

**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Pollyanna Almeida Costa dos Santos

**Busca de microrrearranjos cromossômicos em pacientes com
Síndromes do espectro óculo-aurículo-vertebral**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília

2014

Pollyanna Almeida Costa dos Santos

**Busca de microrrearranjos cromossômicos em pacientes com
Síndromes do espectro óculo-aurículo-vertebral**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Brasília.

Aprovado em 18 de fevereiro de 2014.

Banca examinadora

Juliana Forte Mazzeu de Araújo – Presidente

Universidade de Brasília

Aline Pic-Taylor

Universidade de Brasília

Robert E. Pogue

Universidade Católica de Brasília

Regina Célia Mingroni Netto

Universidade de São Paulo

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo: não consigo achar palavras em meu vocabulário que expressem tamanha dedicação, bondade e compreensão. Torço, todos os dias, pela sua felicidade plena.

À Dra. Silviene Fabiana de Oliveira por ter me recebido nesta Universidade de abraços abertos.

À minha família: painho, mainha, Lili, meus avós, tios e primos que tanto fazem por mim, e sempre farão porque amor de família é para sempre.

Ao meu marido Ricardo Abu Hana pelo apoio irrestrito, sempre, sempre!

Aos meus companheiros de laboratório que aguentam há 4 anos meu falatório constante e incansável. Porque sem vocês os dias na UnB seriam tristes demais.

À Dra. Íris Ferrari pela sua vitalidade, pelo seu exemplo de vida e sua determinação em tornar a Genética Médica um serviço de excelência.

As médicas Dra. Mara dos Santos Córdoba, Dra. Heloísa Safatle e Dra. Maria Teresa Rosa pelo atendimento aos pacientes, e por estarem sempre prontas a nos ajudar. Obrigada pela atenção prestada a essas famílias.

Ao Dr. Robert Pogue, Dra. Regina Célia Mingroni Netto, Dra. Erlane Ribeiro e toda a equipe do NUGEN por encaminhar os pacientes.

Ao Professor Dr. Riccardo Pratesi por ceder gentilmente seu laboratório na fase inicial de nosso estudo.

À Dra. Carla Rosenberg, Dra. Erika Freitas, Claudiner e Raphael Bonadio pela realização dos experimentos de *array* em nossos pacientes.

Às odontólogas Dra. Heliana Mestrinho e Alessandra Reis pela tão produtiva parceria, sempre com o intuito de oferecermos o que há de melhor aos pacientes.

Aos pacientes e seus responsáveis por aceitarem participar desta pesquisa. Vocês são o combustível de nossa motivação.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular por compartilhar seus equipamentos, pelos divertidíssimos almoços, pelas aulas de russo, pelo companheirismo.

Aos meus amigos da UFRGS por continuarem em minha vida. Vocês são especiais!

Às agências de fomento por financiarem nossas pesquisas.

Obrigada!

“Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é”.

(Albert Einstein)

Resumo

O espectro óculo-aurículo-vertebral (OAVS) caracteriza-se por malformações congênitas envolvendo o primeiro e segundo arcos branquiais, de origem genética, ambiental ou uma associação de ambas, que ocorrem durante a sétima semana de gestação. Os pacientes podem apresentar dermóides epibulbares ou lipodermóides, apêndices pré-auriculares, anotia ou microtia, assimetria mandibular e anormalidades nas vértebras cervicais. O objetivo deste estudo foi identificar genes ou regiões cromossômicas relacionadas a OAVS utilizando as técnicas de MLPA e análise cromossômica por microarray. Foram estudados 27 casos, sendo 20 isolados e sete familiares. Foram testados dez pacientes por MLPA, utilizando sondas para os genes *GSC*, *PPM1A*, *WNT5B*, *NKD2*, *OTX2*, *DAAM*, *SIX1*, *SIX6*, *GSC2*, *MAPK1* e *BAPX1*, sendo que todos apresentaram resultados normais. Pela análise cromossômica por microarray, foram testados 26 pacientes. Dentre eles, 14 (53,8%) não apresentaram anormalidades além daquelas já descritas como CNVs polimórficas. Os outros 12 pacientes apresentaram rearranjos cromossômicos diversos: del22q11.2, del12q24.21, LOH 3p26.3-14.3, del2p25.3 e dup2p25.3, dup4q21.1, dup20p12.3-12.2, dup1q31.1 e dup10q23.31, dup11p15.5, LOH 12q15-q22, dup12p12.1, dup6q21. Dentre os microrrearranjos encontrados, três foram *de novo*, um de herança materna e um de herança paterna. Nos outros sete pacientes a origem do rearranjo ainda não foi determinada. As alterações cromossômicas identificadas são não recorrentes reforçando a heterogeneidade da síndrome.

Palavras-chave: OAVS, *microarray*, MLPA, rearranjos cromossômicos

ABSTRACT

The oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS), is characterized by malformations involving the first and second branchial arches, and can be genetic and/or caused by environmental effects that occur during the seventh week of pregnancy. Patients may present epibulbar or lipodermoids, preauricular tags, anotia or microtia, mandibular asymmetry and abnormalities of cervical vertebrae. The aim of this study was to identify genes or chromosomal regions related to OAVS using MLPA and chromosome microarray analysis. Twenty-seven cases were studied, being 20 sporadic and seven familial. Ten patients were tested by MLPA, using probes for *GSC*, *PPM1A*, *WNT5B*, *NKD2*, *OTX2*, *DAAM*, *SIX1*, *SIX6*, *GSC2*, *MAPK1* and *BAPX1* genes, and all presented normal results. Twenty-six patients were tested by chromosome microarray analysis. Among these, 14 (53.8 %) had no chromosomal abnormalities other than already described polymorphic CNVs. The other 12 patients showed various chromosome rearrangements: del22q11.2, del12q24.21, LOH 3p26.3-14.3, del2p25.3 and dup2p25.3, dup4q21.1, dup20p12.3-12.2, dup1q31.1 and dup10q23.31, dup11p15.5, LOH 12q15-q22, dup12p12.1, dup6q21. Between these rearrangements, , three were *de novo*, one maternally inherited and one paternally inherited. In the other seven patients the origin of the rearrangements have not been determined yet. The chromosome abnormalities identified are non-recurrent, reinforcing the heterogeneity of the syndrome.

Key-Words: OAVS, *microarray*, MLPA, chromosome rearrangements

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vista frontal de peça em cerâmica com representação de um indivíduo com características de OAVS, como microssomia hemifacial, microtia e microftalmia. Retirado de Pachajoa <i>et al.</i> (2010).....	18
Figura 2. Genes mapeados na região 22q11, onde foram descritas deleções em afetados pelo Espectro óculo-aurículo-vertebral (21, 22, 23). Os genes considerados candidatos estão sublinhados. Fonte da figura: http://www.genome.ucsc.edu	21
Figura 3. Genes mapeados no segmento 14q22-q23, que é o segmento correspondente a região da duplicação descrita por Ou <i>et al.</i> , (2008). Os genes considerados candidatos estão grifados. Fonte da figura: http://www.genome.ucsc.edu	22
Figura 4. Genes mapeados no segmento 12p13.33, de 2,3 Mb, que corresponde à região da menor deleção descrita nesse cromossomo em um afetado pelo Espectro óculo-aurículo vertebral. O gene considerado candidato está grifado (29). Fonte da Figura: http://www.genome.ucsc.edu	23
Figura 5. Genes mapeados no segmento 5p15.33-pter, de 2 Mb, que corresponde à região da deleção descrita nesse cromossomo em um afetado pela síndrome de Goldenhar O gene considerado candidato está grifado. (32). Fonte da Figura: http://www.genome.ucsc.edu	23
Figura 6. Eletroferograma evidenciando os picos referentes à amplificação das sondas de MLPA. Os dois últimos picos representam sondas controle mapeadas em segmentos cromossômicos com baixa frequência de rearranjos.	35
Figura 7. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho (Linha 1) representa o segmento deletado em Xp21.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representado o gene <i>DMD</i> . As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição. Podemos observar que a região deletada inclui apenas parte do gene <i>DMD</i>	47
Figura 8. Resultado do CGH-array com 44.000 sondas Agilent na paciente 1, mostrando a deleção em 22q11.21.	48
Figura 9. Desenho esquemático do segmento 22q11.2 deletado em pacientes com OAVS.	50
Figura 10. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho (Linha 1) representa o segmento deletado em 12q24.21. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representando o gene <i>TBX3</i> . As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição. Podemos observar que a região deletada inclui apenas o gene <i>TBX3</i>	52
Figura 11. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado e o retângulo azul representa o segmento duplicado em 2p25.3 (Linha 1). A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs).	54
Figura 12. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento deletado em 4q21.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes <i>PPEF2</i> , <i>NAAA</i> , <i>SDAD1</i> e <i>ART3</i>	56
Figura 13. Resultado do array Agilent 60k no paciente 11, mostrando uma duplicação em 20p12.3-p12.2.	57

Figura 14. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento duplicado em 1q31.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes <i>KIF14</i> , <i>DDX59</i> e <i>CAMSAP2</i> . As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.....	58
Figura 15. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento duplicado em 10q23.31. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes <i>IFIT1</i> , <i>SLC16A12</i> , <i>PANK1</i> , <i>KIF20B</i> . As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.....	59
Figura 16. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento duplicado em 11p15.5. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representado o gene <i>IGF2</i> . As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.....	60
Figura 17. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento deletado em 12p12.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes <i>ABCC9</i> , <i>ST8SIA1</i> , <i>KIAA</i> , <i>ETNK1</i> . As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.....	62
Figura 18. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento deletado em 6q21. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representado o gene <i>ATG5</i> . As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.....	63
Figura 19. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). A linha 1 mostra os CNVs, a linha 2 mostra as sondas não polimórficas. O retângulo roxo (Linha 3) representa o segmento com perda de heterozigose em 3p26.3-p14.3. A linha 4 representa as sondas polimórficas (SNPs).....	64
Figura 20. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). A linha 1 mostra os CNVs, a linha 2 mostra as sondas não polimórficas. O retângulo roxo (Linha 3) representa o segmento com perda de heterozigose em 12q15-q22. A linha 4 representa as sondas polimórficas (SNPs).....	65
Figura 21. Resultado do array affymetrix 750k no paciente 24, mostrando que o paciente tem Síndrome de Down.	66
Figura 22. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). As quatro primeiras linhas (retângulos azuis) representam o segmento duplicado na região 1p36.32-p36.32, descrita como CNV.....	67
Figura 23. Idiograma representando os rearranjos descritos na literatura (à esquerda) e os encontrados neste trabalho (à direita).....	68
Figura 24. Paciente 1 com OAVS e del22q11. Possui microssomia hemifacial e displasia da orelha direita.....	78
Figura 25. Heredograma da família da paciente 1. O círculo preenchido em preto representa a propósita.....	78
Figura 26. Paciente 2 apresenta microtia bilateral.....	79
Figura 27. Heredograma da família da paciente 2. O círculo preenchido em preto representa a propósita.....	79

Figura 28. Paciente 3 com microssomia hemifacial e microtia a esquerda.	80
Figura 29. Heredograma da família da paciente 3. A seta indica a propósita.	80
Figura 30. Paciente 4 apresenta microtia a esquerda.	81
Figura 31. Heredograma da família do paciente 4. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.	81
Figura 32. Paciente 5 com apêndices pré-auriculares em ambas orelhas, estrabismo, assimetria facial e dermóide epibulbar.	82
Figura 33. Heredograma da família da paciente 5. O círculo preenchido em preto representa a propósita. O círculo parcialmente preenchido representa um familiar do sexo feminino com retardo mental e estrabismo.	82
Figura 34. Paciente 6 apresenta microtia bilateral e microssomia hemifacial a esquerda.	83
Figura 35. Heredograma da família do paciente 6. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.	83
Figura 36. Paciente 7 apresenta microtia e microssomia hemifacial a direita.	84
Figura 37. Heredograma da família da paciente 7. O círculo preenchido em preto representa a propósita.	84
Figura 38. Paciente 8 com microtia e atresia do canal auditivo esquerdo, assimetria facial.	85
Figura 39. Heredograma da família do paciente 8. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.	85
Figura 40. Paciente 9 apresenta microtia a direita e assimetria facial.	86
Figura 41. Heredograma da família da paciente 9. O círculo preenchido em preto representa a propósita.	86
Figura 42. Paciente 10 com microtia a esquerda e orelha direita com apêndices pré-auriculares.	87
Figura 43. Heredograma da família do paciente 10. Os círculos e quadrados preenchidos em preto representam as mulheres e homens afetados, respectivamente; os círculos e quadrados parcialmente preenchidos em preto representam mulheres e homens portadores obrigatórios, respectivamente.	87
Figura 44. Paciente 11 apresenta microtia a esquerda, e assimetria facial.	88
Figura 45. Heredograma da família do paciente 11. Os quadrados preenchidos em preto representam os homens afetados. A seta indica o propósito.	88
Figura 46. Paciente 12 apresenta apêndices pré-auriculares à esquerda e hipoplasia mandibular.	89
Figura 47. Heredograma da família do paciente 12. Os círculos preenchidos em preto representam a propósita e sua mãe, ambas portadoras de duplicações em 1q31.1 e 10q23.31. A mãe não apresenta fenótipo de OAVS.	89
Figura 48. Paciente 13 apresenta microtia a esquerda, hipoplasia mandibular e assimetria facial.	90
Figura 49. Heredograma da família do paciente 13. O quadrado preenchido em preto representa o propósito; os círculos e quadrados cortados por um "x" representam abortos.	90
Figura 50. Paciente 14 apresentando malformação da orelha direita e assimetria facial.	91
Figura 51. Heredograma da família da paciente 14. O círculo e o quadrado preenchidos em preto representam a propósita e um familiar do sexo masculino afetado, respectivamente.	91
Figura 52. Paciente 15 apresenta malformação auricular à direita.	92
Figura 53. Heredograma da família da paciente 15. Os quadrados preenchidos em preto representam os homens afetados. A seta indica o propósito.	92

Figura 54. Paciente 16 apresenta hipoplasia do globo ocular direito e apêndice pré-auricular à direita.	93
Figura 55. Heredograma da família do paciente 16. Os quadrados preenchidos em preto representam os homens afetados. A seta indica o propósito.	93
Figura 56. Paciente 17 com dermóide epibulbar e apêndice pré-auricular a direita.	94
Figura 57. Heredograma da família do paciente 17. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.	94
Figura 58. Paciente 18 com malformação bilateral das orelhas, pit e apêndices pré-auriculares à esquerda.	95
Figura 59. Heredograma da família da paciente 18. O círculo preenchido em preto representa a propósita; as figuras marcadas com um "x" indicam aborto; o círculo parcialmente preenchido em preto indica uma familiar com lábio-leporino.	95
Figura 60. Paciente 19 apresentando assimetria facial, microsomia hemifacial à esquerda e microtia à esquerda.	96
Figura 61. Heredograma da família da paciente 19. O círculo preenchido em preto representa a propósita.	96
Figura 62. Paciente 20 apresentando microtia e apêndice pré-auricular à esquerda.	97
Figura 63. Heredograma da família da paciente 20. O círculo e os quadrados preenchidos em preto representam a propósita e seus irmãos, respectivamente.	97
Figura 64. Paciente 21 com apêndice pré-auricular (retirado cirurgicamente).	98
Figura 65. Heredograma da família do paciente 21. O quadrado e o círculo preenchidos em preto representam o propósito e sua irmã, respectivamente.	98
Figura 66. Paciente 22 apresentando microtia/anotia a esquerda e nariz tubular.	99
Figura 67. Paciente 23 com microtia bilateral, apêndices pré-auriculares e assimetria facial.	100
Figura 68. Paciente com dermóide epibulbar, apêndices pré-auriculares bilateral, pé torto e síndrome de Down.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compilação dos genes candidatos para OAVS com a respectiva localização e função (fonte: www.genome.ucsc.edu e www.ncbi.nlm.nih.otg/omim).....	24
Tabela 2. Resumo dos pacientes e os principais sinais clínicos de OAVS	39
Tabela 3. Pacientes que realizaram análise por array e seus respectivos resultados, incluindo a posição e região genômica, os genes envolvidos, tamanho do rearranjo, forma de herança e a plataforma utilizada para o experimento.	43
Tabela 4. Lista de genes localizados na região duplicada 4q21.1 com suas respectivas funções biológicas.....	54
Tabela 5. Lista dos genes presentes na região duplicada em 12q12.1 e suas funções biológicas.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC9 – *ATP-binding cassette*, subfamília C, membro 9

ACS – Síndrome aurículo-condilar

ARHGEF16 - Rho guanina nucleotídeo fator de troca 16

ART3 – ADP-Ribosiltransferase 3

Array-CGH – *Array comparative genomic hybridization*

ATG5 – Autofagia 5, homólogo de *Saccharomyces Cerevisiae*

BWS – Síndrome de Beckwith-Wiedemann

C2CD5 – C2 domínio cálcio-dependente 5

CAMSAP2 – Calmodulina – Spectrina regulada – proteína associada 1

CMAS – Citadina 5 – ácido n-acetilneuramínico monofosfato sintetase

CXCL9 – *Chemokine*, motivo CXC, ligante 9

CXCL10 – *Chemokine*, motivo CXC, ligante 10

CN – Crista neural

CNV – Variação de número de cópias (*Copy Number Variation*)

DAAM1 – Ativador de morfogênese 1 associado a *Dishevelled*

DDX59 – *Dead box* polipeptídeo 59

DECIPHER – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans*

DGS – Síndrome de DiGeorge

DGV – *Database of Genomic Variant*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DUSP6 – Fosfatase dual-especificidade 6

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ETNK1 – Etanolamina quinase 1

FISH – *Fluorescent in Situ Hybridization*

GS – Síndrome de Goldenhar

GNAI3 – *Guanine nucleotide-binding protein, alpha-inhibiting activity polypeptide 3*

GSC – *Goosecoid*

GSC2 – *Goosecoid 2*

H19 – Transcrito não codificante 0 maternalmente expresso

HUB – Hospital Universitário de Brasília

IFIT1 – Interferon proteína-induzido com repetições tetratricopeptídeos 1

IGF2 – Fator de crescimento 2 – insulina-like

KIF14 – Família quinase membro 14

KIF20 - Família quinase membro 20

MAPK1 - Mitogen-activated protein kinase 1

MEGF6 – Múltiplo fator de crescimento epidermal-*Like* 6

MH – Microsomia Hemifacial

MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NAAA – N-aciletanolamina ácido amidase

NKD2 – *Naked cuticle*, homólogo de *Drosophila* 2

OAVS – Síndrome óculo-auriculo-vertebral

OTOGL – Proteína *Otogelin-like*

OTX2 – *Orthodenticle*, homólogo de *Drosophila* 2

PANK1 – Pantotenate quinase 1

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PLCB4 – Fosfolipase C Beta 4

PPEF2 – Proteína fosfatase domínio de ligação 2

PPM1A – Fosfatase proteína magnésio dependente 1A

PRDM16 – PR domínio-Proteína 16

SIX1 – *Sine oculis homeobox*, homólogo de *Drosophila* 1

SIX6 – *Sine oculis homeobox*, homólogo de *Drosophila* 6

SLC16A12 – Carregador de soluto família 16 (transportador ácido monocarboxílico)

SNP – Polimorfismo de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polimorphism*)

SOX5 – *SRY-Box* 5

SOX 6 - *SRY-Box* 6

SOX11 – *SRY-Box* 11

ST8SIA1 - ST8 alfa-n-acetil-neuraminida alfa-2,8-sialiltransferase 1

TBX1 - *T-box* 1

TBX3 – *T-box* 3

TP73 – *Tumor Protein* 73

UPD – Dissomia uniparental

VCFS – Síndrome Velocardiofacial

WNT5A - Família *wingless-type MMTV*, membro 5A

WNT5B – Família *wingless-type MMTV*, membro 5B

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. METODOLOGIA	30
3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	30
3.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	31
3.3. MÉTODOS LABORATORIAIS	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO	70
APÊNDICE A.....	78
ANEXO I.....	104
ANEXO II	105
ANEXO III	106

1. INTRODUÇÃO

O espectro óculo-aurículo-vertebral (OAVS) (OMIM 141400 e OMIM 164210) caracteriza-se por malformações congênitas envolvendo o primeiro e segundo arcos branquiais que ocorrem durante a sétima semana de gestação, podendo ocorrer também devido a displasia facial lateral, microssomia unilateral craniofacial, disostose otomandibular, necrose facial unilateral intrauterina (1, 2). Foi inicialmente descrito por Goldenhar, em 1952 (3), três pacientes com dermóides epibulbares ou lipodermóides, apêndices pré-auriculares, assimetria mandibular e anormalidades nas vértebras cervicais. Em 1960, Gorlin e Pindborg (4) definiram microssomia hemifacial (MH) como uma condição que afetava o desenvolvimento auricular, oral e mandibular. Eles notaram que este transtorno variava em um espectro de formas leves à graves, e tornaram sinônimas as síndromes: MH, OAVS e Goldenhar. Anos mais tarde, Gorlin (5), considera que a síndrome de Goldenhar trata-se da forma mais grave, enquanto a microssomia hemifacial da forma mais leve de OAVS.

Desde 300 a.C. indivíduos com OAVS são retratados em cerâmica, como o achado na população de Tumaco-tolita, que habitou a região geohistórica na costa pacífica colomboequatoriana de 300 a.C. a 600 d.C. Esta cultura se caracterizou por capturar, com impressionante realismo, patologias presentes em sua população, incluindo malformações congênitas e doenças genéticas. A Figura 1 representa um indivíduo com OAVS, e é umas das representações mais antigas do passado pré-hispânico latino americano e mundial (6).



Figura 1. Vista frontal de peça em cerâmica com representação de um indivíduo com características de OAVS, como microsomia hemifacial, microtia e microftalmia. Retirado de Pachajoa *et al.* (2010).

