizable pattern in cleft palate patients. **Cleft Palate Craniofac. J.**, **32**:77-84, 1995.
- CAMERA, G.; POZZOLO, S.; CARTA, M.; RIGHI, E. – Peter's-Plus syndrome: report on an unusual case. **Pathologica**, **86**:673-675, 1994.
- CARCIONE, A.; PIRO, E.; ALBANO, S.; CORSELLO, G.; BENENATI, A.; PICCIONE, M.; VERDE, V.; GIUFFRÉ, L.; ALBANCSE, A. - Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: clinical and radiological observations in two Sicilian children. **Pediatr. Radiol.**, **21**:428-431, 1991.
- CHZARNOWSKA, K.H.; KRAJEWSKA-WALASEK, M.; KUS J.; MICHALKIEWICZ, J.; MAZIARKA, D.; WOLSKI, J.K.; BRECEVIC, L.; MADALINSKI, K. - Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome associated with immunodeficiency. **Clin. Genet.**, **53**(4):308-312, 1998.

- CHU, D.-C.; FINLEY, S.C.; YOUNG, D.W.; PROUD, V.K. - CNS Malformation in a child with Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome: report and review. **Am. J. Med. Genet.**, **73**:205-206, 1997.
- COOLS, F. & JAEKEN, J. – Hardikar syndrome: a new syndrome with cleft lip/palate, pigmentary retinopathy and cholestasis. **Am. J. Med. Genet.**, **71**:472-474, 1997.
- DENNIS, N.R.; COLLINS, A.L.; CROLLA, J.A.; COCKWELL, A.E.; FISHER, A.M.; JACOBS, P.A. - Three patients with ring (X) chromosomes and a severe phenotype. **J. Med. Genet.**, **30**:482-486, 1993.
- DEVRIEND, T.K. & FRYNS, J.P. - The Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome and isolated transient hyperphosphatasemia. **Clin. Genet.**, **45**:330-331, 1994. [Letter]
- DEVRIENDT, K.; LEMLI, L.; CRAEN, M.; DE ZEGHER, F. - Growth hormone deficiency and premature thelarche in a female infant with Kabuki makeup syndrome. **Horm. Res.**, **43**:303-306, 1995.
- DEVRIENDT, K.; VAN DEN BERGHE, H.; FRYNS, J.P.; VAN REEMPST, P. - Large congenital follicular ovarian cyst in a girl with Kabuki syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **65**:90-91, 1996. [Letter]
- DI GENNARO, G.; CONDOLUCI, C.; CASALI, C.; CICCARELLI, O.; ALBERTINI, G. - Epilepsy and polymicrogyria in Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome. **Pediatr. Neurol.**, **21**(2):566-8, 1999.
- DODÉ, C.; WEIL, D.; LEVILLIERS, J.; CROZET, F.; CHAIB, H.; LEVI-ACOBAS, F.; GUILFORD, P.; PETIT, C. - Sequence characterization of a newly identified human α -tubulin gene (TUBA2). **Genomics**, **47**:125-130, 1998.
- DUNCAN, A.M.V.; MACDONALD, A.; BROWN, C.J.; WOLF, D.; WILLARD, H.F.; SUTTON, B. - Characterization of a small supernumerary ring X chromosome by fluorescence in situ hybridization. **Am. J. Med. Genet.**, **47**:1153-1156, 1993.