Essa síndrome tem expressividade variável, sendo que, em 70% dos pacientes há acometimento unilateral e, quando existe acometimento bilateral um dos lados é mais afetado (5). As principais características são assimetria facial, que é resultado de uma hipoplasia maxilar e/ou mandibular; malformações da orelha, que podem incluir microtia (hipoplasia da orelha externa), anotia (ausência de orelha externa) ou atresia aural (ausência do canal da orelha externa), e perda de audição. Outras malformações incluem fendas lábio-palatinas, anomalias vertebrais, cardíacas e de membros (7).

Não existe uma boa estimativa de incidência de OAVS devido ao amplo espectro de variabilidade clínica da doença, da qual os casos mais leves podem ser subdiagnosticados. Outra dificuldade é que OAVS compartilha características clínicas com outras síndromes, como Treacher-Collins e aurículo condilar. Portanto, dizemos que são doenças de um espectro que engloba anomalias craniofaciais, cardíacas, vertebrais e do sistema nervoso central, dificultando o diagnóstico e, conseqüentemente, estudos epidemiológicos (8). Mesmo com esta imprecisão de dados, estima-se que a taxa de incidência varie de 1/5.600 a 1/20.000 (9). A taxa de ocorrência é de três meninos para cada duas meninas, sendo que o lado direito é o mais frequentemente acometido, em ambos os sexos (10).

A partir destes dados, estima-se que OAVS seja a quarta anomalia craniofacial mais comum em humanos, atrás apenas de fenda labial com ou sem fenda palatina, fenda palatina e craniossinostose (2).

A formação embriológica craniofacial inicia-se na crista neural (CN), que é uma estrutura importante e transitória, que se forma a partir das bordas laterais da placa neural que se juntam na linha média durante o fechamento do tubo neural. As células da CN passam por uma transição epitelial-mesenquimal, migram para longe, e se dispersam dentro do embrião em desenvolvimento para se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares (11).

A CN gera o sistema nervoso periférico, que estabelece uma grande rede de conexões neurais entre o sistema nervoso central e o periférico. Ela produz todos os melanócitos do corpo (exceto os pigmentos da retina), células endócrinas (medula adrenal, células produtoras de calcitonina e da carótida) e células mesenquimais capazes de se diferenciarem em tecidos conjuntivos e adiposos, osso, cartilagem e em células que formam a parede de vasos sanguíneos (incluindo pericitos, exceto células endoteliais derivadas da mesoderme). Esta capacidade de cumprir os destinos geralmente assumidas pela mesoderme levou alguns autores a considerar a CN como uma quarta camada germinativa. A migração de células da CN, derivadas do processo de neurulação no local onde a futura região da cabeça e do pescoço irão se desenvolver, originam os arcos faríngeos ou branquiais (11).

Os arcos faríngeos são compostos de células mesenquimais do mesoderma e células de origem da CN cranial. Durante o desenvolvimento, muitas dessas células coletivamente se transformam em mesênquima e assumem novas características morfológicas distintas das células epiteliais vizinhas, segregam a partir do tubo neural e migram a partir de rotas específicas, contribuindo para uma grande variedade de tecidos e estruturas em todo o corpo dos vertebrados. Os arcos faríngeos são formados em pares, um de cada lado do embrião, totalizando seis arcos, sendo o quinto e o sexto rudimentares (12).

Na região cranial, a sinalização recíproca entre as células da CN e outros tipos celulares embriogênicos, como endotélio e ectoderme craniofacial, desempenham um papel importante na condução do crescimento facial e morfogênese, incluindo a formação da orelha externa (13). Quanto ao seu potencial osteogênico, o primeiro arco forma a saliência mandibular e maxilar, que originarão a maxila, o osso zigomático e a mandíbula. O segundo arco contribui, juntamente com o terceiro e o quarto, para a formação do osso hioide. Para a formação da

estrutura cartilaginosa, o primeiro e segundo arcos formam as orelhas e os ossículos da orelha média; o quarto e sexto arcos formam as cartilagens laríngeas.

A etiologia da síndrome é bastante heterogênea, estando envolvidos tanto fatores ambientais quanto genéticos. Dentre os fatores ambientais que podem afetar o desenvolvimento embrio-fetal estão: o uso de medicamentos vasoativos nas primeiras 10 semanas de gestação, principalmente quando associado ao fumo, de ácido retinóico e de teratógenos, como a talidomida, e a diabetes gestacional, além do uso de fluoxetina (2, 14).

Tanto padrões de herança autossômica dominante quanto recessiva foram descritos, sendo que casos compatíveis com padrão de herança autossômico dominante são apresentados em cerca de 2-10% dos casos (15, 16). No entanto, a maioria dos casos são ditos esporádicos. Rollnick e Kaye (17) mostraram que fazendo uma investigação clínica detalhada nas famílias dos portadores da síndrome, cerca de 45% dos familiares apresentam alguma manifestação, principalmente pequenas malformações auriculares, indicando que há um papel genético e um número maior de casos podem ter herança autossômica dominante.

As causas genéticas da OAVS ainda não estão definidas, sendo que uma das principais dificuldades para desvendar a etiologia é a grande heterogeneidade genética da doença. Foi identificada uma região candidata de aproximadamente 10,7 cM por estudo de ligação em 14q32. Dentre os genes mapeados nesse segmento cromossômico, o gene *GSC* (*Goosecoid*) foi considerado um candidato posicional uma vez que é expresso nos arcos branquiais durante a embriogênese. Camundongos nocauteados para o gene *GSC* apresentaram malformações craniofaciais semelhantes ao OAVS (7).

Dentre as anomalias cromossômicas mais frequentes descritas em OAVS estão aquelas que envolvem o segmento 22q11.2. Em um paciente do sexo masculino sem história familiar de OAVS foi identificada uma microdeleção de aproximadamente 1Mb na região 22q11.21-q11.23 (chr22:20.128.705-21.246.612) (18). Nesta região são encontrados genes potencialmente candidatos para a síndrome, como: *TBX1*, gene expresso em múltiplos tecidos durante a embriogênese e especialmente requerido para desenvolvimento auricular; *MAPK1* que codifica uma proteína da família das MAP quinases, sendo assim importante

para o desenvolvimento embrionário; e o *GSC2* (*Goosecoid 2*), que além de estar relacionado com a síndrome velocardiocfacial, também remete ao gene *GSC* já citado como candidato para OAVS (19, 20).

Ainda na mesma região do cromossomo 22, outros dois pacientes foram descritos com OAVS e comorbidades, como síndrome Velocardio-facial e um atípico tumor teratóide rabdoide ambos identificados por *array*, onde foram encontradas microdeleções *de novo* de aproximadamente 3.2Mb (chr22:19.782.237-22.969.069) e outra de 2.7Mb (chr22:20,129,573-22,880,573), respectivamente (21, 22). A Figura 2 apresenta os genes mapeados nessa região.

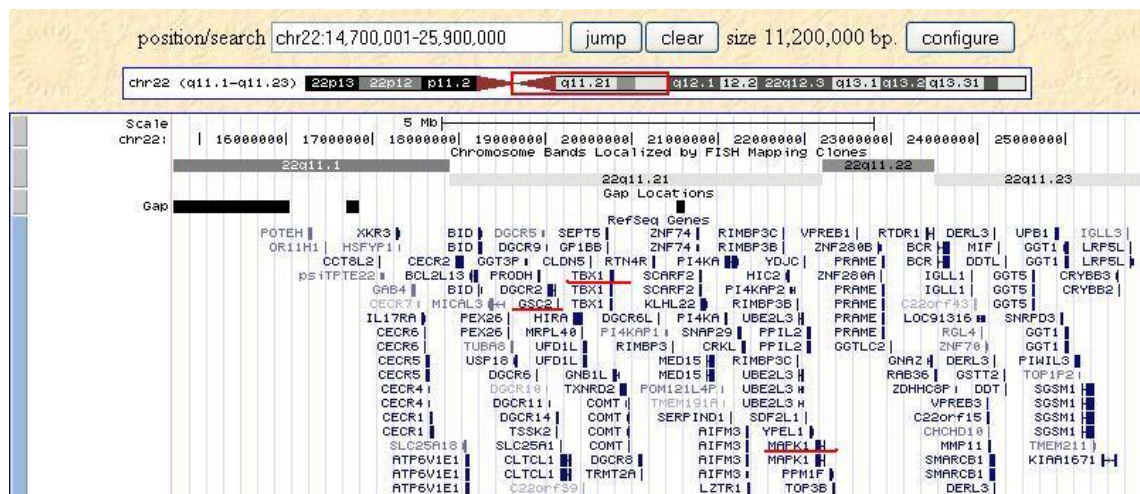


Figura 2. Genes mapeados na região 22q11, onde foram descritas deleções em afetados pelo Espectro óculo-aurículo-vertebral (21, 22, 23). Os genes considerados candidatos estão sublinhados. Fonte da figura: <http://www.genome.ucsc.edu>

Aberrações estruturais envolvendo uma duplicação de 11.79 Mb na região cromossômica 14q22.3-q23.3 e uma perda de 4.38 Mb na região cromossômica 13q21.31-q21.32 foram observadas, utilizando *CGH-array* (244K Agilent Technologies) em uma criança com múltiplas anomalias sugestivas de síndrome de Goldenhar. O pai, portador de deficiência intelectual, baixa estatura e pequenas anomalias craniofaciais, apresentou as mesmas aberrações. Na região da duplicação estão inclusos genes considerados candidatos: *SIX1*, mutado na síndrome branquio-oto-renal, que compartilha diversos sinais clínicos com o OAVS; *SIX6*, envolvido em malformações do nervo óptico e *OTX2* que codifica uma proteína que regula transcrição no desenvolvimento neural e ocular (23). Ballesta-

Martínez e colaboradores (24) encontraram uma duplicação em 14q23.1 segregando em membros de uma família com OAVS; esta região também o inclui o *OTX2*.

No cromossomo 14, além dos genes apontados por Ou *et al.* (23) como candidatos, chama atenção a presença dos genes *DAAM1* e *PPM1A*. *DAAM1* pertence a uma família de genes envolvida na regulação da polaridade celular e organização do citoesqueleto (Figura 3). A proteína DAAM1 medeia a ligação de Dishevelled (DVL)-RHO ativando a via de WNTs, importante para o desenvolvimento embrionário (25). O gene *PPM1A* codifica uma proteína da família das fosfatases de Ser/Thr e regula a atividade de MAP quinases, que atuam em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, transcrição e regulação (26).

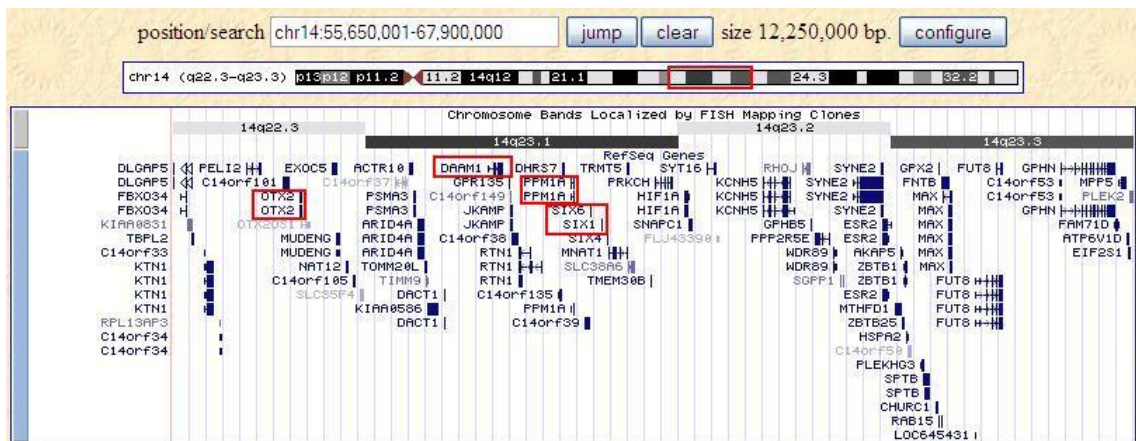


Figura 3. Genes mapeados no segmento 14q22-q23, que é o segmento correspondente a região da duplicação descrita por Ou *et al.*, (2008). Os genes considerados candidatos estão grifados. Fonte da figura: <http://www.genome.ucsc.edu>

Uma translocação envolvendo os cromossomos 4 e 8 (t(4;8)(p15.3;q24.1)) foi descrita em uma paciente com sinais clínicos da síndrome (27). O mapeamento dos pontos de quebra da translocação revelou que a quebra no cromossomo 4 ocorreu próxima ao gene *BAPX1*, que pertence à família NK-2 de fatores de transcrição e tem um importante papel no desenvolvimento craniofacial. Uma forte expressão alélica não balanceada foi identificada neste gene a partir de análise de fibroblastos em 40% dos pacientes com OAVS. Estes resultados sugerem que a desregulação epigenética em *BAPX1* possa ter um papel na síndrome (28).

Uma deleção terminal em 12p13.33 (figura 4) foi descrita em uma paciente com diagnóstico de OAVS (29). Nesta região podemos destacar o gene *WNT5B* que

codifica uma glicoproteína da via WNT (*Wingless*) que está envolvida em vários processos do desenvolvimento, incluindo diferenciação celular, determinação da polaridade celular e morfogênese de tecidos durante a embriogênese. Esse gene também é altamente conservado em invertebrados (*Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*) e vertebrados (30). A sinalização por WNT é essencial para a especificação regional da face e crescimento diferencial craniofacial, por isso acredita-se que o gene *WNT5B* seja um candidato para a patogênese do OAVS (31).

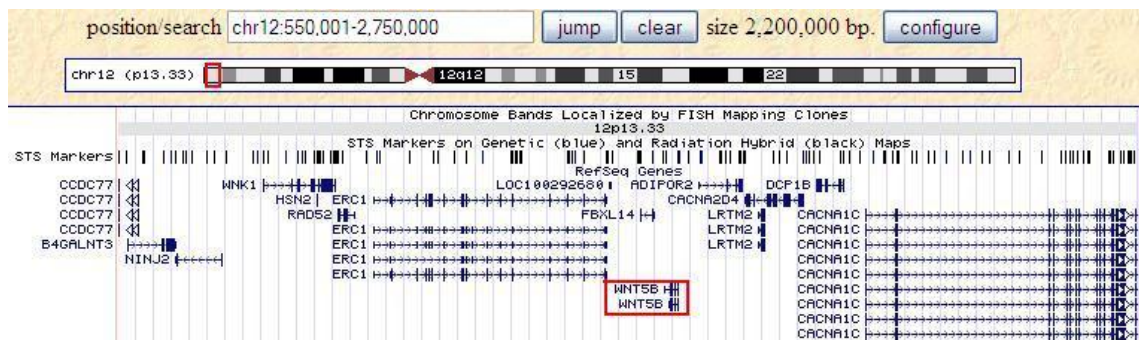


Figura 4. Genes mapeados no segmento 12p13.33, de 2,3 Mb, que corresponde à região da menor deleção descrita nesse cromossomo em um afetado pelo Espectro óculo-aurículo vertebral. O gene considerado candidato está grifado (29). Fonte da Figura: <http://www.genome.ucsc.edu>

No cromossomo 5 foi identificada uma deleção na região 5p15.3-pter em uma menina com a síndrome (32). A partir do mapeamento dessa região do cromossomo 5 (figura 5), destaca-se o gene *NKD2* como um bom candidato para a síndrome, uma vez que camundongos nocaute para este gene apresentam malformações craniofaciais e esqueléticas. A proteína NKD2 se liga a DVL, funcionando como reguladora da via de WNT (33).

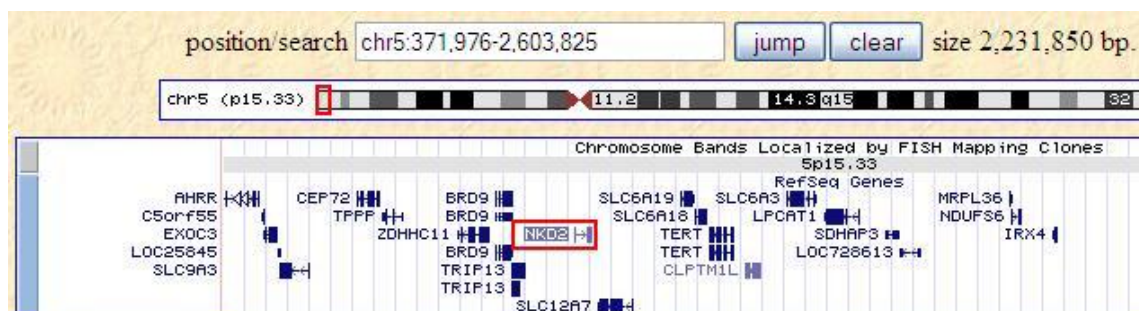


Figura 5. Genes mapeados no segmento 5p15.33-pter, de 2 Mb, que corresponde à região da deleção descrita nesse cromossomo em um afetado pela síndrome de Goldenhar. O gene considerado candidato está grifado. (32). Fonte da Figura: <http://www.genome.ucsc.edu>

A seguir encontra-se uma compilação dos genes considerados candidatos para OAVS, sua localização e função (Tabela 1).

Tabela 1. Compilação dos genes candidatos para OAVS com a respectiva localização e função (fonte: www.genome.ucsc.edu e www.ncbi.nlm.nih.otg/omim)

Gene	Localização	Função
<i>GSC</i>	14q32	A proteína codificada por este gene atua como um fator de transcrição. Em camundongos tem importante papel na embriogênese craniofacial e da caixa torácica (OMIM 138890).
<i>SIX1</i>	14q23	Está envolvido no desenvolvimento dos arcos branquiais e de membros. Defeitos nele causam surdez autossômica dominante (DFNA 23) e síndrome braquio-oto-renal (BOR) (OMIM 605192; OMIM 601205 e OMIM 113650).
<i>SIX6</i>	14q23	Envolvido no desenvolvimento ocular. Defeitos neste gene causam microftalmia ou anoftalmia com catarata tipo 2 (OMIM 606326).
<i>OTX2</i>	14q22	A proteína codificada por este gene atua como um fator de transcrição. Tem importante papel na embriogênese cerebral e craniofacial. Mutações neste gene causam microftalmia tipo 5 (OMIM 600037).
<i>DAAM1</i>	14q23	Está associado a funções no córtex celular como motilidade, adesão e citocinese. Age como ativador do complexo Disheveled-Rho (OMIM 606626).
<i>PPM1A</i>	14q23	A proteína codificada por este gene é um membro da família PP2C, que são reguladores negativos de vias de resposta ao estresse celular. A super expressão desta fosfatase ativa a expressão do gene supressor de tumor <i>TP53</i> , que leva a apoptose (OMIM 606108).

Gene	Localização	Função
<i>GSC2</i>	22q11.2	É um gene Goosecoid-like. Sua haploinsuficiência está envolvida na malformação dos arcos faríngeos. É expresso em um limitado número de tecidos adultos e no desenvolvimento humano inicial (OMIM 601845).
<i>MAPK1</i>	22q11.2	Este gene está envolvido em muitos processos celulares, como proliferação, diferenciação e regulação de transcrição (OMIM 176948).
<i>TBX1</i>	22q11.2	A expressão deste gene é similar em tecidos adultos e fetais, tanto em humanos quanto em camundongos. É expresso durante a embriogênese dos arcos faríngeos, bolsas e vesículas óticas e coluna vertebral (OMIM 602054).
<i>WNT5B</i>	12p13.33	É um gene membro da família WNT, que está relacionado com a codificação de proteínas de sinalização. Esta família tem sido associada a processos oncogênicos e de desenvolvimento embrionário (OMIM 606361).
<i>NKD2</i>	5p15	Codifica um membro da família de proteínas que agem como um regulador negativo de receptor de sinalização de WNT através da interação com membros da família Dishevelled (OMIM 607852).

Dentre as doenças que podem ser confundidas ou subdiagnosticadas por compartilhar características clínicas com a síndrome de OAVS, temos a síndrome aurículo-condilar (ACS), que é também uma síndrome craniofacial rara e as principais características são micrognatia, hipoplasia condilo-mandibular e malformação de orelha, mais especificamente uma junção entre lobo e hélix. Recentemente, sequenciamento de exoma de alguns casos de ACS levaram a identificação de mutações *missense* em *PLCB4* e *GNAI3*. Todas as mutações estão dentro do domínio catalítico de cada proteína e resultam em um efeito dominante

negativo, no caso do *PLCB4*, ou ganho de função para *GNAI3*. Ambas as proteínas agem nas vias de sinalização para o desenvolvimento dos arcos branquiais (34). Outros dois grupos pesquisaram mutações nesses genes em pacientes com síndromes de malformações craniofaciais. Um deles analisou 27 casos, investigando o tipo de mutação e herança. Dentre estes 27 casos, um foi diagnosticado inicialmente com Síndrome de Treacher-Collins, e oito com Síndrome de Goldenhar ou OAVS. Em todos os casos que não havia diagnóstico inicial de ACS, não foi possível identificar mutações nos genes *PLCB4* e *GNAI3* (8). O segundo trabalho revela características atípicas em ACS com herança autossômica recessiva em dois irmãos heterozigotos compostos (35). Estes trabalhos foram importantes porque estão ajudando a caracterizar e diferenciar síndromes que comprometem o desenvolvimento craniofacial, como a síndrome de OAVS.

Nosso genoma contém múltiplas regiões de DNA com duplicações e deleções, formalmente chamadas de “variação de número de cópias” (em inglês, *copy number variation* – CNV). Embora muitos CNVs não produzam fenótipos patológicos, mas sim confirmam variabilidade populacional, grandes CNVs, geralmente *de novo*, estão associados a um aumento da frequência de doenças humanas. Uma explicação para o efeito imprevisível dos CNVs no fenótipo é que o status de doença geralmente envolve regiões de variações de cópias que contém genes dose-dependentes ou regulatórios. Mais investigações são necessárias para um melhor entendimento desses efeitos nas síndromes de microdeleções e microduplicações. O que se sabe é que determinadas combinações de CNVs podem levar a diferentes controles de regulação gênica (36).

Embora exista uma clara relação entre CNVs e doenças, e causas genéticas estejam implicadas em defeitos congênitos sindrômicos e não-sindrômicos, há evidências de que os CNVs tenham um importante papel na etiologia de várias doenças, incluindo aquelas categorizadas como malformações congênitas.

Girirajan *et al.* (37) observaram, em uma amostra de crianças com retardo mental e malformações congênitas, que quanto mais variantes ou CNVs essas crianças possuíam, mais afetadas elas eram. Portanto, eles supõem que é possível distinguir transtornos sindrômicos de heterogeneidade fenotípica baseado no número total de CNVs e se os mesmos são herdados ou de novo.

Quando um CNV raro é encontrado em um paciente, o qual foi herdado de um genitor saudável, é muito provável que ele seja uma variante de efeito desconhecido ou benigna. Entretanto, um portador aparentemente saudável pode ser um portador de CNV de pouca penetrância, ou ainda, se esse CNV contém genes de *imprinting*, o impacto no fenótipo dependerá se o mesmo foi herdado do pai ou da mãe. Existe ainda uma outra possibilidade quando um CNV parece ter sido herdado de um genitor aparentemente saudável, mas, na verdade, ele é portador do mesmo CNV, só que em mosaico, e por isso, a doença apresenta-se de forma mais grave em seu filho afetado (38).

As análises por arrays são muito eficazes na identificação de alterações genômicas ou variações no número de cópias de sequências de DNA (CNVs) diretamente relacionadas a fenótipos específicos. Entretanto, esses resultados têm demonstrado que os genomas, em especial de indivíduos não aparentados, diferem em relação ao número de CNVs. Alguns deles são bastante frequentes na população, como os que codificam metabolismo de drogas, outros são raros ou étnico-específicos (39).

Com a aplicação de arrays, as causas de síndromes podem ser mais facilmente identificadas, especialmente as síndromes de microduplicações e microdeleções. Ao contrário de estudos baseados em agrupamento por fenótipos, o array promoveu a associação de alterações similares ou no mesmo loco a grupos de fenótipos mais variados, como na Síndrome velocardiofacial. Esses dados são disponibilizados em bancos de dados públicos, como o DECIPHER (*Database Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans*) (66), permitindo estabelecer uma correlação mais precisa entre os achados clínicos com as alterações genômicas encontradas.

Desde a década de 1950, quando Goldenhar descreve pela primeira vez a síndrome que levaria seu nome, até a década atual, a maioria dos pacientes com OAVS não apresentam anomalias cromossômicas estruturais visíveis, no entanto com a melhoria das técnicas de biologia molecular, estes pacientes estão sendo alvo de investigações para microrrearranjos.

Apesar dos estudos relatados, considera-se que exista uma carência de conhecimento sobre a etiologia das Síndromes do Espectro óculo-aurículo-vertebral.

Considerando que trabalhos relatam regiões cromossômicas como possíveis candidatas, propomos um estudo em busca de microrrearranjos cromossômicos nestas regiões já citadas, além de rastreamento geral em busca de novas regiões.

O estudo proposto visa entender melhor a síndrome e a função dos genes envolvidos no desenvolvimento embrionário, levando a um diagnóstico mais preciso e a um melhor entendimento do funcionamento normal desses genes.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Esse projeto teve como objetivo identificar genes ou regiões cromossômicas relacionadas às síndromes que fazem parte do espectro óculo-aurículo-vertebral (OAVS).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Investigar a presença de microdeleções ou microduplicações em regiões previamente identificadas como candidatas para as síndromes do espectro óculo-aurículo-vertebral em pacientes com essa síndrome utilizando a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Os genes selecionados foram: *GSC* (14q32), *BAPX1* (4p15), *SIX1*, *SIX6* (14q23), *OTX2* (14q22), *NKD2* (5p15), *WNT5B* (12p13.33), *DAAM1* e *PPM1A* (14q23), *MAPK1*, *TBX1* e *GSC2* (22q11.2);

b. Buscar rearranjos submicroscópicos nos afetados utilizando a análise cromossômica por *microarray*.

3. METODOLOGIA

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram analisados pacientes com diagnóstico de síndromes do Espectro óculo-aurículo-vertebral, (OAVS) que foram atendidos ou encaminhados para o Hospital Universitário de Brasília e Hospital de Apoio, e que concordaram em participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Fizeram parte do estudo 27 casos de OAVS sendo 20 casos isolados e sete familiares. Desse total de 27 casos, 19 casos não apresentaram qualquer comorbidade, enquanto 8 casos apresentaram alguma comorbidade, dentre elas Síndrome de Down, pé torto congênito, estrabismo, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, retardo mental, fenda palatina e convulsão.

Dentre os casos familiares, em um deles foram analisados dois irmãos (paciente 20). Em outro caso familiar foram colhidos sangue de um tio e um primo de segundo-grau da propósita para uma posterior análise de exoma (paciente 3).

Critérios de inclusão: pacientes que apresentam clínica compatível com a síndrome do espectro óculo-aurículo-vertebral, como malformações de orelha (anotia, microtia), apêndices pré-auriculares, assimetria facial e dermóide epibulbar, incluindo aqueles que apresentam comorbidades.

Critérios de exclusão: pacientes que não apresentam clínica compatível com a síndrome do espectro óculo-aurículo-vertebral, ou aqueles que os pacientes ou responsável legal não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critério de diagnóstico normal: foi definido como diagnóstico normal aquele paciente, cuja análise não apresentou qualquer alteração cromossômica ou que apresentou alterações já previstas como variação de número de cópias (CNVs) no *Database of Genomic Variant* (DGV), ou seja, que possui algum tipo de polimorfismo caracterizado como não-patogênico.

Critério de diagnóstico para alteração potencialmente patogênica:
pacientes que apresentaram rearranjos cromossômicos não descritos previamente como CNVs no banco de dados DGV.

3.2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pacientes, os pais ou responsáveis, antes de assinarem o termo, foram esclarecidos sobre o diagnóstico da Síndrome do espectro-óculo-aurículo-vertebral e sobre o procedimento de retirada e o destino da amostra de sangue, sendo exposta de forma acessível a questão do sigilo sobre a identificação do paciente, e ainda a autorização para uso de fotos (Anexo I). Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Implantação de novas metodologias moleculares para o diagnóstico e pesquisa de distúrbios de origem genética”, aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina sob o número 086/2009 (Anexo II) e financiado no Edital PPSUS 2009 – Ministério da Saúde e FAPDF.

3.3. MÉTODOS LABORATORIAIS

3.3.1. Avaliação Clínica e Coleta de Material:

A anamnese e o exame clínico dos pacientes foram realizados por médicas geneticistas do ambulatório de genética do Hospital Universitário de Brasília (HUB) ou pelos médicos que os encaminharam. Amostras de sangue periférico foram obtidas dos pacientes e seus pais biológicos, quando possível, em dois tubos, um

com EDTA e outro com heparina. Essas amostras foram utilizadas para extração de DNA e obtenção de cultura temporária de células, respectivamente.

3.3.2. Exame Cromossômico:

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de culturas temporárias de linfócitos de sangue periférico, segundo as técnicas de rotina do laboratório. Foram analisadas pela Dra. Íris Ferrari, no mínimo, 30 metáfases de cada paciente após bandeamento G.

Coletou-se quatro mililitros de sangue periférico em tudo contendo heparina para realização de exame citogenético.

Para a cultura temporária de linfócitos de sangue periférico foi utilizado meio de cultura RPMI (Invitrogen, Carlsbad, EUA) suplementado com 15% de soro bovino fetal (Invitrogen) ao qual acrescentou-se fitohematoglutina (Gibco, BRL) na concentração final de 1%. A cada 9 ml de cultura foi adicionado cerca de 1 ml de sangue total.

A cultura ficou incubada a 37° por 72 horas, quando então foi realizada a colheita para a obtenção das preparações cromossômicas. Quarenta minutos antes da colheita foram acrescentados 50 µl de colchicina (Sigma) a uma concentração de 4×10^{-5} M. A hipotonização foi feita com uma solução de KCl 0,075 M, por 10 minutos a 37°C.

A fixação foi feita com álcool metílico e ácido acético na proporção 3:1. O material fixado foi pingado sobre lâminas conservadas em água destilada gelada e a secagem feita ao ar. As preparações cromossômicas foram mantidas a temperatura ambiente por quatro a sete dias e então utilizadas para análise cromossômica. A análise foi realizada em microscópio óptico após tratamento com tripsina e coloração com Giemsa (bandeamento G).

3.3.3. Extração de DNA:

A extração de DNA foi feita a partir do sangue periférico pelo método Puregene – “*Salting out*”. Este método é dividido em etapas, sendo a primeira de lise celular, onde é utilizado 5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA pH 8,0 em uma reação e, 10mM Tris pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0 e 1% SDS em outra, para cada reação a solução é centrifugada a 3400 rpm por 10 minutos. Para a segunda etapa utiliza-se 1 ml da solução de precipitação de proteína ao lisado celular. Esta solução contém 7,5M de NH_4 Ac. Centrifuga-se a 3400 rpm por 10 minutos. As proteínas precipitadas formarão um *pellet* marrom escuro e compacto.

Na etapa de precipitação de DNA, o sobrenadante é transferido para um tubo *falcon* contendo 3ml de isopropanol. O tubo é invertido lentamente até que se forme um novelo de DNA. A reação é centrifugada a 3400 rpm por 3 minutos. Retira-se o sobrenadante, e adiciona-se 3ml de etanol absoluto. A reação é novamente centrifugada. Depois disso, drena-se o tubo e deixa o DNA secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Na última etapa, acrescenta-se ao tubo com o DNA, 200-250 μ l de TE 1x ou água milliQ, que resulta em uma concentração aproximada de 400 ng/ μ l. O DNA é armazenado a 2-8°C.

As quantificações foram feitas no espectrofotômetro Nanovue® (GE) e Qubit® (Life Technologies). No primeiro foi possível obter a razão 260/280 nm, que se pode observar a pureza da amostra. No segundo, a quantificação de DNA foi dada de maneira mais precisa.

3.3.4. Busca de Microrrearranjos Cromossômicos por MLPA:

Para a investigação de deleções ou duplicações nos genes candidatos utilizamos a técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (67).

Essa técnica permite a identificação do número de cópias de uma dada seqüência de DNA por meio da hibridação de sondas específicas e amplificação por PCR. Essas sondas apresentam dois segmentos complementares às seqüências-alvo de DNA. Inicialmente as sondas são hibridadas ao DNA e em seguida os fragmentos são unidos por uma ligase. Após uma nova desnaturação o fragmento formado pela junção das sondas é amplificado por PCR. A reação de PCR é realizada com um único par de iniciadores, comum a todas as sondas. Em seguida os fragmentos foram submetidos à eletroforese capilar no analisador genético ABI-3130XL e os resultados analisados com o *software* “Genemapper” (Applied Biosystems).

As sondas foram desenhadas de acordo com o protocolo descrito pela MRC-Holland (<http://www.mlpa.com>). O conjunto de sondas inclui uma sonda para cada um dos genes candidatos. Como em um experimento de MLPA utilizando sondas sintéticas, é possível testar-se até 13 regiões simultaneamente, selecionamos os genes *GSC* (14q32), *BAPX1* (4p15), *SIX1*, *SIX6* (14q23) e *OTX2* (14q22), previamente descritos como candidatos para a síndrome do espectro óculo-aurículo-vertebral. Além desses genes, selecionamos os genes *NKD2* (5p15), *WNT5B* (12p13.33), *DAAM1* e *PPM1A* (14q23), *MAPK1*, *TBX1* e *GSC2* (22q11.2) com base em suas funções na embriogênese dos primeiros arcos branquiais e suas posições genômicas, uma vez que fazem parte, ou estão próximos, de regiões onde rearranjos foram descritos em pacientes com OAVS.

Nas reações de MLPA, foi utilizado o kit EK-MLPA (MRC-Holland), 1fmol do mix de sondas e 400ng de DNA genômico. A análise dos resultados foi feita pela observação dos eletroferogramas.

Para a padronização do protocolo de MLPA foi realizada uma reação teste para verificar se as sondas sintetizadas estavam funcionando e como estas se apresentavam no eletroferograma (Figura 6).

Foi observada amplificação de quase todas as sondas, porém algumas apresentaram um pico de amplificação baixo, o que é esperado, uma vez que cerca de 13% das sondas construídas pelo próprio pesquisador podem não funcionar eficazmente. Diante disto, a sonda do *TBX1* não foi analisada, restando 12 sondas para análise (www.mlpa.com – protocolo versão MDP v003).

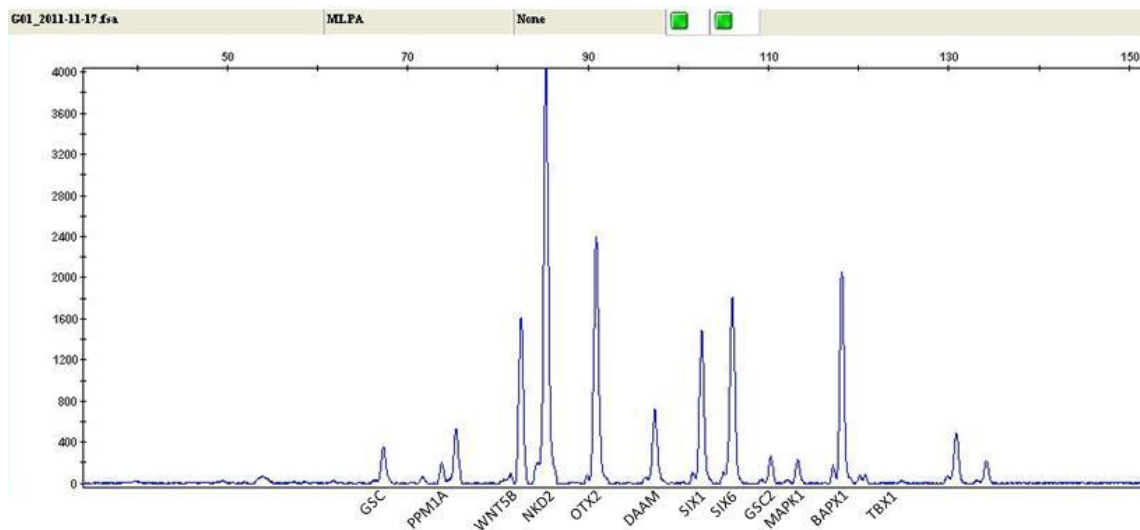


Figura 6. Eletroferograma evidenciando os picos referentes à amplificação das sondas de MLPA. Os dois últimos picos representam sondas controle mapeadas em segmentos cromossômicos com baixa frequência de rearranjos.

3.3.5. Análise Cromossômica por Microarray

O exame de cariótipo, inicialmente realizado para a triagem de alterações cromossômicas, possui resolução de até 4-10 Mb. Assim, para a detecção de alterações cromossômicas menores são necessárias técnicas com maior poder de resolução.

Uma das técnicas de citogenética molecular mais utilizadas para a triagem de alterações cromossômicas submicroscópicas é a análise cromossômica por micro

array. Essa técnica de citogenética molecular permite verificar se há perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos em todo o genoma de um indivíduo, detectando alterações cromossômicas de 10 a 100 vezes menores do que é visível ao microscópio óptico, dependendo da plataforma utilizada.

Investigamos a presença de alterações cromossômicas submicroscópicas pela análise cromossômica por *microarray* em pacientes com diagnóstico da Síndrome do espectro óculo-aurículo-vertebral utilizando a plataforma de 750K da Affymetrix®. Essa plataforma utiliza microarranjos de DNA contendo 500.000 sondas não polimórficas para CNVs de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano e cerca de 250.000 SNPs. Os procedimentos usados de purificação das amostras, hibridação e lavagem são os descritos pelo fabricante. As imagens geradas pelo *scanner* Affymetrix GeneChip 3000 7G foram analisadas através do programa ChAS versão 2.0.1.2

Foram consideradas pelo programa ChAs alterações acima de 50 sondas duplicadas consecutivamente, 25 sondas deletadas consecutivamente, e para detectar perda de heterozigose, regiões de no mínimo, 5,000 kbp.

Alternativamente, alguns pacientes foram analisados por CGH-*array*. Esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Carla Rosenberg do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, que utilizou a plataforma Agilent (Agilent technologies®).

Este *oligoarray* contém quatro áreas de aproximadamente 60.000 oligonucleotídeos. As amostras teste e referência foram marcadas por *random priming* com Cy3 Cy5 dCTPs, respectivamente. Os procedimentos usados de purificação das amostras, hibridação e lavagem são os descritos pelo fabricante. As imagens obtidas com o uso do *scanner* Agilent e do programa Feature Extraction v9.5.1 foram analisadas com o programa CGH *Analytics* 3.4.40 (ambos das Agilent Technologies), usando o algoritmo estatístico ADM-2 e limiar de sensibilidade 6.0. Apenas as alterações que continham no mínimo cinco oligonucleotídeos consecutivos com razão \log_2 alterada foram consideradas pelo programa como uma possível alteração no número de cópias de determinado segmento genômico. Usando esses critérios, a precisão de mapeamento das alterações é de

aproximadamente 80 kb, que é o espaçamento médio entre os oligonucleotídeos. O tamanho mínimo de alterações detectadas é cerca de 400 kb (cinco oligonucleotídeos).

Em apenas um paciente o *array* utilizado apresentava 44.000 sondas (Agilent 44k).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fizeram parte do estudo 20 casos isolados e sete casos familiares de OAVS. Desse total de 27 casos, 19 não apresentaram qualquer comorbidade diagnosticada no ato da consulta, enquanto oito casos apresentaram outros transtornos ou malformações, dentre eles Síndrome de Down (paciente 24), pé torto congênito (paciente 24), estrabismo (pacientes 5 e 8), atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (paciente 8), retardo mental (pacientes 12 e 21), fenda palatina (pacientes 28 e 29) e convulsão (paciente 29).

A taxa de ocorrência entre os sexos foi de quase 1:1, os meninos representaram 55,5% dos casos. Três pacientes apresentaram surdez causada por anotia bilateral, 20 apresentaram anotia ou microtia, sendo que 45% manifestaram à esquerda, 35% à direita e 20% bilateralmente. Onze pacientes apresentaram apêndices pré-auriculares, sete tinham assimetria facial e três dermóide epibulbar. Dois pacientes relataram defeitos congênitos cardíacos. Apenas um paciente apresentou coloboma de íris e outro escoliose (Tabela 2). Não houve registros de malformações renais ou de membros. Houve uma gestação gemelar dizigótica, com um dos gêmeos apresentando OAVS. Não foi possível obter dados clínicos detalhados dos paciente 25 e 27 para compor a presente tabela.

Tabela 2. Resumo dos pacientes e os principais sinais clínicos de OAVS

Paciente	Dermóide epibulbar	Coloboma de íris	Anotia/Microtia	Apêndice pré-auricular	Assimetria facial	Defeitos congênitos cardíacos	Escoliose
1			+			+	
2			+				
3			+		+		
4			+				
5	+			+	+		
6			+		+		
7			+		+		
8			+		+		
9			+		+		
10			+	+			
11			+				
12				+	+		

Paciente	Dermóide epibulbar	Coloboma de íris	Anotia/Microtia	Apêndice pré-auricular	Assimetria facial	Defeitos congênitos cardíacos	Escoliose
13			+		+		
14			+		+		+
15			+				
16				+			
17	+			+			
18			+	+			
19			+		+		
20			+	+			
21		+		+			
22			+		+	+	
23			+	+	+		
24	+		+	+			
26			+	+	+		

Dentre os casos familiares, em um deles (paciente 20) foram analisados outros dois irmãos afetados. Em outro caso familiar foram colhidos sangue de um tio e um primo de segundo-grau da propósita para uma posterior análise de exoma (paciente 3). Foram considerados casos familiares aqueles em que algum membro da família apresentou algum tipo de malformação de orelha. As malformações mais recorrentes foram microtia e apêndices pré-auriculares.

A paciente 3 pertence a uma família que apresenta OAVS, provavelmente, como uma característica autossômica dominante. Alguns integrantes de sua família materna apresentam pequenas malformações de orelha, e ao menos, três são afetados, compartilhando características como assimetria facial e microtia.

Revedo os prontuários dos pacientes atendidos no ambulatório de genética do HUB, percebemos que as famílias dos pacientes 3 e 10 relatam história familiar positiva para OAVS e residem em cidades que se distanciam apenas 26 quilômetros, uma da outra, ambas no Ceará. Portanto, dentre as perspectivas de continuação do estudo, encontra-se a análise de co-segregação familiar da síndrome nestas duas famílias, que acreditamos ter uma mesma origem, pela análise de exoma.

A descrição clínica dos pacientes encontra-se no Apêndice A.

a. Análise de microrrearranjos por MLPA

Foram testados dez pacientes pela técnica de MLPA, e não foi encontrada nenhuma microdeleção ou microduplicação nos genes candidatos selecionados, ou seja, todos apresentaram resultado normal. Essas análises deixaram evidente que esses rearranjos nas regiões previamente consideradas candidatas são pouco frequentes, apesar do pequeno número de pacientes investigado.

Como não identificamos nenhum paciente com alteração, optamos por realizar a análise cromossômica por *microarray* que permite uma investigação de todo o genoma e não apenas de regiões candidatas.

b. Análise de microrrearranjos por *array*

Dos 27 pacientes desta amostra, 26 foram analisados quanto a alterações cromossômicas submicroscópicas por *array* (Tabela 3). Não foi possível realizar *array* em um paciente pela baixa qualidade de DNA apresentada, assim como também não foi possível fazer a coleta do mesmo. Quatorze pacientes (53,8%) não apresentaram rearranjos de acordo com a resolução utilizada. Consideramos normais citogeneticamente aqueles pacientes que não apresentaram qualquer alteração cromossômica ou que apresentaram apenas rearranjos já descritos como CNVs não patogênicos no banco de dados DGV.

Dentre os outros 12 pacientes, dois deles apresentaram deleção (7,7%), seis possuem duplicação (23%), dois tem perda de heterozigose (7,7%) e um paciente apresentou um rearranjo complexo com um grande segmento duplicado e uma deleção terminal (3,8%).