- EWART-TOLAND, A.; ENNS, G.M.; COX, V.A.; MOHAN, G.C.; ROSENTHAL, P.; GOLABI, M. - Severe congenital anomalies requiring transplantation in children with Kabuki syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **80**:362-270, 1998.
- FRANCESCHINI, P.; VARDEU, M.P.; GUALA, A.; FRANCESCHINI, D.; TESTA, A.; CORRIAS, A.; CHIABOTTO, P. - Lower lip pits and complete idiopathic precocious puberty in a patient with Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **47**:423-425, 1993.
- FRYNS, J.-P.; VAN DEN BERGHE, H.; SCHRANDER-STUMPEL, C. - Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome and paracentric inversion of the short arm of chromosome 4. **Am. J. Med. Genet.**, **53**:204-205, 1994. [Letter]
- FRYNS, J.-P. & DEVRIENDT, K. - Hypoplastic clavicalae in the Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome. **Genet. Counsel.**, **1**(9):57-58. 1998. [Letter]
- GALÁN-GÓMEZ, E.; CARDESA-GARCÍA, J.J.; CAMPO-SAMPEDRO, F.M.; SALAMANCA-MAESSO, C.; MARTÍNEZ-FRÍAS, M.L.; FRÍAS, J.L. - Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome in five spanish children. **Am. J. Med. Genet.**, **59**:276-282, 1995.
- GILLIS, R.; KLAR, A.; GROSS-KIESELSTEIN, E. - The Niikawa-Kuroki (Kabuki make-up) syndrome in a Moslem Arab child - **Clin. Genet.**, **38**:378-381.; 1990.
- GUERRA, A.T.M. - A evolução dos diagnósticos clínico e citogenético da síndrome de Turner: *cherchez la petite fille*. Campinas, 1998. [Tese – Livre-docência – Universidade Estadual de Campinas]
- HAJE, S.A. - Luxação congênita do quadril na síndrome da maquilagem Kabuki: relato de caso. **Rev. Bras. Ortop.**, **31**(1):46-9, 1996.
- HALAL, F.; GLEDHILL, R.; DUDKIEWICZ, A. - Autosomal dominant inheritance of the Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **33**:376-381, 1989.

- HANDA, Y.; MAEDA, K.; TOIDA, M.; KITAJIMA, T.; ISHIMARU, J.-I.; NAGAI, A.; OKA, N. - Kabuki make-up syndrome (Niikawa-Kuroki syndrome) with cleft lip and palate. **J. Cranio-Max. -Fac. Surg.**, **19**:99-101, 1991.
- HO, H.H. & EAVES, L.C. - Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: connective abilities and autistic features. **Dev. Med. Child. Neurol.**, **39**:487-490, 1997.
- HOSTOFFER, R.W.; BAY, C.A.; WAGNER, K.; VENGLARCIK, J.; SAHARA, H.; OMAIR, E.; CLARK, H.T. - Kabuki make-up syndrome associated with an acquire hypogammaglobulinemia and anti-IgA antibodies. **Clin. Pediatr.**, **35**:273-276, 1996.
- HUGHES, H.E. & DAVIES, S.J. - Coarctation of the aorta in Kabuki syndrome. **Arch. Dis. Child.**, **70**:512-514, 1994.
- IJICHI, O.; KAWAKAMI, K.; MATSUDA, Y.; IKARIMOTO, N.; MYATA, K.; TAKAMATSU, H.; TOKUNAGA, M. - A case of Kabuki make-up syndrome with EBV+ Burkitt's lymphoma. **Acta Paediatr. Jpn.**, **38**:66-68, 1996.
- IKEGAWA, S.; SAKAGUCHI, R.; KIMIZUKA, M.; YANAGISAKO, Y.; TOKIMURA, F. - Recurrent dislocation of the patella in Kabuki make-up syndrome. **J. Pediatr. Orthop.**, **13**:265-267, 1993.
- ILYINA, H.; LURIE, I.; NAUMTCHIK, I.; AMOASHY D.; STEPHANENKO, G.; FEDOTOV, V.; KOSTJUK, A. - Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome in the byelorussian register of congenital malformations: ten new observations. **Am. J. Med. Genet.**, **56**:127-131, 1995.
- IWAMA, Y.; SUGIYAMA, S.; KAIGA, K.; EGUCHI, M.; FURUKAWA, T. - Kabuki make-up syndrome associated with megaureter. **Acta Paediatr. Jpn.**, **29**:182-185, 1987.

JACKY, P.B.; AHUJA, Y.R.; ANYANE-YEBOA, K.; BREG, W.R.; CARPENTER, N.J.; FROSTER-ISKENIUS, U.G.; FRYNS, J.P.; GLOVER, T.W.; GUSTAVSON, K.H.; HOEGERMAN, S.F.; HOWARD-PEEBLES, P.N.; JENKINS, E.C.; KRAWCZUN, M.S.; NERI, G.; PETTIGREW, A.; SCHAAP, T.; SCHONBERG, S.A.; SHAPIRO, L.R.; SPINNER, N.; STEINBAEH, P.; VIANNA-MORGANTE, A.M.; WATSON, M.S.; WILMOT, P.L. – Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. **Am. J. Med. Genet.**, **38**:400-403, 1991.