Tabela 3. Pacientes que realizaram análise por array e seus respectivos resultados, incluindo a posição e região genômica, os genes envolvidos, tamanho do rearranjo, forma de herança e a plataforma utilizada para o experimento.

Amostra	Tipo de alteração	Resultado/Posição genômica	Localização cromossômica	Tamanho	Herança da alteração	Plataforma
1	Deleção	chr22:17,276,772-19,770,655 Inclui: <i>DGCR2</i> , <i>GSC2</i> , <i>TBX1</i> , <i>SEPT5</i>	22q11.2	2,500 kbp	<i>De novo</i>	Agilent 44k (hg18)
2	Deleção	chr12:115,099,359-115,130,894 <i>TBX3</i>	del12q24.21	31 kbp	<i>De novo</i>	Affymetrix 750k (hg19)
3	-	Normal	-	-	-	Affymetrix 750k (hg19)
5	LOH	chr3:30,537,682-57,921,506	3p26.3-p14.3	27 Mb	*	Affymetrix 750k (hg19)
6	-	Normal	-	-	-	Agilent 60k (hg18)
7	-	Normal	-	-	-	Agilent 60k (hg18)
8	Deleção Duplicação	chr2:12,770-203,523 chr2:203,625-24,853,867	2p25.3 2p25.3-p23.3	190 kbp 24,650 kbp	<i>De novo</i>	Affymetrix 750k (hg19)
9	Duplicação	Dup chr4:76,772,950-77,000,736 <i>PPEF2</i> , <i>NAAA</i> , <i>ART3</i> , <i>SDAD1</i> , <i>CXCL9</i> , <i>CXCL10</i> , <i>CXCR3</i>	4q21.1	228 kbp	*	Affymetrix 750k (hg19)

Amostra	Tipo de alteração	Resultado/Posição genômica	Localização cromossômica	Tamanho	Herança da alteração	Plataforma
10	-	Normal	-	-	-	Agilent 60k (hg18)
11	Duplicação	Dup chr20:8,794,395-9,336,676 Duplicação parcial de <i>PLCB4</i>	20p12.3-p12.2	550 kbp	Herança paterna Genitor não afetado	Agilent 60k (hg18)
12	Duplicação	Dup chr1:200,451,451-200,769,281 Dup chr10:91,115,477-91,631,690 <i>KIF14, CAMSAP2, DDX59, IFIT1, SLC16A12, PANK1, KIF20B</i>	1q31.1 10q23.31	318 kbp 516 kbp	Herança materna Herança maternal Genitora não afetada	Affymetrix 750k (hg19)
13	-	Normal	-	-	-	Affymetrix 750k (hg19)
14	-	Normal	-	-	-	Agilent 60k (hg18)
15	-	Normal	-	-	-	Affymetrix 750k (hg19)
16	-	Normal	-	-	-	Affymetrix 750k (hg19)
17	Duplicação	chr11:1,946,870-2,212,488	11p15.5	265 kbp	¥	Affymetrix 750k (hg19)

Amostra	Tipo de alteração	Resultado/Posição genômica	Localização cromossômica	Tamanho	Herança da alteração	Plataforma
18	Deleção	chrX:32,445,543-32,577,654	Xp21.1	132 kbp	-	Affymetrix 750k (hg19)
19	-	Normal	-		-	Affymetrix 750k (hg19)
20	-	Normal	-		-	Affymetrix 750k (hg19)
21	-	Normal	-		-	Affymetrix HD (hg19)
22	-	Normal	-		-	Affymetrix 750k (hg19)
23	LOH	chr12:72,248,741-92,506,140	12q15-q22	20 Mb	-	Affymetrix 750k (hg19)
24	-	Trissomia do 21	-		-	Affymetrix 750k (hg19)
25	-	Normal	-		-	Affymetrix 750k (hg19)
26	Duplicação	chr12:21,969,669-22,817,436 <i>ABCC9, CMAS, ST8SIA1, C2CD5, ETNK1</i>	12p12.1	847 kbp	¥	Affymetrix 750k (hg19)

Amostra	Tipo de alteração	Resultado/Posição genômica	Localização cromossômica	Tamanho	Herança da alteração	Plataforma
27	Duplicação	chr6:106,566,922-106,942,362 <i>ATG5</i>	6q21	375 kbp	¥	Affymetrix 750k (hg19)

Dup = duplicação; LOH = perda de heterozigose; *criança adotada; ¥ os pais ainda não foram testados .

Para quatorze dos pacientes não foram descritas anormalidades cromossômicas: 3, 6, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 e 25.

A paciente 18 apresentou resultado negativo para rearranjos que pudessem ser associados à OAVS, entretanto, foi observado um alelo com deleção dos exons 19 a 31 do gene *DMD* causador da Distrofia Muscular de Duchenne na região Xp21.1 (figura 7). Consideramos este achado com um “incidentaloma”, uma vez que não era o objetivo do trabalho este tipo de descoberta. Será feito aconselhamento genético desta família para que eles saibam a probabilidade de que o resultado de uma futura gestação seja afetado por este tipo de distrofia.



Figura 7. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho (Linha 1) representa o segmento deletado em Xp21.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representado o gene *DMD*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição. Podemos observar que a região deletada inclui apenas parte do gene *DMD*.

Os microrearranjos, compatíveis com algum efeito patogênico, entre microdeleções, microduplicações e perda de heterozigose, encontrados nos outros 12 pacientes da amostra estão descritos abaixo:

Paciente 1

A paciente 1 apresentou uma microdeleção *de novo* de 2.500 kbp na posição genômica chr22:17,276,772-19,770,655 (Build36/hg18) na região 22q11.21 (Figura 8). A alteração desta região também é responsável pela Síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial (VCFS), e esta paciente apresenta sinais clínicos de ambas as síndromes. Este achado resultou em uma publicação no *American Journal of Medical Genetics – Part A* (anexo III).

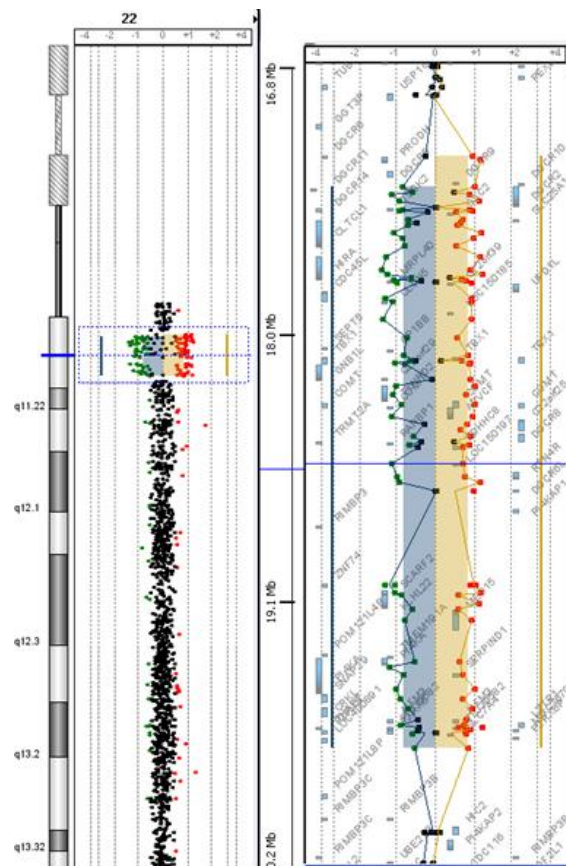


Figura 8. Resultado do CGH-array com 44.000 sondas Agilent na paciente 1, mostrando a deleção em 22q11.21.

A deleção em 22q11.2 encontrada nesta paciente, também é a mais frequentemente relatada em outros casos de OAVS (18, 21, 22, 40). Esta é uma região de alteração genômica recorrente, e a esta deleção estão associados fenótipos variados: Síndrome da deleção distal do 22q11.2, Síndrome DiGeorge (DGS)/ Velocardiofacial (VCFS).

Todas as microdeleções em 22q11.2 descritas para OAVS se sobrepõem em quase toda a extensão, entretanto, a microdeleção encontrada na paciente 1 está localizada a jusante das descritas anteriormente. Contudo, a sonda comercial N25 utilizada na técnica de FISH para análise da Síndrome velocardiofacial, hibrida em um segmento mapeado na região da deleção da nossa paciente. Digilio e colaboradores (40) descreveram três pacientes com OAVS e del22q11 identificada por FISH. Nesse caso, por se tratar de um estudo com uma única sonda, não é possível saber qual o tamanho real das deleções e de que modo elas se sobrepõem as deleções já descritas (Figura 9).

Estes dados sugerem que a ocorrência de OAVS e a microdeleção em 22q11.2 não é casual. Dessa forma, gene(s) mapeado(s) nesse segmento quando alterados podem estar associados com a falha no desenvolvimento craniofacial. Uma vez que deleções que não se sobrepõem causam fenótipos similares é possível que haja um mecanismo regulatório atuando sobre genes mapeados em 22q11.2, particularmente aqueles envolvidos no desenvolvimento da crista neural e arcos branquiais.

gene *GCS* e sua função é semelhante. O gene *GSC*, mapeado em 14q32, possui um importante papel no desenvolvimento dos arcos branquiais, e já foi descrito como candidato para OAVS com base em um estudo de ligação (7). Estes achados sugerem que em 22q11.2 pode haver gene ou genes candidatos para OAVS, sendo um deles o *GCS2*.

Um gene importante localizado nesta região é o *TBX1*, indicado como gene candidato para a Síndrome de microdeleção 22q11.2 e a Síndrome DiGeorge/Velocardiofacial (DGS/VCFS). Camundongos nocauteados para *TBX1* apresentaram malformações cardíacas, craniofaciais e na paratireoide, que são problemas encontrados naqueles pacientes com formas graves de DGS/VCFS (41).

Ainda utilizando camundongos como modelo animal, mutações neste gene resultaram em falhas no desenvolvimento da orelha media e externa, e em hipoplasia da orelha interna. Um fenótipo similar também foi observado com a inativação do *TBX1* apenas na endoderme dos arcos faríngeos, indicando um papel primário deste gene na morfogênese desses arcos faríngeos (42). Yagi e colaboradores (65) identificaram mutações de ponto em *TBX1* em muitos indivíduos com fenótipos da Síndrome de microdeleção 22q11.2.

Paciente 2

Na paciente 2 foi observada uma microdeleção *de novo* de 31 kbp na posição genômica chr12:115,099,359-115,130,894 (GRCh37/hg19) na região 12q24.21 (figura 10). Nesta região encontra-se o gene *TBX3*, que pertence a uma família evolutivamente conservada de fatores de transcrição T-box. Membros dessa família têm papéis centrais no controle do desenvolvimento. Sua expressão é regulada durante a embriogênese, e regula a proliferação e diferenciação de várias células progenitoras durante a organogênese. Acredita-se que sua haploinsuficiência causa malformações congênitas, envolvendo estruturas craniofaciais, cardiovasculares e esqueléticas (43). Além disto, mutações neste gene são descritas como causa da Síndrome Ulnar-mamária (44), cujas características não se enquadram na paciente por não apresentar anomalias na parte posterior dos membros superiores, mamas e/ou nos genitais.

Esta paciente apresenta uma deleção *de novo* do gene *TBX3* – único deletado no segmento - e fenótipo clássico de OAVS, indicando um novo gene para a síndrome aqui estudada. Esse achado reforça o papel do *TBX1* como o principal gene envolvido na etiologia da OAVS nos pacientes com microdeleção em 22q11.

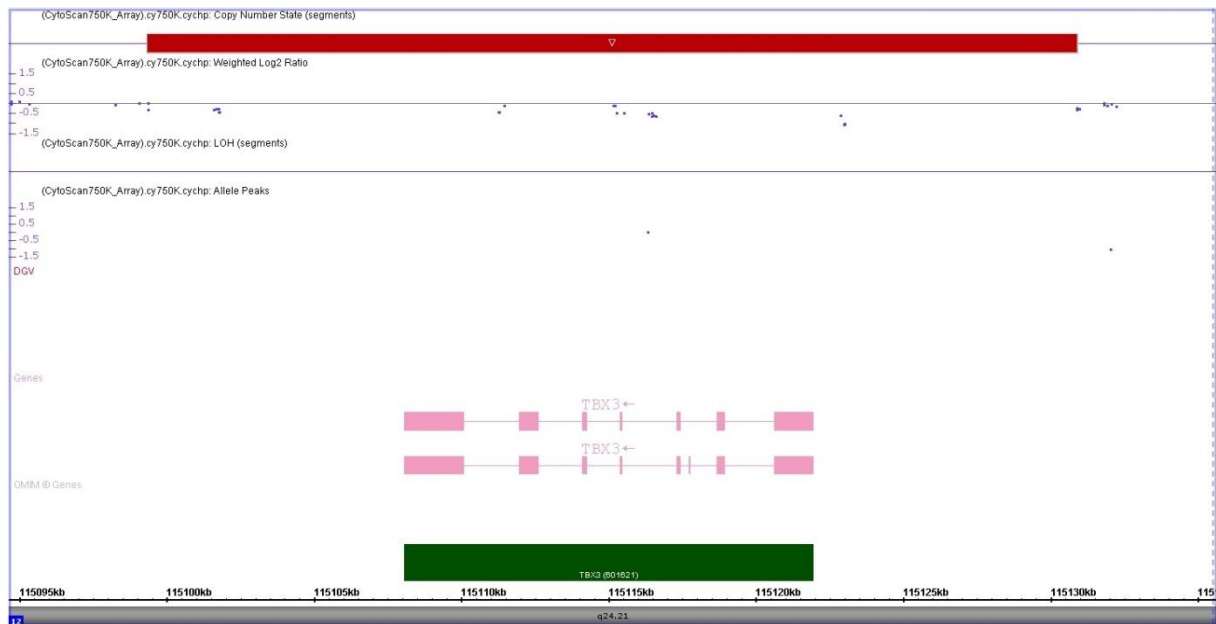


Figura 10. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho (Linha 1) representa o segmento deletado em 12q24.21. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representando o gene *TBX3*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição. Podemos observar que a região deletada inclui apenas o gene *TBX3*.

Paciente 8

No paciente 8 foi observado um rearranjo cromossômico complexo envolvendo uma pequena região deletada terminal e uma região duplicada, ambas *de novo*, nas posições genômicas chr2:12,770-203,523 de 190 kbp e chr2:203,625-24,853,867 (GRCh37/hg19) de 24.650 kbp, respectivamente, na região 2p23.3-p25.3 (figura 11). Esta grande região de rearranjo compreende mais de 50 genes, dentre eles destacamos o *SOX11*.

SOX11 é um gene da família de mediadores do desenvolvimento. Esses mediadores genéticos são expressos em combinações de padrões sobrepostos que controlam espacial e temporalmente processos diferentes do desenvolvimento. O

domínio HMG (motivo de ligação ao DNA compreendido na classe de proteínas do Grupo de Alta Mobilidade) das proteínas SOX aparenta ativar a transcrição indiretamente por curvarem o DNA de forma que outros fatores de transcrição possam fazer contato com regiões promotoras dos genes. Vários genes SOX atuam em vias de desenvolvimento diferentes. Portanto, mutações em genes mediadores são causas muito comuns de malformações congênitas. Acredita-se que *SOX11* seja importante no desenvolvimento do sistema nervoso central tanto em linhagens gliais como neuronais, sugerindo um importante papel na maturação e diferenciação neuronal, agindo como um ativador transcricional (45), o que explicaria o atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, distúrbios de comportamento e epilepsia do paciente em tela.

Possivelmente este grande número de genes duplicados tenha interferido na formação histológica craniofacial, levando ao quadro clínico de OAVS e distúrbios de comportamento apresentados pelo paciente. No DECIPHER estão descritos dois pacientes com deleções nesta região e que apresentam baixa implantação e malformação de orelha externa (276586 e 253151, respectivamente) e um paciente com duplicação apresentando deficiência auditiva (271052).

Três estudos descreveram pacientes com rearranjo na região subtelomérica 2p25.3, sendo dois deles casos de deleção. Apesar dos pacientes apresentarem características heterogêneas, esses casos compartilham alguns sinais clínicos como retardo mental, autismo, anomalias craniofaciais e esqueléticas, estrabismo, hipotonia, flexibilidade das juntas e dismorfias (46, 47, 48). O paciente aqui descrito também compartilha algumas dessas características como anomalia craniofacial e estrabismo.

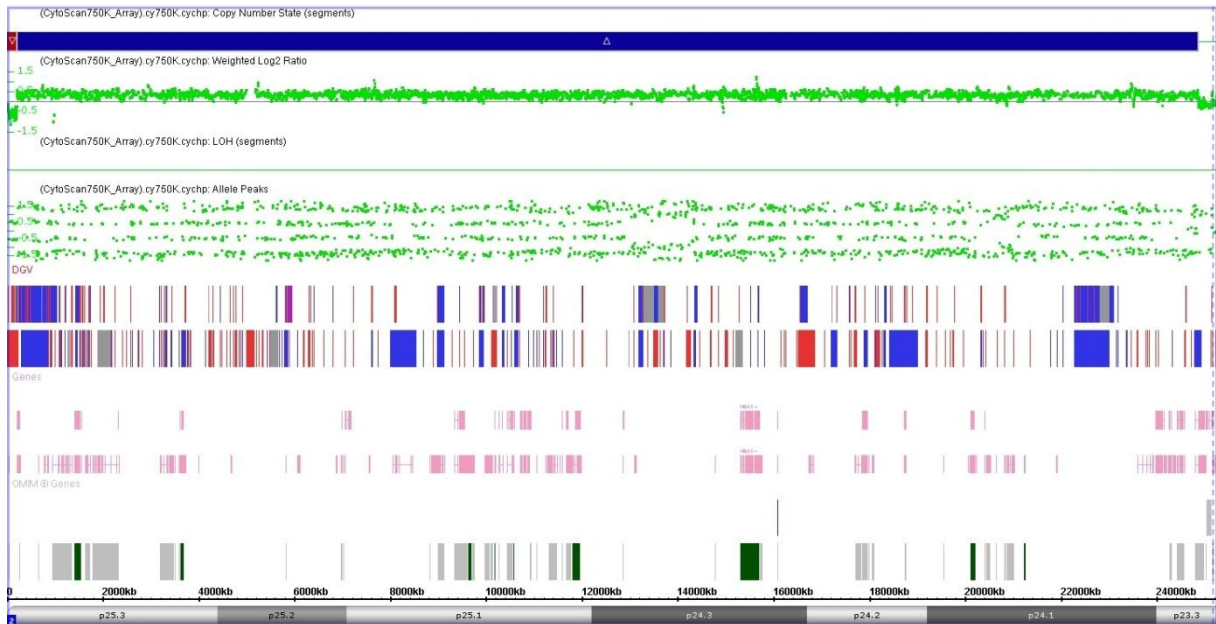


Figura 11. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo vermelho representa o segmento deletado e o retângulo azul representa o segmento duplicado em 2p25.3 (Linha 1). A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs).

Paciente 9

A paciente 9 possui uma microduplicação na posição genômica chr4:76,772,950-77,000,736 (GRCh37/hg19), contendo 228 kbp, na região 4q21.1 (figura 12). Não foram descritas duplicações nesta região como CNV, apenas deleções e inversões, portanto, a duplicação é, a princípio, não polimórfica. Os genes localizados nesta região duplicada e o papel biológico estabelecido ou sugerido, até o momento, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Lista de genes localizados na região duplicada 4q21.1 com suas respectivas funções biológicas.

Genes	Função biológica
<i>PPEF2</i>	Relacionado ao sistema visual. Possui alta similaridade com o gene responsável pela degeneração de retina em <i>Drosophilas</i> (OMIM 602256).
<i>NAAA</i>	Associado a degradação de esfingolipídeos lisossomais e hidrólise de ceramida em ácidos ,graxos livres (OMIM 607469).

Genes	Função biológica
<i>ART3</i>	Gene da família de ADP-ribosiltransferase. No banco de dados DECIPHER estão relatados pacientes com duplicação ou deleção deste gene que apresentam microtia, anormalidades de face e coloboma de íris (OMIM 603086; http://genome.ucsc.edu).
<i>SDAD1</i>	Gene pouco estudado, envolvido na biogênese ribossomal. Foram relatados no DECIPHER pacientes com duplicação ou deleção deste gene que apresentam microtia, anormalidades de face e coloboma de íris (http://genome.ucsc.edu)
<i>CXCL9</i>	Sem definição específica, parece estar envolvido no tráfico de células T (OMIM 601704).
<i>CXCL10</i>	Sua proteína codificada quando ligada à CXCR3 resulta em efeitos pleiotrópicos, como estimulação de monócitos, migração de células T e natural killer e modulação da adesão molecular (OMIM 147310).

Os genes citados acima não elucidam a causa de OAVS, mas esta região não possui nenhum CNV previamente descrito, portanto, acredita-se que esta seja a causa da malformação nesta paciente. Seria importante investigarmos os pais biológicos da propósita, no entanto, ela é adotada, não sendo possível prosseguir com a investigação. Portanto, com o conhecimento existente acerca dessa região e dos genes nela mapeados não é possível afirmarmos com segurança se a alteração é ou não patogênica. A descrição no DECIPHER de outros pacientes com alteração nesta região que apresentam problemas de desenvolvimento craniofacial reforça a ideia que ela possa ser patogênica.



Figura 12. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento deletado em 4q21.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes *PPEF2*, *NAAA*, *SDAD1* e *ART3*.

Paciente 11

No paciente 11 foi encontrada uma microduplicação de aproximadamente 550 kbp na posição genômica chr20:8.794.395-9.336.676 (Build36/hg18) na região 20p12.3-p12.2, sendo o genitor também portador do mesmo rearranjo (figura 13). Nesta região duplicada encontra-se o gene *PLCB4*, que foi descrito recentemente como o causador da síndrome auriculocondilar (ACS), que pode ser confundida com a síndrome do espectro óculo-auriculo-vertebral, em virtude de semelhanças fenotípicas de ambas as síndromes (34). O paciente e sua família foram reavaliados pelo serviço de genética médica e no Serviço Clínico de Atendimento de Pacientes Portadores de Anomalias Dentárias da Universidade de Brasília. Nenhum deles possui malformação do côndilo mandibular, mas o paciente apresenta características que se enquadram no novo diagnóstico de ACS.

O genitor não possui características clínicas para OAVS, apenas apresenta as orelhas levemente rotadas para trás, sugerindo assim uma herança autossômica dominante com penetrância incompleta. Rieder e colaboradores (34) relataram penetrância incompleta e/ou expressividade variável nos fenótipos de ACS por eles estudados. Nosso paciente e seu genitor apresentam uma duplicação dos 18 primeiros exons e este rearranjo pode exercer um efeito dominante negativo.

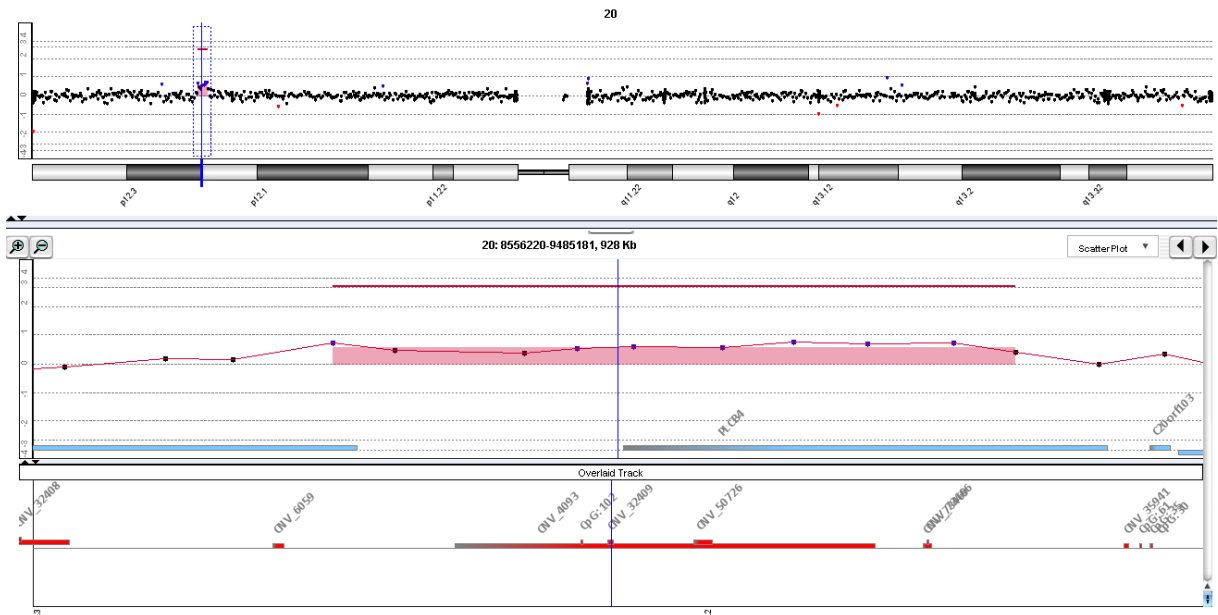


Figura 13. Resultado do array Agilent 60k no paciente 11, mostrando uma duplicação em 20p12.3-p12.2.

Paciente 12

Na paciente 12, foram encontradas duplicações em 1q31.1 e 10q23.31, apresentando tamanhos de 318 kbp e 516 kbp, respectivamente, e regiões genômicas chr1:200,451,451-200,769,281 e chr10:91,115,477-91,631,690 (Build37/hg19) (figuras 14 e 15). A genitora também apresenta ambas as duplicações, no entanto, não apresenta sinais clínicos de OAVS. Na primeira microduplicação encontram-se os genes *KIF14*, que tem atividade de transporte intracelular e divisão celular (49); *CAMSAP2*, que atua na organização de microtúbulos não-centrossomais (50); e *DDX59*, cuja baixa produção da proteína foi recentemente associada à síndrome orofaciocdigital (51).

A segunda microduplicação localizada no braço longo do cromossomo 10 contém os genes *IFIT1*, *SLC16A12*, *PANK1*, *KIF20B*, que estão envolvidos no processo de formação de fibroblastos e linfoblastos; catarata juvenil, microcornea e glicosúria renal; metabolismo de ácidos graxos; e divisão celular, respectivamente (52).

Em ambas as regiões, estão relatadas pequenas porções de duplicação como polimorfismos pelo DGV, entretanto, nossa paciente apresenta uma duplicação muito mais extensa que as representadas pelo banco de dados. Portanto o possível efeito da mesma não pode ser descartado. Uma vez que a genitora possui o mesmo rearranjo, mas não apresenta clínica da síndrome, nega história familiar positiva e possui outros 5 filhos normais, consideramos que os rearranjos não sejam patogênicos, contudo não podemos excluir a possibilidade de tratar-se de penetrância incompleta.



Figura 14. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento duplicado em 1q31.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes *KIF14*, *DDX59* e *CAMSAP2*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.



Figura 15. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento duplicado em 10q23.31. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes *FIT1*, *SLC16A12*, *PANK1*, *KIF20B*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.

Paciente 17

O paciente 17 apresenta uma microduplicação de 265 kpb na posição genômica chr11: 1,946,870-2,212,488 (GRCh37/hg19) em 11p15.5 (figura 16). Esta é uma importante região de *imprinting*, onde o gene *H19* é expresso pelo cromossomo materno, e o *IGF2* pelo paterno. Sabe-se que a duplicação de genes contíguos desta região e uma falha de *imprinting* ou ausência da cópia materna podem levar a Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS). O paciente em tela, além de apresentar malformações craniofaciais compatíveis com OAVS, também apresenta um quadro de aniridia e alguns sinais de BWS, como hérnia umbilical e macrossomia. Será realizado MS-MLPA para avaliar o estado de metilação desses genes. A dosagem aumentada de *IGF2* decorrente de duplicação de origem paterna explicaria o quadro de BWS.

Ressaltamos que este achado de BWS provavelmente não está relacionado com a OAVS. A análise cromossômica por *microarray* algumas vezes permite estas descobertas, o que tem ajudado geneticistas clínicos a chegarem a um diagnóstico

mais preciso. Neste caso, o paciente apresenta ambas as síndromes, que não estão relacionadas.



Figura 16. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento duplicado em 11p15.5. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representado o gene *IGF2*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.

Paciente 26

O Paciente 26 possui uma duplicação de 847 kbp na posição genômica chr12:21,969,669-22,817,436 (GRCh37/hg19) na região 12p12.1 (figura 17). Nesta região encontram-se os genes listados na tabela abaixo com suas respectivas funções biológicas (Tabela 5). Os pais do paciente ainda não foram testados.

Tabela 5. Lista dos genes presentes na região duplicada em 12q12.1 e suas funções biológicas.

Genes	Função biológica
<i>ABCC9</i>	Gene cuja proteína codificada é um membro da superfamília de transportadores de ATP. Este tipo de proteína transporta várias moléculas através das membranas celulares, e está envolvida nos canais de potássio sensíveis a ATP nos músculos esquelético, cardíaco e tecido vascular. Mutações neste gene são associadas a cardiomiopatia tipo 1 e osteocondrodysplasia hipertrifóica (OMIM 601439).

Genes	Função biológica
<i>CMAS</i>	Faz parte de uma família de açúcares de nove carbonos localizados na superfície celular que tem um importante papel na determinação da função e estrutura de muitos tecidos animais, principalmente na comunicação célula-célula e respostas imunes (OMIM 603316).
<i>ST8SIA1</i>	É um tipo gangliosídeo conhecido por seu papel na adesão e crescimento em culturas de células malignas (OMIM 601123).
<i>C2CD5</i>	Codifica uma proteína de domínio cálcio-dependente (http://genome.ucsc.edu/).
<i>ETNK1</i>	Codifica uma quinase etanolamina que catalisa o primeiro passo na biossíntese de fosfatidiletanolamina, sendo este um fosfolípido de característica polar, iônica e possui uma ponte fosfodiéster, que liga o esqueleto do glicerol a algumas bases nitrogenadas (OMIM 609858).

A uma distância de 867 kbp, a jusante da duplicação descrita neste paciente, está localizado o *SOX5*, um gene da família de mediadores do desenvolvimento, e como já mencionado anteriormente, mutações em genes mediadores do desenvolvimento são causa importante de malformações congênitas. Utilizando técnicas histológicas e análise de expressão gênica Smits e colaboradores (53) concluíram que *SOX5* e *SOX6* são *enhancers* redundantes de funções condroblásticas, controlando tanto a expressão de genes da matriz extracelular quando da proliferação celular. Portanto, são genes que estão envolvidos no processo de formação de tecidos cartilagosos, como as orelhas. Foi demonstrado que alterações em regiões acentuadoras do gene *SOX9*, localizadas até 1Mb de distância do gene podem influenciar na sua expressão (54). Mecanismo semelhante foi descrito também para o gene *SOX10* (55). A desregulação a distância do gene *SOX5* pela duplicação na paciente aqui descrita poderia explicar o fenótipo de OAVS.

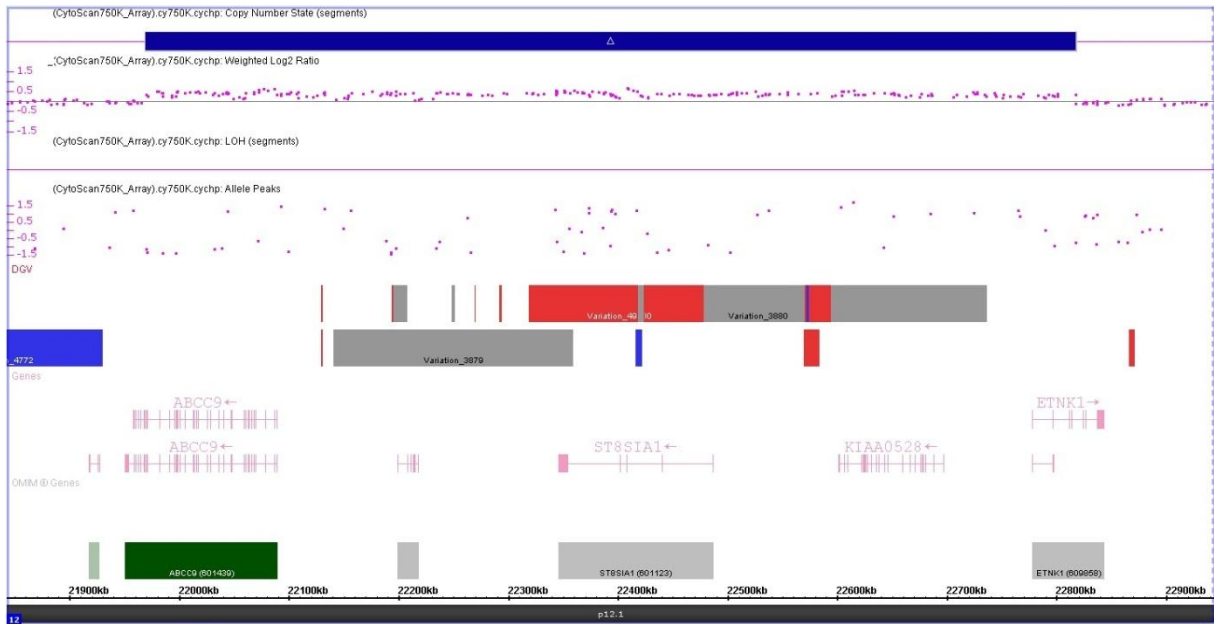


Figura 17. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento deletado em 12p12.1. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa estão representados os genes *ABCC9*, *ST8SIA1*, *KIAA*, *ETNK1*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.

Paciente 27

No paciente 27 foi observada uma microduplicação na posição genômica chr6:106,566,922-106,942,362 na região 6q21, compreendendo 375 kbp (figura 18). O único gene presente nesta região é o *ATG5* que, em células de mamíferos, estão em altos níveis nas vias apoptóticas, pois codificam proteínas autofágicas. Ainda não se sabe se proteínas ATG são responsáveis também por regular a sinalização celular (56). Apesar de controles de vias de apoptose fazerem parte de importantes processos celulares, principalmente durante a embriogênese, não podemos confirmar a associação desta microduplicação com o fenótipo de OAVS. Os pais do paciente ainda não foram testados.

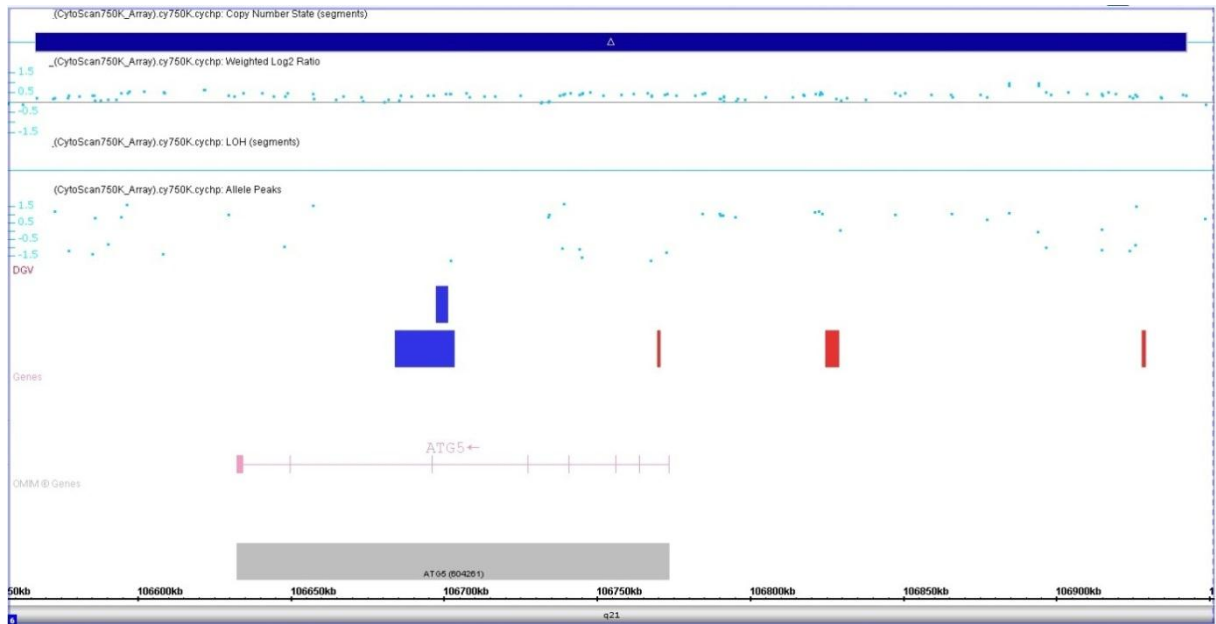


Figura 18. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento deletado em 6q21. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representado o gene *ATG5*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição.

Neste estudo, dois pacientes, descritos abaixo, apresentaram uma única região grande de perda de heterozigose (LOH). A LOH é um mecanismo que está relacionado com homozigose de genes recessivos, possivelmente decorrente de uma dissomia uniparental segmentar (UPD).

Paciente 5

Na Paciente 5 foi identificada uma perda de heterozigose de 27 Mb na região genômica chr3:30,537,682-57,921,506 (Build37/hg19) em 3p26.3-p14.3 (figura 19). Por se tratar de uma vasta área, aproximadamente um terço do braço curto do cromossomo 3, muitos genes estão envolvidos. Destacamos o gene *WNT5A*, que pertence a família *Wingless* (WNT), que produzem moléculas sinalizadoras parácrinas, ou seja, são secretadas no espaço que circunda a célula. São fatores altamente conservados no reino animal, e participam de processos de desenvolvimento eixo dorsoventral, e formação do cérebro, músculos, das gônadas e dos rins. Mutações que codificam estas moléculas podem levar a comunicação anormal entre células, especialmente durante a embriogênese e malformações

craniofaciais (57). Esta perda de grande extensão será investigada pelo sequenciamento de exoma.

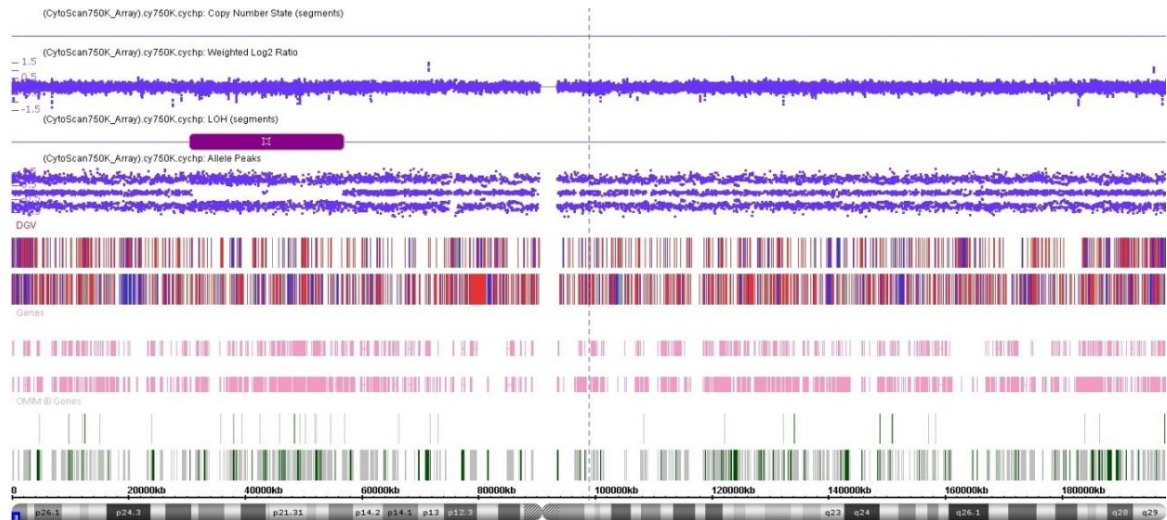


Figura 19. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). A linha 1 mostra os CNVs, a linha 2 mostra as sondas não polimórficas. O retângulo roxo (Linha 3) representa o segmento com perda de heterozigose em 3p26.3-p14.3. A linha 4 representa as sondas polimórficas (SNPs).

Paciente 23

O paciente 23 apresenta uma perda de heterozigose de 20,257 kbp na posição genômica chr12:72,248,741-92,506,140 (GRCh37/hg19) na região 12q15-q22 (figura 20). Nesta região, o banco de dados DECIPHER descreve um paciente (276581) com esta região deletada e microtia, pequeno lóbulo auricular, microftalmia e coloboma de nervo óptico. Esta região possui algumas dezenas de genes, entretanto chamamos a atenção para o gene *DUSP6* que regula outros genes da família das MAP quinases, que entre outras funções, regulam a diferenciação e proliferação celular, e o *OTOGL*, que é responsável pela produção e função de estruturas da orelha interna, e pacientes homozigotos ou heterozigotos compostos para mutações nesse gene apresentam perda de audição sensorineural não-sindrômica. (52, 58).

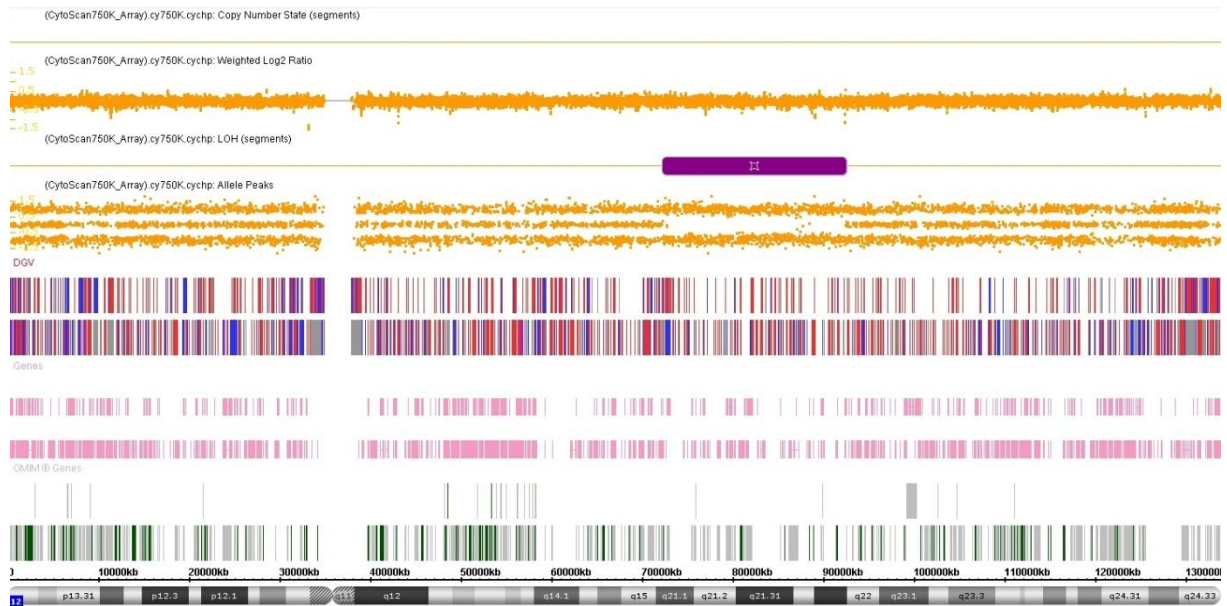


Figura 20. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). A linha 1 mostra os CNVs, a linha 2 mostra as sondas não polimórficas. O retângulo roxo (Linha 3) representa o segmento com perda de heterozigose em 12q15-q22. A linha 4 representa as sondas polimórficas (SNPs).

A dissomia uniparental é um defeito de herança, onde ambos cromossomos homólogos, ou segmentos de homólogos, no genoma de um indivíduo originam-se de apenas um dos pais. A UPD possui três importantes efeitos associados a doenças: a primeira, por perturbar a herança das modificações epigenéticas origem-específica, causando doenças de *imprinting*; a segunda, por converter alelos deletérios transmitido de um pai heterozigoto para um status homozigoto, levando a uma doença recessiva, e a terceira por uma trissomia incompleta, resultando em um mosaicismo residual (59). Sabe-se que a UPD contribui para doenças genéticas raras e sua detecção é um importante passo para identificação causal de síndromes.