JARDINE, P.E.; BURVILL-HOLMES, L.C.; SCHUTT, W.H.; LUNT, P.W. - Partial 6q monosomy/partial 12q trisomy in a child with features of Kabuki make-up syndrome. **Clin. Dysmorphol.**, **2**:269-273, 1993.

JONES, K.L. - **Smith's recognizable patterns of human malformation**. 5.ed. Philadelphia. Saunders. 1997. 861p.

KAISER-KUPFER, M.I.; MULVIHILL, J.J.; KLEIN, K.L.; PARRY, D.M.; SCHLESINGER, S.L. - The Niikawa-Kuroki (Kabuki make-up) syndrome in an american black. **Am. J. Ophthalmol.**, **102**:667-668, 1986. [Letter]

KASUYA, H.; SHIMIZU, T.; NAKAMURA, S.; TAKAKURA, K. - Kabuki make-up syndrome and repost of a case with hydrocephalus. **Child's Nerv. Syst.**, **14**(16):230-235, 1998.

KAWAME, H.; HANNIBAL, M.C.; HUDGINS, L.; PAGON, R.A. - Phenotypic spectrum and management issues in Kabuki syndrome. **J. Pediatr.**, **134**(4): 480-485, 1999.

KOBAYASHI, O. & SAKURAGAWA, N. - Inheritance in Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **61**:92-93.; 1996. [Letter]

KOKITSU-NAKATA, N.M.; VENDRAMINI, S.; GUION-ALMEIDA, M.L. - Lower lip pits and anorectal anomalies in Kabuki syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **86**(3):282-284, 1999.

- KOUTRAS, A. & FISHER, S. - Niikawa-Kuroki syndrome: a new malformation syndrome of postnatal dwarfism, mental retardation, unusual face, and protruding ears. **J. Pediatr.**, **101**:417-419, 1982.
- KUROKI, Y.; SUSUKI, Y.; CHIO, H.; HATA, A.; MATSUI, I. - A new malformation syndrome of long palpebral fissures, large ears, depressed nasal tip, and skeletal anomalies associated with postnatal dwarfism and mental retardation. **J. Pediatr.**, **99**(4):570-573, 1981.
- KUROKI, Y.; KATSUMATA, N.; EGUSHI, T.; FUKUSHIMA, Y.; SUWA, S.; KAJIL, T. - Precocious puberty in Kabuki makeup syndrome. **J. Pediatr.**, **110**:750-752, 1987.
- LAN, K.; MICHIWAKI, Y.; SUNAGA S.; MICH K-I. - Congenital velopharyngeal incompetence in Kabuki make-up syndrome. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, **24**:298-300, 1995.
- LERONE, M.; PRIOLO, M.; NASELLI, A.; VIGNOLO, M.; ROMEO, G.; SILENGO, M.C. - Ectodermal Abnormalities in Kabuki Syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **73**:263-266, 1997.
- LI, M.; ZACKAI, E.H.; NIIKAWA, N.; KAPLAN, P.; DRISCOLL, D.A. - Kabuki syndrome is not caused by a microdeletion in the DiGeorge/Velocardiofacial chromosomal region within 22q11.2. **Am. J. Med. Genet.**, **65**(2):101-103, 1996.
- LO, I.F.M.; CHEUNG, L.Y.K.; NG, A.Y.Y.; LAM, S.T.S. - Interstitial dup(1p) with findings of Kabuki make-up syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **78**:55-57, 1998.
- LYNCH, S.A.; ASHCROFT, K.A.; ZWOLINSKI, S.; CLARKE, C.; BURN, J. - Kabuki syndrome-like features in monozygotic twin boys with a pseudodicentric chromosome 13. **Med. Genet.**, **32**:227-230, 1995.
- McGINNISS, M.J.; BROWN, D.H.; BURKE, L.W.; MASCARELLO, J.T.; JONES, M.C. - Ring chromosome X in a child with manifestations of Kabuki syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **70**(1):37-42, 1997.