King e colaboradores (60) implementaram um método estatístico para detectar UPD em trios (pai, mãe e filho). Eles testaram 1.057 trios a partir de um banco de dados de SNPs de doenças raras, e encontraram uma frequência maior de perda de heterozigose nestes trios do que na população em geral, sugerindo que a maioria desses eventos são patogênicos.

Paciente 24

O paciente 24 possui trissomia do 21 – Síndrome de Down, e não apresentou outras alterações que pudessem ser associadas a OAVS (figura 21). Normalmente, a trissomia do cromossomo 21 não está associada a outras síndromes como OAVS.

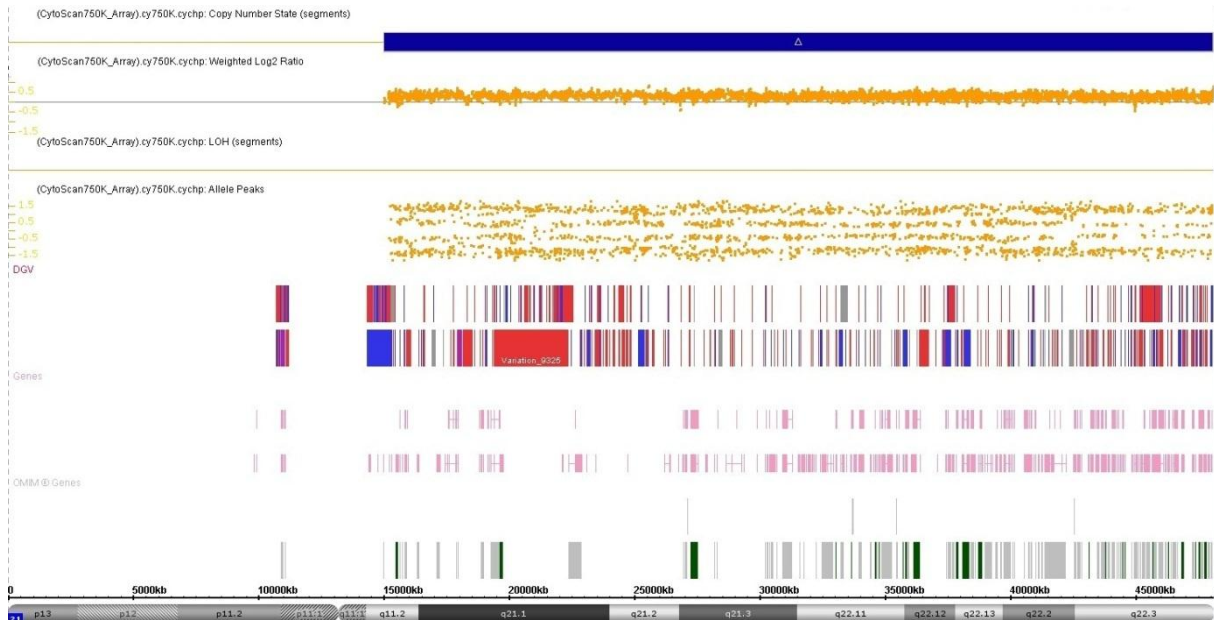


Figura 21. Resultado do array affymetrix 750k no paciente 24, mostrando que o paciente tem Síndrome de Down.

Os pacientes 17, 20 e 22 apresentaram uma mesma região duplicada em 1p36.33 nas posições genômicas chr1:3,252,516-3,527,569 (275 kbp), chr1:3,191,784-3,540,374 (349 kbp) e chr1:3,357,057-3,614,605 (288 kbp), respectivamente que estão descritos vários segmentos de CNVs polimórficas não patogênicas (figura 22). A paciente 20 tem dois irmãos também afetados e portadores da mesma CNV em 1p36.32.

Por tratar-se de CNV provavelmente polimórfica, esses pacientes foram considerados normais pela análise cromossômica por microarray. No entanto, esse polimorfismo apresentou uma frequência elevada em nossa amostra (1:7) quando comparado com o nosso banco de dados, em que a alteração está presente em 1:46 indivíduos. Esse banco é constituído tanto de pacientes casos com diagnósticos diversos quanto de controles, ou seja, indivíduos sem patologias. Os pacientes

analisados pela plataforma Agilent serão revistos posteriormente para avaliar a presença deste CNV específico.

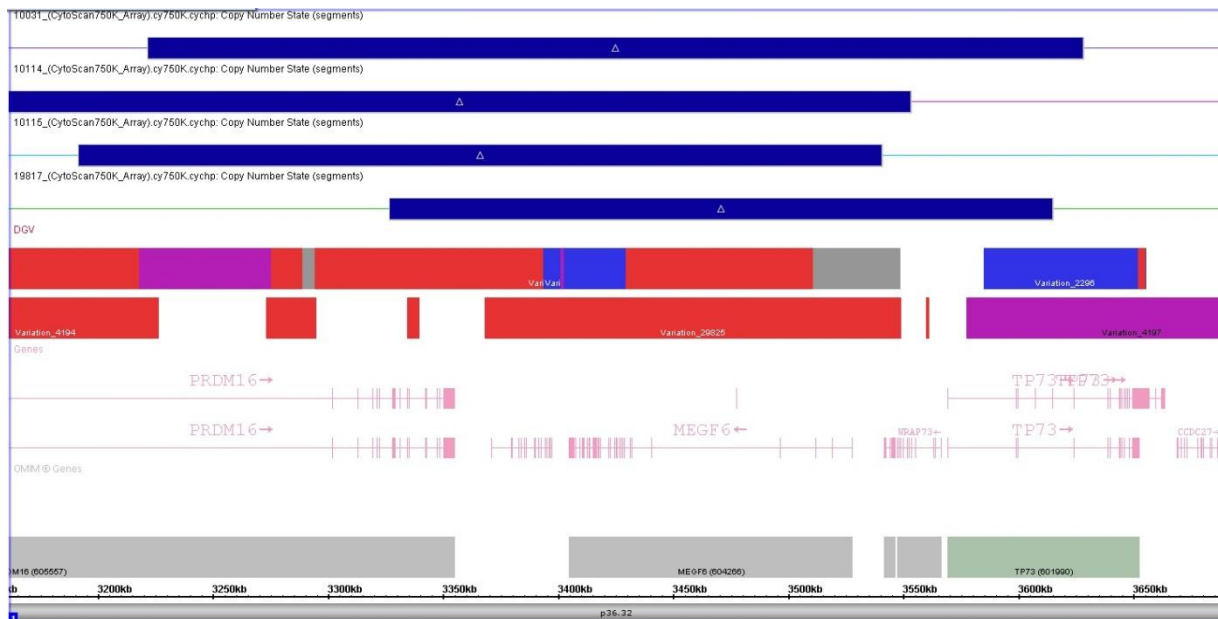


Figura 22. Resultado da análise cromossômica por microarray na plataforma Cytoscan 750k (Affymetrix). As quatro primeiras linhas (retângulos azuis) representam o segmento duplicado na região 1p36.32-p36.32, descrita como CNV.

Nas regiões acima descritas estão localizados os genes *PRDM16*, *ARHGEF16*, *MEGF6* e *TP73*. Dentre os quatro genes, um estudo com *PRDM16* em camundongos, revela o papel deste gene na morfogênese craniofacial, do sistema nervoso central e de membros (61). Podemos dizer que um determinado conjunto de variação de número de cópias pode alterar a expressão gênica, e neste caso, especificamente, a morfologia craniofacial. Apesar destas regiões terem sido descritas como polimórficas, sabemos que uma combinação de polimorfismos pode alterar vias metabólicas capazes de afetar o desenvolvimento embrionário, como por exemplo os polimorfismos envolvidos em vias de detoxificação (62). É possível ainda que esta alteração atue como fator modificador ou de predisposição a OAVS. Estas interações polimórficas muitas vezes explicam a expressividade variável, a penetrância incompleta e o valor do efeito ambiental como modulador neste tipo de doença.

Uma explicação para o efeito imprevisível dos CNVs no fenótipo é que o status de doença geralmente envolve estas regiões de variações de cópias que

contém genes dose-dependentes ou regulatórios. A microduplicação 1p36.32-33, encontrada em três pacientes mais dois irmãos ressalta a importância da avaliação do número de cópias (CNVs). Southard e colaboradores (36) enfatizam que embora os CNVs, normalmente, não produzam fenótipos patológicos, alguns, especialmente os de grande tamanho, podem estar associados a doenças que possuem grande espectro de variabilidade de expressão, como por exemplo as malformações congênitas e doenças psiquiátricas. Esta variação no número de cópias pode estar presente em regiões regulatórias, suprimindo ou superexpressando genes. Ainda não se sabe quais combinações levariam a fenótipos patológicos, e por isso, precisam ser melhor estudadas. Um grande desafio nos dias atuais é conseguir distinguir entre as variações normais presentes na população geral, àquelas que podem ter um efeito patogênico.

A figura 23 representa os rearranjos relatados na literatura e os encontrados em nossas análises. As marcações à esquerda representam os dados da literatura, e aquelas da direita representam os dados deste trabalho. Podemos observar pela figura a baixa recorrência de rearranjos, e a grande heterogeneidade da síndrome.

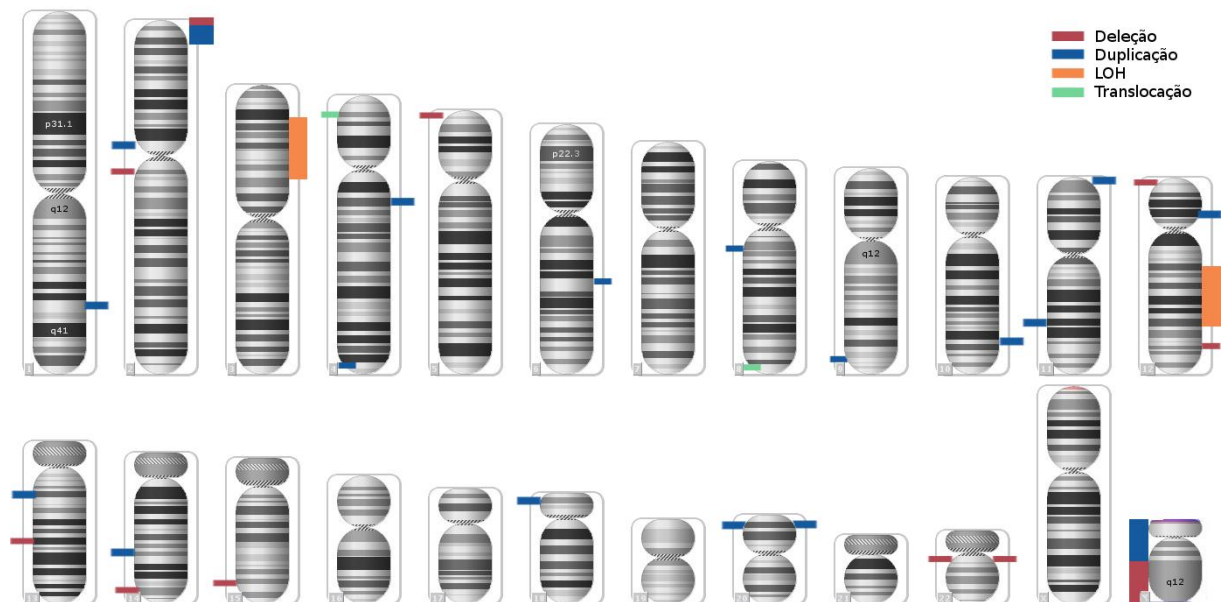


Figura 23. Idiograma representando os rearranjos descritos na literatura (à esquerda) e os encontrados neste trabalho (à direita).

Avaliando os trabalhos já descritos na literatura, conclui-se que os rearranjos mais recorrentes ocorrem nas regiões 14q23; 14q32 e 22q11 (7, 18, 21, 22, 23, 24, 29, 63, 64).

Rooryck e colaboradores (63) avaliaram 86 pacientes com OAVS, sendo que 73 deles não apresentaram rearranjos, e 13 apresentaram duplicações/deleções, representando 15% da amostra. Dentre esses microrrearranjos, dois eram *de novo*, quatro rearranjos herdados paternalmente, três maternalmente, um paciente apresentou dois rearranjos, um de herança materna e o outro paterna, e em um paciente não foi possível analisar os pais. Em nossa amostra, este achado foi de 46%, 12 em 26 casos. Esta discrepância de resultados pode ser explicada porque as nossas análises foram realizadas numa plataforma de *array* de maior densidade e que possui sondas de SNPs, permitindo também a detecção de regiões de perda de heterozigose. Os rearranjos observados em nosso trabalho são inéditos com exceção da deleção do 22.

5. CONCLUSÃO

- 1) Em nosso estudo, doze dos 26 casos (46%) apresentaram alteração cromossômica detectada por *array* possivelmente associadas à OAVS. No caso do MLPA, nenhum paciente apresentou microrrearranjo. Os dados do *array* confirmam que a recorrência de microrrearranjos na OAVS é baixa e, portanto, estudos direcionados para busca de rearranjos patogênicos em regiões candidatas não é efetiva.
- 2) Dois pacientes apresentaram grandes segmentos de perda de heterozigose, possivelmente decorrentes de UPD segmentar. Esses achados ressaltam a importância da inclusão de SNPs na análise cromossômica por *microarray* e o sequenciamento das regiões de homozigose pode revelar novos genes candidatos para a OAVS.
- 3) A identificação de uma paciente com deleção de *TBX3* em 12q23 reforça a importância da família de genes *TBX* na etiologia da OAVS, uma vez que o gene *TBX1* já havia sido proposto como candidato em 22q11.
- 4) Um paciente apresentou duplicação na região da síndrome de Beckwith-Wiedemann. Como não há descrição de associação da síndrome de Beckwith-Wiedemann com malformações típicas de OAVS não podemos correlacionar esse achado com as malformações craniofaciais do paciente.
- 5) Penetrância incompleta pôde ser observada na família do paciente 11, pois o gene alterado pela duplicação já foi descrito como o causador da Síndrome aurículo-condilar, e o pai possui a mesma alteração sem apresentar fenótipo. Nos demais casos de alterações herdadas, o fato do rearranjo ser herdado de um dos genitores não permite excluí-lo como possível causa da OAVS no paciente e penetrância incompleta no genitor.
- 6) CNVs no segmento 1p36.32 já caracterizada como polimórficas, apresentaram uma frequência maior em nossos pacientes (1:7) do que na população geral de nosso banco de dados (1:46). Ainda não está clara qual a real contribuição dos CNVs para a variabilidade genética, no entanto, alguns estudos têm descrito associação entre a variação de cópia de regiões de DNA e susceptibilidade a doenças.

- 7) Os microrrearranjos observados no presente trabalho são os primeiros a serem descritos, com exceção da deleção do 22q11.2 e da duplicação em 20p12.2. Estes resultados confirmam o caráter heterogêneo da síndrome.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lin HJ, Owens TR, Sinow RM, Fu Jr PC, DeVito A *et al.* (1998) Anomalous inferior and superior venae cavae with oculoauriculovertebral defect: review of Goldenhar Complex and malformations of left-right asymmetry. *Am J Med Genet* 75:88-94.
2. Hartsfield JK (2007) Review of the etiologic heterogeneity of the óculo-auriculo-vertebral spectrum (Hemifacial Microsomia). *Orthod Craniofacial Res* 10:121-128.
3. Goldenhar M (1952) Associations malformatives do l'oeil et del'oreille, en particulier le syndrome dermoide epidulbaire – appendices auriculaires – fistula auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J Genet Hum* 1:243–82.
4. Gorlin RJ and Pindborg JJ (1960) *Syndromes of the Head and Neck*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill. pp. 546–52.
5. Gorlin RJ (2001) Branchial arch and oro-acral disorders. In: Gorlin JJ, Cohen Jr MM, Hennekam RC, editors. *Syndromes of the head and neck*. London: Oxford University Press; p. 790-97.
6. Pachajoa H, Rodríguez CA, Isaza C (2010) Hemifacial microsomia (oculo-auriculo-vertebral spectrum) in Pre-hispanic Tumaco-La Tolita ceramic culture (300b.C. to 600d.C.). *Arch Soc Esp Oftalmol* 85(4):154-155.
7. Kelberman D, Tyson J, Chandler DC, McInerney AM, Slee J *et al.* (2001) Hemifacial microsomia: progress in understanding the genetic basis of a complex malformation syndrome. *Hum Genet* 109: 638–45.
8. Gordon CT, Vuillot A, Marlin S, Gerkes E, Henderson A *et al.* (2013) Heterogeneity of mutational mechanisms and modes of inheritance in auriculocondylar syndrome. *J Med Genet* 50:174-186.
9. Stoll C, Roth MP, Dott B, Bigel P (1984) Discordance for Skeletal and cardiac defect in monozygotic twins. *Acta Genet Med Gemellol*, 33: 501-504.
10. Werler MM, Sheehan JE, Hayes C, Padwa BL, Mitchell AA *et al.* (2004). Demographic and reproductive factors associated with hemifacial microsomia. *Cleft Palate Craniofac J* 41:494–50.
11. Le Douarin NM, Dupin E (2012) The neural crest in vertebrate evolution. *Curr Opin Genet Dev* 22(4):381-9. Review.
12. Engleka KA, Lang D, Brown CB, Antonucci NB, Epstein JA (2008) Neural Crest Formation and Craniofacial Development. In: Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris AJ, editors. *Inborn errors of development*. 2nd ed Oxford University Press; New York; Oxford. pp. 69–78.

13. Noden DM, Trainor PA (2005) Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat* 207(5):575–601.
14. Farra C, Yunis K, Mikati M, Yazbeck N, Majdalani M *et al.* (2010) Goldenhar syndrome associated with prenatal maternal Fluoxetine ingestion: Cause or coincidence? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol Jul*;88(7):582-5.
15. Gabbett MT, Robertson SP, Broadbent R, Aftimos S, Sachdev R *et al.* (2008) Characterizing the oculoauriculofrontonasal syndrome. *Clin Dysmorphol* 17(2):79-85.
16. Aizenbud D, Shoham NV, Constantini S, Nevo N, Arush MB *et al.* (2013) Goldenhar syndrome and medulloblastoma: a coincidental association? The first case report. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery*: 1-6.
17. Rollnick BR, Kaye CI (1983) Hemifacial microsomia and variants: pedigree data. *Am J Med Genet* 15:233–53.
18. Xu J, Fan YS, Siu VM (2008) A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide *array* CGH: is this a candidate region for the syndrome? *Am J Med Genet A*. Jul 15;146A(14):1886-9.
19. Raft S, Nowotschin S, Liao J, Morrow BE (2004) Suppression of neural fate and control of inner ear morphogenesis by Tbx1. *Development* 131:1801–181.
20. Alast F and Camp G Van (2009) Genetics of microtia and associated syndromes. *J Med Genet* 46;361-369.
21. Lafay-Cousin L, Payne E, Strother D *et al.* (2009) Goldenhar phenotype in a child with distal 22q11.2 deletion and intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor. *Am J Med Genet Part A* 149A:2855-2859.
22. Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z *et al.* (2011) Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *Am J Med Genet Part A* 155:1623-1633.
23. Ou Z, Martin DM, Bedoyan JK, Cooper ML, Chinault AC *et al.* (2008) Branchiootorenal Syndrome and Oculoauriculovertebral Spectrum Features Associated With Duplication of SIX1, SIX6, and OTX2 Resulting From a Complex Chromosomal Rearrangement. *Am J Med Genet Part A* 146A:2480–2489.
24. Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Dulcet LA, Rodríguez-Santiago B, Garcia-Miñaur S *et al.* (2013) Autosomal dominant oculoauriculovertebral spectrum and 14q23.1 microduplication. *Am J Med Genet A* Aug;161A(8):2030-5.

25. Higashi T, Ikeda T, Shirakawa R, Kondo H, Kawato M (2008) Biochemical characterization of the Rho GTPase-regulated actin assembly by diaphanous-related formins, mDia1 and Daam1, in platelets. *J Biol Chem* Mar 28;283(13):8746-55.
26. Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH *et al.* (2006) PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* Jun 2;125(5):915-28.
27. Lüdecke HJ, Schmidt O, Nardmann J, von Holtum D, Meinecke P *et al.* (1999) Genes and chromosomal breakpoints in the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8. *Hum Genet* Dec;105(6):619-28.
28. Fischer S, Ludecke HJ, Wieczorek D, Bohringer S, Gillessen-Kaesbach G *et al.* (2006) Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of BAPX1 in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Mol Genet* 15:581–7.
29. Rooryck C, Stef M, Burgelin I, Simon D, Souakri N *et al.* (2009) 2.3 Mb terminal deletion in 12p13.33 associated with oculoauriculovertbral spectrum and evaluation of WNT5B as a candidate gene. *Europ J Med Genet* 1–4.
30. Logan CY and Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781–810.
31. Brugmann SA, Goodnough LH, Gregorieff A, Leucht P, Berge D *et al.* (2007) Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face. *Development* 134: 3283–3295.
32. Ala-Mello S, Siggberg L, Knuutila S, von Koskull H, Taskinen M *et al.* (2008) Further Evidence for a Relationship Between the 5p15 Chromosome Region and the Oculoauriculovertbral Anomaly. *Am J Med Genet Part A*. 146A:2490–2494.
33. Wharton KA Jr, Zimmermann G, Rousset R, Scott MP *et al.* (2001) Vertebrate proteins related to *Drosophila* Naked Cuticle bind Dishevelled and antagonize Wnt signaling. *Dev Biol* Jun 1;234(1):93-106.
34. Rieder MJ, Green GE, Park SS, Stamper BD, Gordon CT *et al.* (2012) A human homeotic transformation resulting from mutations in PLCB4 and GNAI3 causes auriculocondylar syndrome. *Am J Hum Genet* May 4;90(5):907-14.
35. Kido Y, Gordon CT, Sakazume S, Bdira EB, Dattani M *et al.* (2013) Further characterization of atypical features in auriculocondylar syndrome caused by recessive PLCB4 mutations. *Am J Hum Genet Part A* 161A:2339-2346.

36. Southard AE, Edelmann LJ, Gleb BD (2012) Role of copy number variants in structural birth defects. Review. *Pediatrics* Vol 129 (4): 755-763.
37. Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N *et al* (2012) Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* Oct 4;367(14):1321-31.
38. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N (2013) Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet* Nov;84(5):415-21.
39. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA *et al.* (2005) Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet* Jul;37(7):727-32.
40. Digilio MC, McDonald-McGinn DM, Heike C, Catania C, Dallapiccola B *et al.* (2009) Three patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and microdeletion 22q11.2. *Am J Med Genet Part A* 149A: 2860-2864.
41. Gao S, Li X, Amendt BA (2013) Understanding the role of Tbx1 as a candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep.* Dec;13(6):613-21.
42. Arnold JS, Braunstein EM, Ohyama T, Groves AK, Adams JC *et al.* (2006) Tissue-specific roles of Tbx1 in the development of the outer, middle and inner ear, defective in 22q11DS patients. *Human Molecular Genetics* 15(10):1629–1639.
43. King M, Arnold JS, Shanske A, Morrow BE (2006) T-genes and limb bud development. *Am J Hum Genet Part A: 140A* (13): 1407-1413.
44. Bamshad M, Le T, Watkins WS, Dixon ME, Kramer BE *et al.* (1999) The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am J Hum Genet* Jun;64(6):1550-62.
45. Jankowski MP, Cornuet PK, McIlwrath S, Koerber HR, Albers KM (2006) SRY-box containing gene 11 (Sox11) transcription factor is required for neuron survival and neurite growth. *Neuroscience* Dec 1;143(2):501-14.
46. Aviram-Goldring A, Fritz B, Bartsch C, Steuber E, Daniely M *et al.* (2000) Molecular cytogenetic studies in three patients with partial trisomy 2p, including CGH from paraffin-embedded tissue. *Am J Med Genet* 6;91(1):74-82. Review.
47. Zou YS, Van Dyke DL, Ellison JW (2007) Microarray comparative genomic hybridization and FISH studies of an unbalanced cryptic telomeric 2p deletion/16q duplication in a patient with mental retardation and behavioral problems. *Am J Med Genet A* 1;143(7):746-51.

48. Lo-Castro A, Giana G, Fichera M, Castiglia L, Grillo L *et al.* (2009) Deletion 2p25.2: a cryptic chromosome abnormality in a patient with autism and mental retardation detected using aCGH. *Eur J Med Genet* 52(1):67-70.
49. Nakagawa T, Tanaka Y, Matsuoka E, Kondo S, Okada Y *et al.* (1997) Identification and classification of 16 new kinesin superfamily (KIF) proteins in mouse genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(18):9654-9.
50. Tanaka N, Meng W, Nagae S, Takeichi M (2012) Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(49):20029-34.
51. Shamseldin HE, Rajab A, Alhashem A, Shaheen R, Al-Shidi T *et al.* (2013) Mutations in DDX59 implicate RNA helicase in the pathogenesis of orofacioidigital syndrome. *Am J Hum Genet* 93(3):555-60.
52. www.genome.uscs.edu – acessado em Janeiro/2014
53. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng J *et al.* (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* 1: 277-290.
54. Gordon CT, Tan TY, Benko S, Fitzpatrick D, Lyonnet S *et al.* (2009) Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease. *J Med Genet* Oct;46(10):649-56. Review.
55. Antonellis A, Bennett WR, Menhenniott TR, Prasad AB, Lee-Lin SQ *et al.* (2006) Deletion of long-range sequences at Sox10 compromises developmental expression in a mouse model of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Hum Mol Genet* Jan 15;15(2):259-71.
56. Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Mishall P, Sahu S, Singh R (2013) Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat Commun* 4:2799.
57. Person AD, Beiraghi S, Sieben CM, Hermanson S, Neumann AN (2010) WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome. *Dev Dyn.* Jan;239(1):327-37.
58. Yariz KO, Duman D, Seco CZ, Dallman J, Huang M *et al.* (2012) Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* Nov 2;91(5):872-82.
59. Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC (2010) Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet Part C* 154C(3):329-334.
60. King DA, Fitzgerald TW, Miller R, Canham N, Clayton-Smith J *et al.* (2013) A novel method for detecting Uniparental Disomy from trio genotypes identifies a significant excess in children with developmental disorders. *Genome Res* Dec 19.

61. Bjork BC, Turbe-Doan A, Prysak M, Herron BJ, Beier DR (2010) Prdm16 is required for normal palatogenesis in mice. *Hum Mol Genet* 19(5):774-89.
62. Shi M, Christensen K, Weinberg CR, Romitti P, Bathum L *et al.* (2007) Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet* Jan;80(1):76-90.
63. Rooryck C, Souakri N, Cailley D, Bouron J, Goizet C *et al.* (2010) *Array*-CGH analysis of a cohort of 86 patients with oculoauriculovertebral spectrum. *Am J Med Genet Part A* 152A:1984-1989.
64. Dos Santos PA, de Oliveira SF, Freitas EL, Safatle HP, Rosenberg C *et al.* (2014) Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Am J Med Genet A* 164(2):551-3.
65. Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S *et al.* (2003) Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet* Oct 25;362(9393):1366-73.
66. <http://DECIPHER.sanger.ac.uk/> - acessado em Janeiro/2014
67. www.mlpa.com – acessado em Janeiro/2014

APÊNDICE A

Caracterização da amostra e descrição clínica

Paciente 1

Data de nascimento: 21/06/2000

É a segunda filha de casal jovem não consanguíneo. Apresenta surdez condutiva, atraso no desenvolvimento motor e afasia, ptose palpebral à esquerda, orelha direita displásica, retrognatia discreta, frouxidão ligamentar, dedos hiperextensíveis e afilados, prolapso do folheto mitral anterior sem disfunção valvar.

A análise por *array*-CGH mostrou uma microdeleção *de novo* de 2,500 kbp na posição genômica chr22:17,276,772-19,770,655 (Build36/hg18) na região 22q11.21 que resultou em uma publicação científica na revista American Journal of Human Genetics (Anexo III).



Figura 24. Paciente 1 com OAVS e del22q11. Possui microssomia hemifacial e displasia da orelha direita.

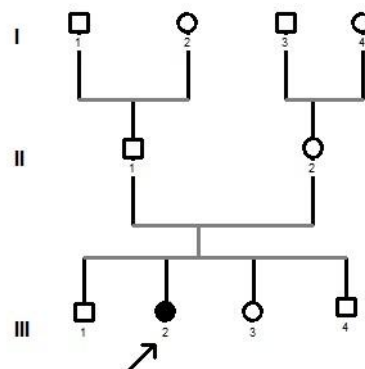


Figura 25. Heredograma da família da paciente 1. O círculo preenchido em preto representa a propósita.

Paciente 2

Data de nascimento: 27/11/2007

Segunda filha de casal jovem não consanguíneo. Apresenta malformação do pavilhão auricular bilateral, sendo o orifício direito em fundo cego. Apresenta paralisia facial à direita. Parótidas de tamanho reduzido, direita menor que esquerda, e ausência de glândula sublingual direita.

A análise por *array* mostrou uma microdeleção *de novo* de 31 kbp na posição genômica chr12:115,099,359-115,130,894 (GRCh37/hg19) na região 12q24.21



Figura 26. Paciente 2 apresenta microtia bilateral.

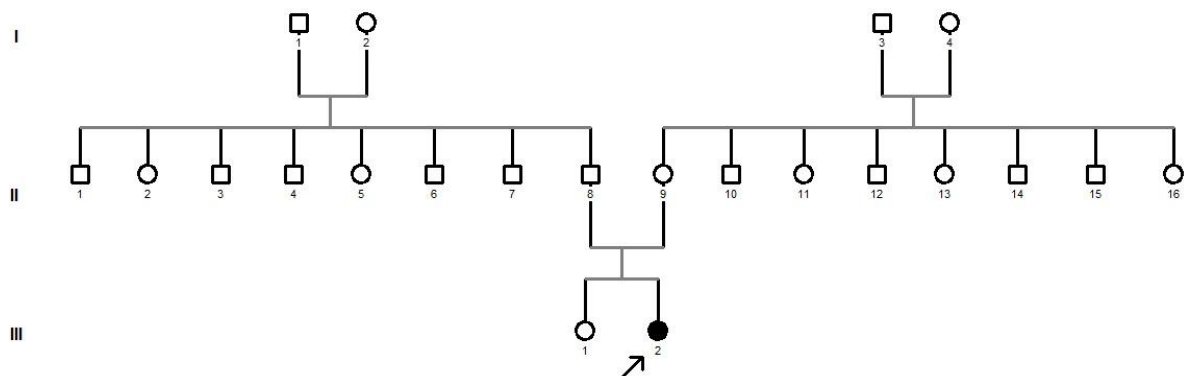


Figura 27. Heredograma da família da paciente 2. O círculo preenchido em preto representa a propósita.

Paciente 3

Data de nascimento: 27/09/2009

Primeira filha de casal jovem e não consanguíneo. Apresenta microssomia hemifacial e microtia a esquerda com atresia auricular. A mãe relatou a presença de outros afetados em sua família, originária de Crateús – CE.

A análise por *array* não mostrou alteração patogênica.



Figura 28. Paciente 3 com microssomia hemifacial e microtia a esquerda.

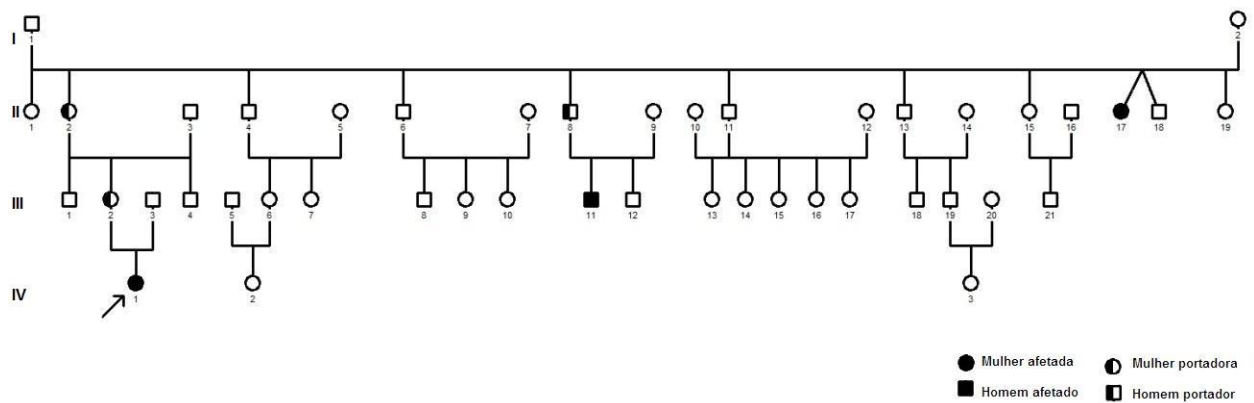


Figura 29. Heredograma da família da paciente 3. A seta indica a propósita.

Paciente 4

Data de nascimento: 06/01/2008

Segundo filho de casal jovem não consanguíneo. Apresenta microtia a esquerda, sem outras malformações. Pais negam história familiar de malformações. Não foi possível realizar *array* deste paciente devido a baixa qualidade do DNA.



Figura 30. Paciente 4 apresenta microtia a esquerda.

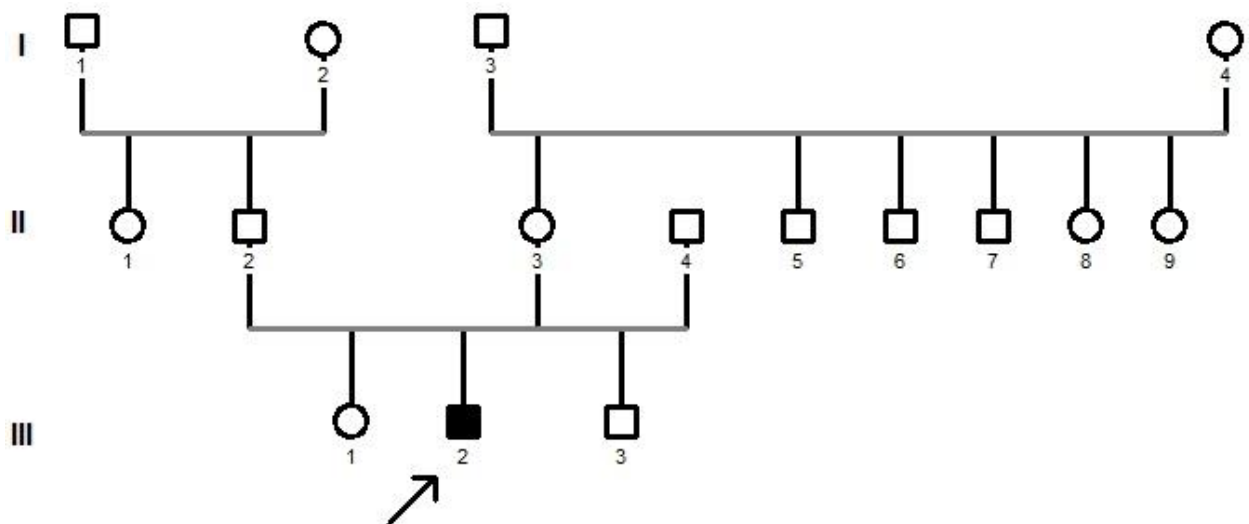


Figura 31. Heredograma da família do paciente 4. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.

Paciente 5

Data de nascimento: 13/11/2007

Segunda gestação da mãe, que foi gemelar dizigótica. Pais não consanguíneos. Mãe fez uso de corticóide na 34ª semana de gestação. Apresenta assimetria facial, apêndices pré-auriculares nas duas orelhas, estrabismo, desvio de comissura labial para a direita quando chora e dermóide epibulbar.

A análise por *array* mostrou uma perda de heterozigose na região 3p26.3-14.3 compreendendo 26 Mb, na posição genômica chr3:30,537,682-57,921,506.



Figura 32. Paciente 5 com apêndices pré-auriculares em ambas orelhas, estrabismo, assimetria facial e dermóide epibulbar.

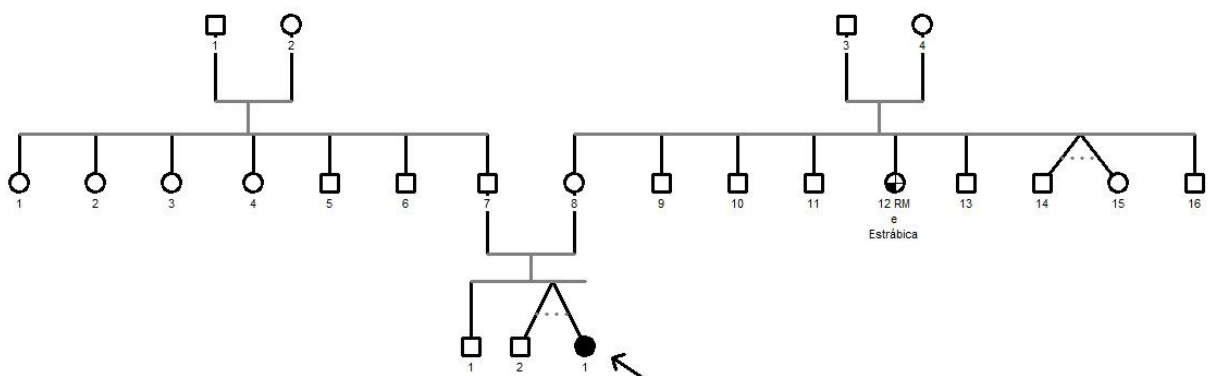


Figura 33. Heredograma da família da paciente 5. O círculo preenchido em preto representa a propósita. O círculo parcialmente preenchido representa um familiar do sexo feminino com retardo mental e estrabismo.

Paciente 6

Data de nascimento: 13/01/2010

É o quarto filho de casal de primos. Apresenta malformação dos pavilhões auriculares (microtia bilateral), hipertelorismo ocular, micropênis e olhar vago. Mãe teve diabetes gestacional. A terceira filha do casal apresenta atraso do desenvolvimento neuropsicomotor.

A análise por *array* não mostrou alteração patogênica.



Figura 34. Paciente 6 apresenta microtia bilateral e microssomia hemifacial a esquerda.

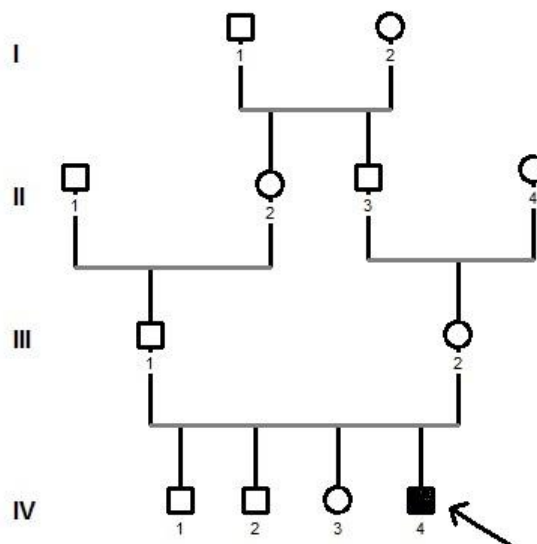


Figura 35. Heredograma da família do paciente 6. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.

Paciente 7

Data de nascimento: 02/05/2008

Terceira filha de casal não consanguíneo. Apresenta microtia e microssomia hemifacial à direita. Mãe teve infecção por toxoplasmose no sexto mês de gravidez e foi medicada com rovamicina, seguida de pirimetamina mais sulfadeazina e ácido fólico, assim como o neonato. Pais negam história familiar de malformação.

A análise por *array* não mostrou nenhuma alteração patogênica.



Figura 36. Paciente 7 apresenta microtia e microssomia hemifacial a direita.

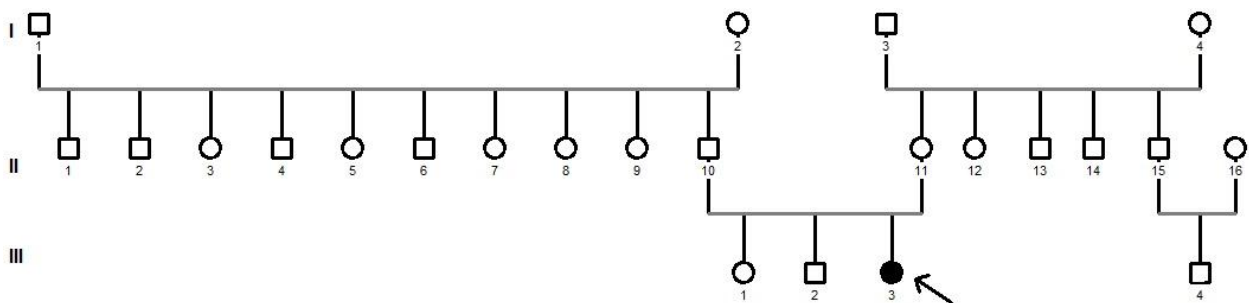


Figura 37. Heredograma da família da paciente 7. O círculo preenchido em preto representa a propósita.

Paciente 8

Data de Nascimento: 19/06/2006

Filho de pais não consanguíneos. Paciente com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, distúrbios de comportamento e epilepsia. Apresenta assimetria facial, estrabismo, microtia e atresia do canal auditivo esquerdo pregas palmares incompletas.

A análise por *array* revelou um rearranjo cromossômico envolvendo uma região deletada e uma duplicada, ambas *de novo*, nas posições genômicas chr2:12,770-203,523 de 190 kbp e chr2:203,625-24,853,867 (GRCh37/hg19) de 24,650 kbp, respectivamente, na região 2p23.3-p25.3.



Figura 38. Paciente 8 com microtia e atresia do canal auditivo esquerdo, assimetria facial.

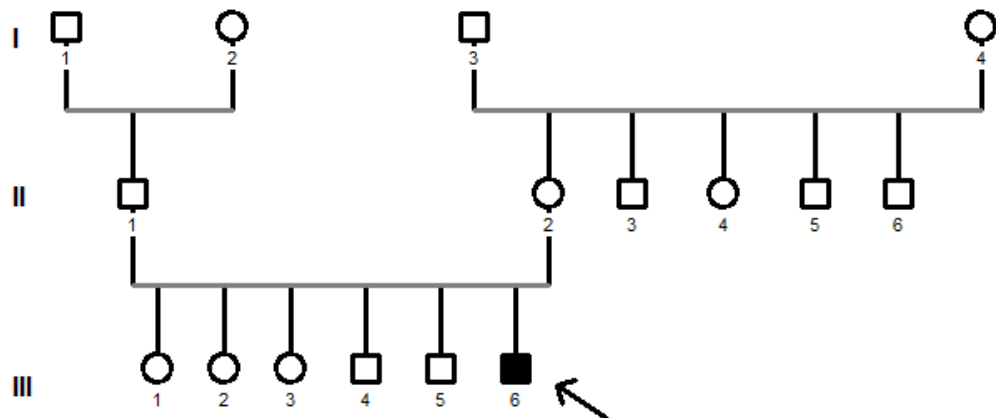


Figura 39. Heredograma da família do paciente 8. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.

Paciente 9

Data de nascimento: 26/05/1995

Filha da segunda gestação materna. Pais não consanguíneos. Apresenta assimetria facial, pálpebra esquerda mais elevada do que a direita, microtia à direita, quintos dedos ligeiramente curtos bilateralmente. O lado direito é ligeiramente menor que o esquerdo, inclusive o pé. Faz acompanhamento fonoaudiológico. Mãe tomou chás para interromper a gestação.

A análise de *array* mostrou uma microduplicação na posição genômica chr4:76,772,950-77,000,736 (GRCh37/hg19), contendo 228 kbp, na região 4q21.1. Não foi possível determinar se o rearranjo é herdado ou *de novo* porque a paciente vive com os pais adotivos.



Figura 40. Paciente 9 apresenta microtia a direita e assimetria facial.