- MAKITA, Y.; YAMADA, K.; MIYAMOTO, A.; OKUNO, A.; NIIKAWA, N. - Kabuki make-up syndrome is not caused by microdeletion close to the van der Woude syndrome critical region at 1q32-q41. **Am. J. Med. Genet.**, **86**(3):285-288, 1999.
- MARQUES-DE-FARIA, A.P. & OLIVEIRA, G.S. - Clinical features of Kabuki syndrome in ten Brazilian children. **Am. J. Hum. Genet.**, **63**(supl.63):A109, 1998.
- MATSUMURA, M.; YAMADA, R.; KITANI, Y.; NISHI, T.; YAMAMOTO, H.; OAHAMA, Y.; KUROKI, Y. - Anorectal anomalies associated with Kabuki make-up syndrome. **J. Pediatr. Surg.**, **27**(12):1600-1602, 1992.
- MEINECKE, P. & RODEWALD, A. - Kabuki make-up syndrome in a caucasian. **Dysmorphol. Clin. Genet.**, **3**:103-107, 1989.
- MENDEZ, H.M.M. & OPITZ, J.M. - Noonan syndrome: a review. **Am. J. Med. Genet.**, **21**:493-506, 1985.
- MHANNI, A.A.; CROSS, H.G.; CHUDLEY, A.E. - Kabuki syndrome: description of dental findings in 8 patients. **Clin. Genet.**, **56**(2):154-7, 1999.
- MITSUMODE, A.; YASUMOTO, S.; FUKAMI, S.; OGAWA, A. - Kabuki make-up syndrome associated with West syndrome. **Acta Paediatr. Jpn.**, **39**:392-394, 1997.
- MOOREHEAD, P.S.; NOWEL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, A. - Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell. Res.**, **20**:613-616, 1960.
- MULVIHILL, J.J. & KAISER-KUPFER, M.I. - Niikawa-Kuroki (Kabuki make-up) syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **33**:425, 1989. [Letter]
- NIIKAWA, N.; MATSUURA, N.; FUKUSHIMA, Y.; OHSAWA, T.; KAJII, T. - Kabuki make-up syndrome: a syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. **J. Pediatr.**, **99**(4):565-569, 1981.

- NIKAWA, N.; KUROKI, Y.; KAJI, T. - The dermatoglyphic pattern of the Kabuki make-up syndrome. **Clin. Genet.**, **21**:315-320, 1982.
- NIKAWA, N.; KUROKI, Y.; KAJI, T.; MATSUURA, N.; ISHIKIRIYAMA, S.; TONOKI, H.; ISHIKAWA, N.; YAMADA, Y.; FUJITA, M.; UMEMOTO, H.; IWAMA, Y.; KONDOH, I.; FUKUSHIMA, Y.; NAKO, Y.; MATSUI, I.; URAKAMI, T.; ARITAKI, S.; HARA, M.; SUZUKI, Y.; CHYIO, H.; SUGIO, Y.; HASEGAWA, T.; YAMANAKA, T.; TSUKINO, R.; YOSHIDA, A.; NOMOTO, N.; KAWAHITO, S.; AIHARA, R.; TOYOTA, S.; IESHMA, A.; FUNAKI, H.; ISHITOBI, K.; OGURA, S.; FURUMAE, T.; YOSHINO, M.; TSUJI, Y.; KONDOH, T.; MATSUMOTO, T.; ABE, K.; HARADA, N.; MIIKE, T.; OHDO, S.; NARITOMI, K.; ABUSHWEREB, A.K.; BRAUN, O.H.; SHCIMID, E. - Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: a study of 62 patients. **Am. J. Med. Genet.**, **31**:565-589, 1988.
- OHDO, S.; MADOKORO, H.; SONODA, T.; NISHIGUCHI, T.; KAWAGUCHI, K.; HAYAKAWA, K. - Kabuki make-up syndrome (Niikawa-Kuroki syndrome) associated with congenital heart disease. **J. Med. Genet.**, **22**(2):126-127, 1985.
- OLNEY, A.H.; SHAEFER, G.B.; LOLODZIEJ, P. - Kabuki syndrome. **Ear Nose Throat J.**, **79**(9):734, 1998.
- ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, OMIM (TM). - McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- ORITA, M.; IWAHARA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. - Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 2766-2770, 1989.
- PAGON, R.A.; DOWNING, A.L.; RUVALCABA, R.H.A. - Kabuki make-up syndrome in a caucasian. **Ophthalmol. Paediatr. Genet.**, **7**:97-100, 1986.

Pe BENITO, R. & FERRETTI, C. - Kabuki makeup syndrome (Niikawa-Kuroki syndrome) in a black child. **Ann. Ophthalmol.**, 2:312-315, 1989.

PETERSON-FALZONE, S.J.; GOLABI, M.; LALWANI, A.K. - Otolaryngologic manifestation of Kabuki syndrome. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.**, 38(3):227-236, 1997.

PHILIP, N.; MEINECKE, P.; DAVID, A.; DEAN, J.; AYME, S.; CLARK, R.; GROSS-KIELSELTEIN, E.; HOSENFELD, D.; MONCIA, A.; MULLER, D.; PORTEOUS, M.; SANTOS, H.; CORDEIRO, I.; SELICORNI, A.; SILENGO, M.; TARIVERDIAN, G. - Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: a study of 16 non-Japanese cases. **Clin. Dysmorphol.**, 1:63-77, 1992.

PILOTTO, R.F; MAGNA, L.A.; BEIGUELMAN, B. - Factos influencing human birth weight in normal pregnancy: a prospective study in a Brazilian university hospital. **Rev. Bras. Genet.**, 16(2):457-469, 1993.

SANCHEZ, O.; ESCOBAR, J.J.; YUNIS, J.J. - A simple G-banding technique. **Lancet**, 2:269, 1973.

SATOH, M.; ARAKAWA, K.; YOKOYA, S.; MOROOKA, K. - A case of Kabuki make-up syndrome associated with growth hormone deficiency. **Clin. Pediatr. Endocrinol.**, 2(11):13-16, 1993.

SAY, B.; MCCUTCHEON, L.; TODD, C.; HOUGH, J.V.D. - Kabuki make-up syndrome and hearing impairment. **Clin. Dysmorphol.**, 2:68-70, 1993.

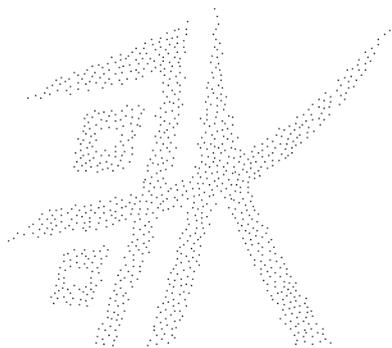
SHARLAND, M.; PATTON, M. A.; TALBOT, S.; CHITOLIE, A.; BEVAN, D.H. - Coagulation-factor deficiencies and abnormal bleeding in Noonan syndrome. **Lancet**, 339(8784):19-21, 1992.

SCHRANDER-STUMPEL, C.; THEUNISSEN, P.M.V.M.; HULSMANS, R.F.H.J.; FRYNS, J.P. - Unknown. The combination of vitiligo vulgaris with somatic and psychomotor retardation, cleft palate and facial dysmorphism: a distinct entity?. **Genet. Couns.**, 2:259-261, 1991.

- SCHRANDER-STUMPEL, C.; THEUNISSEN, P.M.V.M.; HULSMANS, R.F.H.J.;
FRYNS, J.P. - Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome in a girl presenting with vitiligo vulgaris, cleft palate, somatic and psychomotor retardation and facial dysmorphism. **Genet. Couns.**, **1(4)**:71-72, 1993.
- SCHRANDER-STUMPEL, C.; MEINECKE, P.; WILSON, G.; GILLESSEN-
KAESBACH, G.; TINSCHERT, S.; KÖNIG, R.; PHILIP, N.; RIZZO, R.;
SCHRANDER, J.; PFEIFFER, L.; MAAT-KIEVIT, A.; VAN DER BURGT, I.;
VAN ESSEN, T.; LATTA, E.; HILLIG, U.; VERLOES, A.; JOURNEL, H.; FRYNS,
J.P. - The Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome: further delineation of the phenotype in 29 non-Japanese patients. **Eur. J. Pediatr.**, **153**:438-445, 1994.
- SILENGO, M.; LERONE, M.; SERI, L.; ROMEO, G. - Inheritance of Niikawa-Kuroki (Kabuki Makeup) Syndrome. **Am. J. Med. Genet.**, **66**:368, 1996. [Letter]
- SOUZA, J.C.; RIBEIRO, T.C.C.; RIBEIRO, R.C. - A síndrome da máscara do Cabúqui. **J. Pediatr. (Rio de J)** **72(5)**:341-4, 1996.
- SUTHERLAND, G.R. – Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. **Science** **197**:265-266, 1977.
- SUTHERLAND, G.R. – Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. **Am. J. Med. Genet.**, **31**:125-135, 1979.
- TAWA, R.; KAINO, Y.; ITO, T.; GOTO, Y.; KIDA, K.; MATSUDA, H. - A case of Kabuki make-up syndrome with central diabetes insipidus and growth hormone neurosecretory dysfunction. **Acta Paediatr. Jpn.**, **36**:412-415, 1994.
- TOUTAIN, A.; PLÉE, Y.; PLOYET, M.J.; BENOIT, S.; PERROT, A.; SEMBELY, C.;
BARTHEZ, M.A.; MORAINÉ, C.I. - Deafness and Mondini dysplasia in Kabuki (Niikawa-Kuroki) syndrome. Report of a case and review of the literature. **Genet. Couns.**, **8(2)**:99-105, 1997.

- TSUKAHARA, M.; KUROKI, Y.; IMAIZUMI, K.; MYIAZAWA, Y.; MATSUO, K. - Dominant Inheritance of Kabuki Make-up Syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 73(1):19-23, 1997.
- TUTAR, H.E.; ÖCAL, G.; İNCE, E.; CİN, S. - Premature thelarche in Kabuki make-up syndrome. *Acta Paediatr. Jpn.*, 36:104-106, 1994.
- VAN BEVER, Y. & VAN DER ENDE, J.J. - Brief clinical report: the Kabuki make-up syndrome in a brazilian boy. *Rev. Bras. Genet.*, 15(4):973-7, 1992.
- VAN HAGEN, J.M.; KWEE, M.L.; MADAN, K.; NIEUWINT, A.W.M.; PALS, G.; TEN KATE, L.P. - Kabuki syndrome in son and a low grade mosaic 45,X/46,XX in mother. *Genet. Couns.*, 7(3):201-206, 1996.
- VERLOES, A.; LESENFANTS, S.; PHILIPPET, B.; IYAWA, A.; LALOUX, F.; KOULISCHER, L. Microcephaly, macrotia, unusual mimics and mental retardation syndrome: new syndrome or variant of De Lange type 2 syndrome. *Genet. Couns.*, 7(4):277-282, 1996.
- WANG, L.C.; CHIU, I.S.; WANG, P.J.; WU, M.H.; WANG, J.K.; HUNG, Y.B.; LIN, S.J. - Kabuki make-up syndrome associated with congenital heart disease. *Acta Paediatr. Sin.*, 35:63-69, 1993.
- WATANABE, T.; MIYAKAWA, M.; SATOH, M.; ABE, T.; ODA, Y. - Kabuki make-up syndrome associated with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr. Jpn.*, 36:727-729, 1994.
- WELLESLEY, D.G & SLANLEY, S. - Kabuki make-up and Turner syndromes in the same patient. *Clin. Dysmorphol.*, 3:297-300, 1994.
- WILSON, G.N. - Thirteen cases of Niikawa-Kuroki syndrome: report and review with emphasis on medical complications and preventive managements. *Am. J. Med. Genet.*, 79:112-120, 1998.

- WITT, D.R.; HOYME, H.E.; ZONANA, J.; MANCHESTER, D.K.; FRYNS, J.P.;
STEVENSON, J.G.; CURRY, C.J.R.; HALL, J.G. - Lymphedema in Noonan
syndrome: clues to pathogenesis and prenatal diagnosis and review of the literature.
Am. J. Med. Genet., 27:841-856, 1987.
- YANO, S.; MATSUIISHI, T.; YOSHINO, M.; KATO, H.; KOJIMA, K. - Cerebellar and
brainstem "atrophy" in a patient with Kabuki make-up syndrome. **Am. J. Med.
Genet.**, 71:486-487, 1997. [Letter]



10. ANEXOS

10.1. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

**PROJETO: ESTUDO GENÉTICO-CLÍNICO DE INDIVÍDUOS COM CARACTERÍSTICAS DA
SÍNDROME KABUKI**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dra. Gisele Santos de Oliveira - Depto. de Genética Médica/FCM-UNICAMP

Profa.Dra. Antonia Paula Marques de Faria - Depto. de Genética Médica/FCM-UNICAMP

Profa.Dra. Edí Lúcia Sartorato - CBMEG/UNICAMP

ENDEREÇO: DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA, FCM-UNICAMP

CAIXA POSTAL: 6111; CIDADE UNIVERSITÁRIA, CAMPINAS – SP

CEP: 13081970

FONE: (019) 788-8901

FAX: (019) 788-8909

E-MAIL: dgmfcm@obelix.unicamp.br

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

REGISTRO: HC/UNICAMP:

OUTRO:

NOME DO PAI:

NOME DA MÃE:

ENDEREÇO:

BAIRRO:

CIDADE:

UF:

CEP:

TELEFONE:

IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL (em caso de autorização):

NOME:

GRAU DE PARENTESCO:

ENDEREÇO:

BAIRRO:

CIDADE:

UF:

CEP:

TELEFONE:

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu _____, R.G: _____, entendo que o paciente _____ (_____), que se encontra sob minha responsabilidade, foi convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética da FCM-UNICAMP, envolvendo pacientes e famílias de indivíduos com a hipótese diagnóstica inicial da síndrome Kabuki. As fotografias, as amostras de DNA de linhagens celulares e as informações médicas que forem obtidas, tanto do paciente quanto de sua família poderão ser eventualmente compartilhadas por outros pesquisadores que trabalham com essa condição, com finalidade exclusiva de pesquisa. O sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos através da utilização de um número de código para identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Acho que, se concordar que o paciente, sob minha responsabilidade, participe desse estudo, os pesquisadores envolvidos farão perguntas a respeito dos seus antecedentes médicos e familiares. O paciente será submetido a um exame físico para confirmar seu estado e condição clínica. Além disso, ele poderá ser submetido a exames laboratoriais e sessões de fotografia. Uma amostra de sangue será colhida (20 a 30ml, o equivalente a duas colheres de sopa), não sendo necessária a hospitalização. Caso o sangue não possa ser obtido, será colhida uma quantidade de saliva em papel filtro específico para esse tipo de coleta. As pesquisas laboratoriais utilizando amostras de sangue e/ou saliva poderão ser feitas durante um período indeterminado após a coleta. As células que, por ventura, forem isoladas do sangue e/ou saliva do paciente serão preservadas para a utilização durante todo o estudo e serão destruídas depois que ele se completar.

Concluo que, devido à síndrome Kabuki apresentar algumas anomalias associadas, o paciente, pelo qual sou responsável, poderá ser submetido a outras avaliações como inventário ósseo (raio-X completo de esqueleto); avaliação cardiológica, com raio-X de tórax, eletrocardiograma e ecocardiografia; tomografia axial computadorizada de crânio; audiometria (avaliação da acuidade auditiva); dosagens de imunoglobulinas e, para as meninas, dosagens de hormônio luteinizante (LH) e hormônio estimulador folicular (FSH), tendo em vista a detecção de casos de puberdade ou desenvolvimento mamário precoce.

RISCO E DESCONFORTO:

Para todos os exames serão necessários cerca de 20 a 30ml de sangue venoso (o equivalente a duas colheres de sopa), que poderão ser obtidos em uma única ou mais coletas, considerando as condições e faixa etária do paciente. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo, pois, em geral, essa coleta será realizada pela veia do braço, por profissional treinado e devidamente habilitado para realizá-la.

Quanto à coleta de saliva, será realizada com auxílio de escova ou espátula, sem acarretar risco ou desconforto.

No que se refere aos exames imageológicos, as cargas de radiação necessárias para realização do inventário ósseo, da tomografia computadorizada e do ecocardiograma não são capazes de determinar qualquer interferência no desenvolvimento do paciente.

Devido à agitação psicomotora de algumas crianças, pode haver a necessidade de sedação durante a realização dos exames de eletrocardiograma e tomografia axial computadorizada de crânio. Esse procedimento será realizado por profissional capaz e treinado para o mesmo.

VANTAGENS:

Percebo que não obterei nenhuma vantagem direta com a participação do paciente, pelo qual sou responsável, nesse estudo e que o seu diagnóstico e o seu acompanhamento, provavelmente, não serão modificados. Os resultados dos testes moleculares obtidos deverão ser transmitidos durante o acompanhamento do paciente no Ambulatório de Genética Geral do Hospital das Clínicas - UNICAMP. É importante salientar que qualquer membro da família do paciente que desejar obter orientação genética, poderá também ser atendido nesse ambulatório.

SIGILO:

Deduzo que toda informação médica, as fotografias, assim como os resultados dos testes genéticos deste projeto de pesquisa, farão parte do prontuário médico do paciente e serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP, referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Compreendo que posso requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento e que a médica responsável, Dra. Gisele Santos de Oliveira, tel. (019)788-8907, estará disponível para responder às minhas questões e preocupações.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Aceito que a participação nesse projeto de pesquisa, do paciente pelo qual sou responsável, é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue e/ou saliva), sem comprometer os cuidados médicos que o paciente recebe atualmente, ou receberá no futuro, no HC-UNICAMP. Reconheço, também, que a Dra. Gisele Santos de Oliveira pode interromper a participação do paciente nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado.

NOME DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL: _____

ASSINATURA DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL: _____

NOME DA TESTEMUNHA: _____

ASSINATURA DA TESTEMUNHA: _____

LOCAL E DATA: _____

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Expliquei ao responsável por _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

NOME DO PESQUISADOR: _____

ASSINATURA DO PESQUISADOR: _____

LOCAL E DATA: _____

10.2. PROTOCOLO CLÍNICO PARA DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME KABUKI

NOME DO PACIENTE:

REGISTRO: HC/UNICAMP:

DGM:

OUTRO:

EXAME FÍSICO:

Peso:	Estatura:	PC:	
DIP:	DICE:	DICI:	
Fenda Palpebral:	Mão:	Dedo Médio:	
SINAL	% (*)	+	-
Grupo racial			
Baixa estatura pós-natal	62-80		
Atraso DNPM	100		
Hipotonia			
Características faciais			
<i>Facies incomum</i>	100		
Orelhas dismórficas	100		
Sobrancelhas arqueadas	79		
Cílios duplos/longos/espessos			
Pregas epicânticas			
Escleras azuladas	25-36		
Fissura palpebral alongada	100		
Eversão de terço distal pálpebra inferior	83		
Ponte nasal alargada			
Ponta nasal voltada para baixo	80		
Fenda labial/palato fendido-arqueado	40-69		
Anomalias dentárias	65-71		
Alterações neurológicas	83		
Microcefalia	31		
Convulsões	10		
Dificuldade sucção/deglutição	68		
Anomalias esqueléticas	81		
Braquidactilia	90		
Clinodactilia do 5º quirodáctilo	73		
Malformação vertebral	15		
Escoliose	30-50		
Anomalias dermatoglíficas	100		
<i>Fingerpads</i>	100		
Ausência de trirradial em <i>c</i> e/ou <i>d</i>			
Aumento de padrões hipotenares			
Anomalias cardiovasculares	28		
Anomalias urogenitais	34		
Puberdade precoce	25-50		
Susceptibilidade a infecções	60-73		

* dados combinados de Niikawa *et al.* (1988) e Schrandt e Stumpel *et al.* (1994).

OBSERVAÇÕES:

EXAMES LABORATORIAIS:

RADIOLÓGICOS:

INVENTÁRIO ÓSSEO:

TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE CRÂNIO:

ULTRA-SOM ABDOMINAL:

CITOGENÉTICA:

MOLECULARES:

DOSAGENS HORMONAIS:

AUDIOMETRIA:

AVALIAÇÃO CARDIOLÓGICA:

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

10.3. SOLUÇÕES

Solução A

Triton-X 1%
MgCl₂ 5mM
Sacarose 0,32M
Tris-HCl 10mM pH 8,0

Solução B

Na₂EDTA 20mM
NaCl 20mM
Tris-HCl 20mM pH 8,0

Solução C

Solução B 1ml
Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany) 1mg
SDS 10% 0,5ml

TE

Tris-HCl 10mM pH 8,0
EDTA 1mM pH 8,0
TAE – trisacetato de EDTA

Stop solution

Formamida 95%
EDTA 20mM pH 8,0
Azul de bromofenol 0,005%

Corante de Wright

Corante 0,5g
Metanol 200ml

Solução colocada em agitador magnético durante 1 hora e deixada envelhecer por no mínimo 30 dias para ser utilizada.