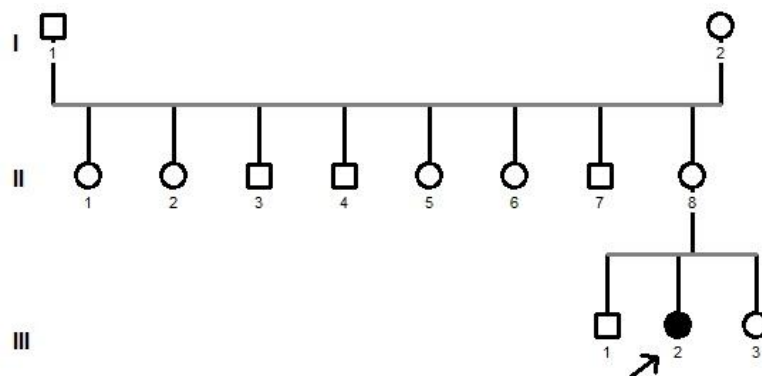


Figura 41. Heredograma da família da paciente 9. O círculo preenchido em preto representa a propósita.

Paciente 10

Data de nascimento: 09/02/2004

Primeiro filho de casal jovem e não consanguíneo. Apresenta microtia a esquerda, orelha direita com dois apêndices pré-auriculares. Família materna com história positiva para malformação de orelha. Família materna de Quiterianópolis – CE.

A análise por *array* não mostrou rearranjo patogênico.



Figura 42. Paciente 10 com microtia a esquerda e orelha direita com apêndices pré-auriculares.

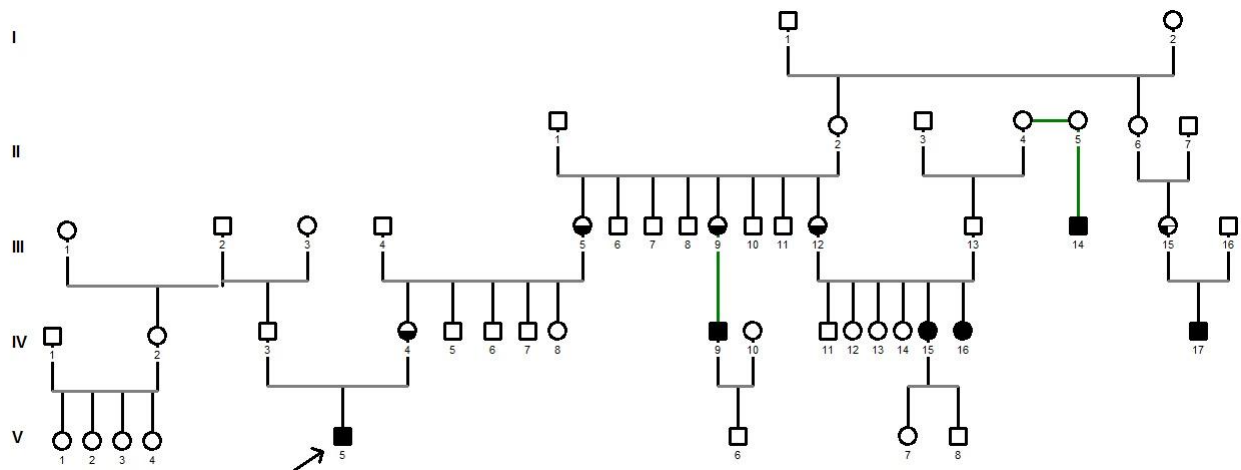


Figura 43. Heredograma da família do paciente 10. Os círculos e quadrados preenchidos em preto representam as mulheres e homens afetados, respectivamente; os círculos e quadrados parcialmente preenchidos em preto representam mulheres e homens portadores obrigatórios, respectivamente.

Paciente 11

Data de nascimento: 10/02/2011

Filho de pais não consangüíneos de meia idade. Apresenta braquicefalia com macrocefalia assimetria facial, microtia à esquerda, e criptorquidia à esquerda.

Análise por *array*-CGH mostrou uma microduplicação de aproximadamente 550 kbp na posição genômica chr20:8.794.395-9.336.676 (Build36/hg18) na região 20p12.3-p12.2, sendo o genitor também portador do mesmo rearranjo.



Figura 44. Paciente 11 apresenta microtia a esquerda, e assimetria facial.

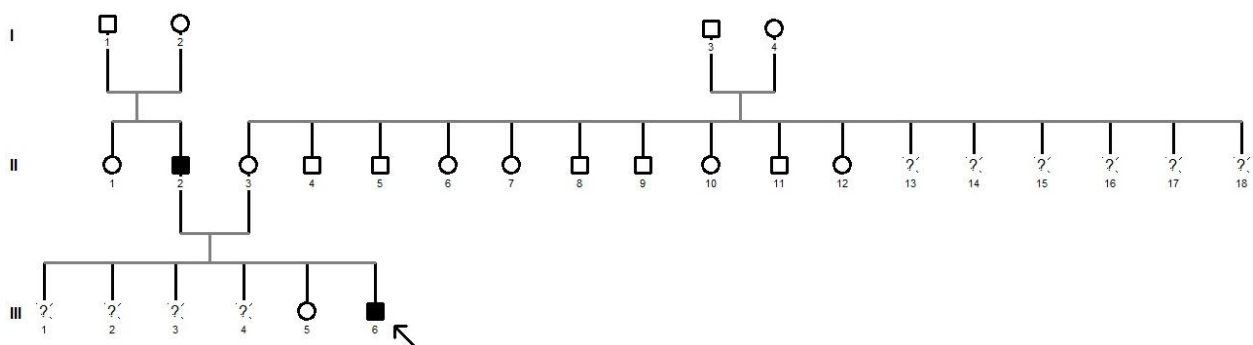


Figura 45. Heredograma da família do paciente 11. Os quadrados preenchidos em preto representam os homens afetados. A seta indica o propósito.

Paciente 12

Data de nascimento: 24/05/2005

Filha de pais não consanguíneos. Nasceu de sete meses após a mãe ficar internada toda a gestação. Apresenta apêndices pré-auriculares na orelha esquerda, hipoplasia mandibular e dificuldade de aprendizagem. Mãe nega história familiar de malformações.

Foram encontradas, por *array*, duplicações em 1q31.1 e 10q23.31, herdadas da genitora, apresentando tamanhos de 318 kbp e 516 kbp, respectivamente, e regiões genômicas chr1:200,451,451-200,769,281 e chr10:91,115,477-91,631,690(Build37/hg19).



Figura 46. Paciente 12 apresenta apêndices pré-auriculares à esquerda e hipoplasia mandibular.

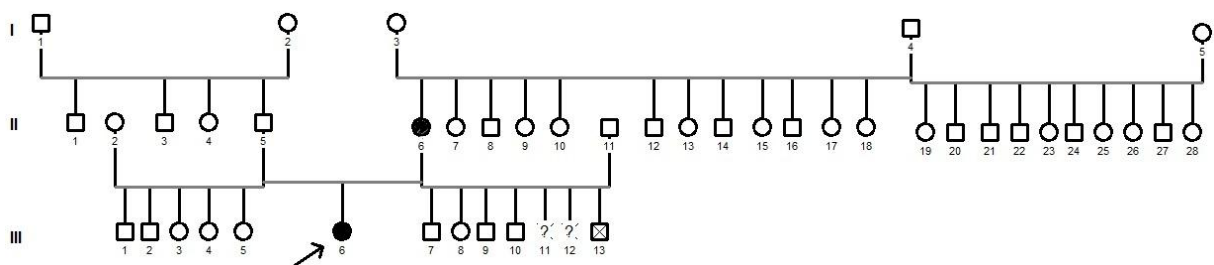


Figura 47. Heredograma da família do paciente 12. Os círculos preenchidos em preto representam a propósita e sua mãe, ambas portadoras de duplicações em 1q31.1 e 10q23.31. A mãe não apresenta fenótipo de OAVS.

Paciente 13

Data de nascimento: 26/12/1974

Filho de pais não consanguíneos. Apresenta assimetria facial acentuada com prejuízo da fala, microtia a direita com atresia aural, orelha esquerda rotada para trás sem malformações e hipoplasia mandibular à esquerda.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.



Figura 48. Paciente 13 apresenta microtia a esquerda, hipoplasia mandibular e assimetria facial.

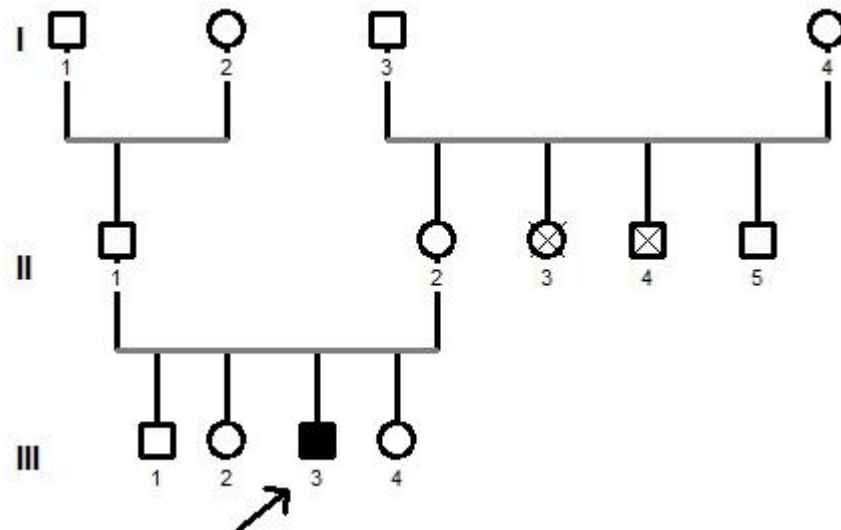


Figura 49. Heredograma da família do paciente 13. O quadrado preenchido em preto representa o propósito; os círculos e quadrados cortados por um "x" representam abortos.

Paciente 14

Data de nascimento: 27/12/1996

Segunda filha de casal jovem não consanguíneo. Apresenta malformação da orelha direita e estenose do conduto auditivo externo direito, malformação mandibular direita, assimetria facial, escoliose. O pai da propósita possui um sobrinho com apêndice pré-auricular na orelha esquerda.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.



Figura 50. Paciente 14 apresentando malformação da orelha direita e assimetria facial.

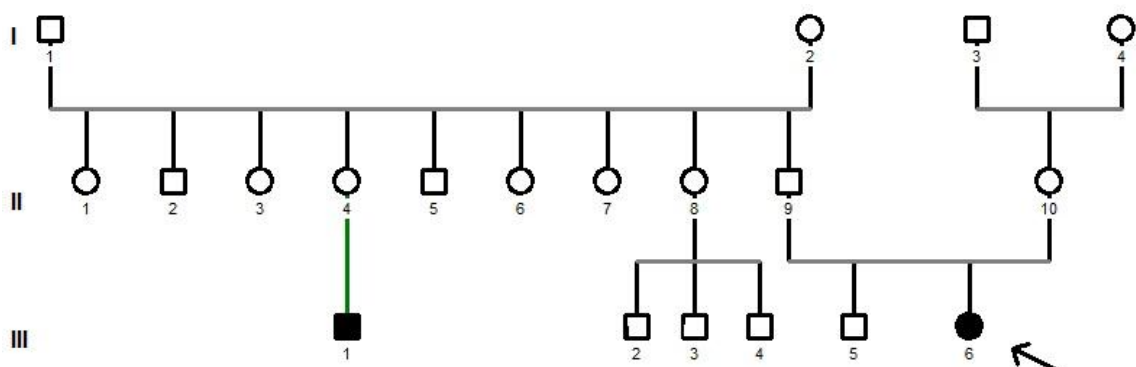


Figura 51. Heredograma da família da paciente 14. O círculo e o quadrado preenchidos em preto representam a propósita e um familiar do sexo masculino afetado, respectivamente.

Paciente 15

Data de nascimento: 22/07/2006

Paciente apresenta malformação auricular à direita. Durante a gestação, a mãe teve toxoplasmose e doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG) no primeiro trimestre. Exames audiológicos mostram déficit auditivo na orelha direita. Tomografia do crânio evidencia hipoplasia do pavilhão auditivo e agenesia do conduto auditivo externo.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.



Figura 52. Paciente 15 apresenta malformação auricular à direita.

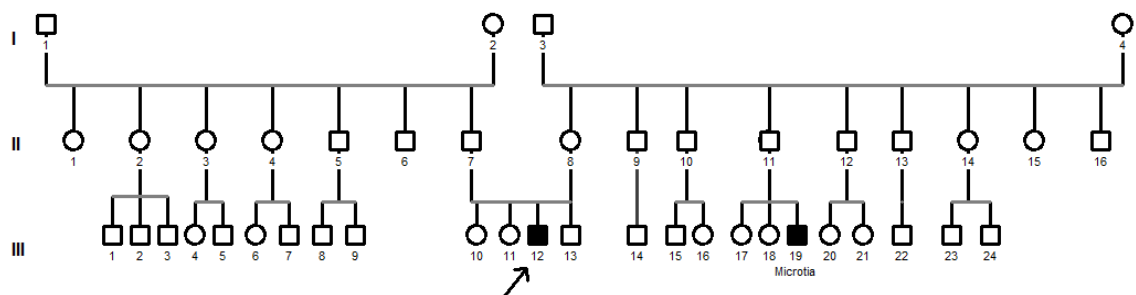


Figura 53. Heredograma da família da paciente 15. Os quadrados preenchidos em preto representam os homens afetados. A seta indica o propósito.

Paciente 16

Data de nascimento: 16/02/2012

Filho único de casal não consaguíneo. Apresenta hipoplasia do globo ocular direito, possui apêndice pré-auricular à direita e microftalmia. Um primo de segundo grau apresenta apêndice pré-auricular.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.



Figura 54. Paciente 16 apresenta hipoplasia do globo ocular direito e apêndice pré-auricular à direita.

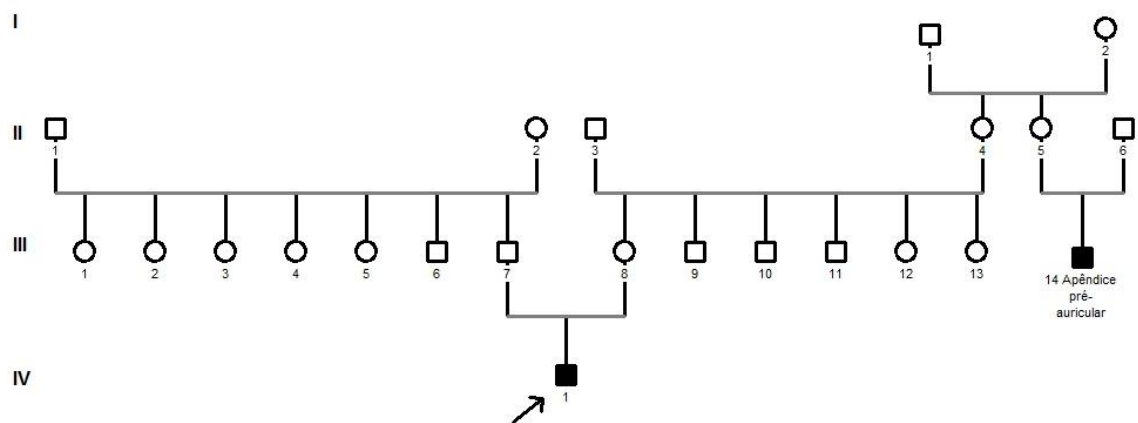


Figura 55. Heredograma da família do paciente 16. Os quadrados preenchidos em preto representam os homens afetados. A seta indica o propósito.

Paciente 17

Data de nascimento: 15/03/2012

Filho único de casal não consanguíneo. Paciente apresenta dermóide epibulbar na orelha esquerda, aniridia, dermóide auricular à direita, hérnia umbilical e peso elevado.

Através do estudo de *array*, foi identificada uma duplicação de 265 kb em 11p23.31, na região chr11: 1,946,870 - 2,212,488 (hg19), que causa a síndrome de Beckwith-Wiedemann.



Figura 56. Paciente 17 com dermóide epibulbar e apêndice pré-auricular a direita.

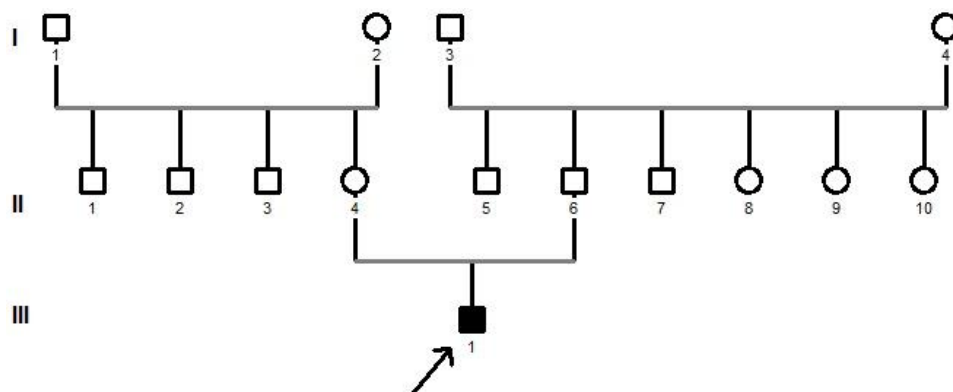


Figura 57. Heredograma da família do paciente 17. O quadrado preenchido em preto representa o propósito.

Paciente 18

Data de nascimento: 20/10/1999

Filha primogênita de casal não consanguíneo. Paciente apresenta malformação bilateral das orelhas, orelha esquerda com apêndices e pits pré-auriculares e amigdalite de repetição. O genitor possui uma sobrinha com lábio-leporino.

Através da análise de *array*, foi descoberto que a paciente é portadora de uma duplicação no cromossomo X na região gênica responsável pela Distrofia Muscular de Duchenne.



Figura 58. Paciente 18 com malformação bilateral das orelhas, pit e apêndices pré-auriculares à esquerda.

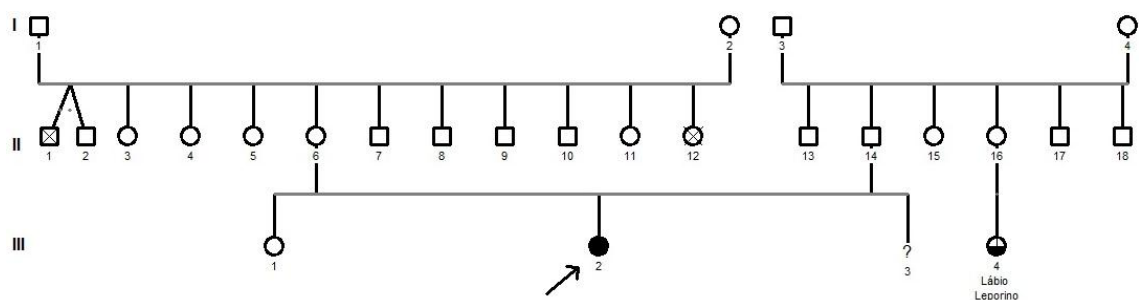


Figura 59. Heredograma da família da paciente 18. O círculo preenchido em preto representa a propósita; as figuras marcadas com um "x" indicam aborto; o círculo parcialmente preenchido em preto indica uma familiar com lábio-leporino.

Paciente 19

Data de nascimento: 25/04/1985

Quinta filha de casal não consanguíneo. Apresenta assimetria facial, microssomia hemifacial à esquerda, microtia à esquerda sem canal auditivo e retrognatia. Nega história familiar de malformações.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.

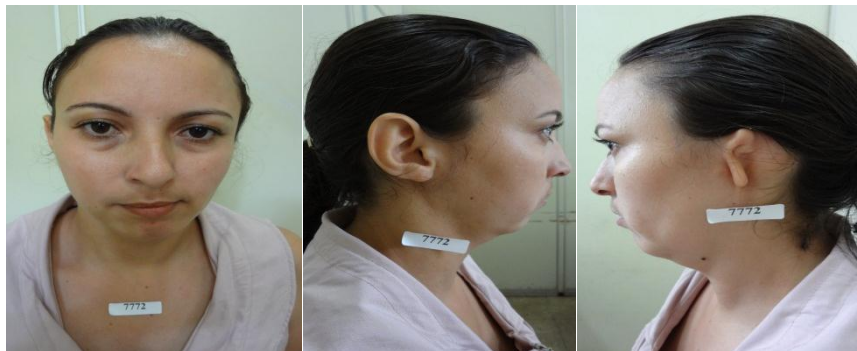


Figura 60. Paciente 19 apresentando assimetria facial, microssomia hemifacial à esquerda e microtia à esquerda.

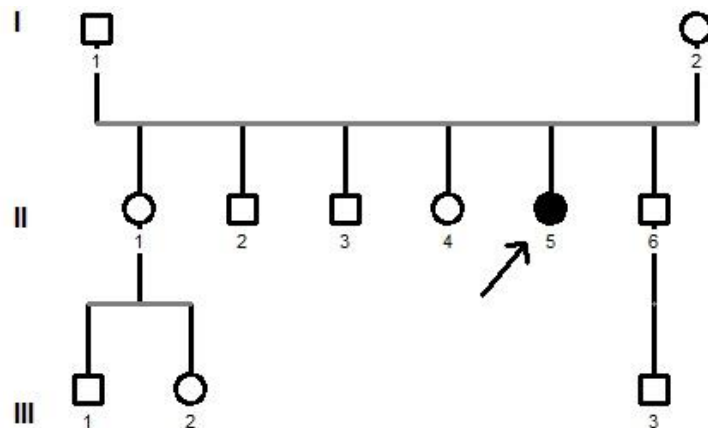


Figura 61. Heredograma da família da paciente 19. O círculo preenchido em preto representa a propósita.

Paciente 20

Data de nascimento: 27/03/2012

Terceira filha de pais não consanguíneos. Apresenta microtia à esquerda com apêndice pré-auricular. O irmão mais velho apresenta pit pré-auricular, e o segundo irmão apresenta apêndice pré-auricular à direita.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.



Figura 62. Paciente 20 apresentando microtia e apêndice pré-auricular à esquerda.

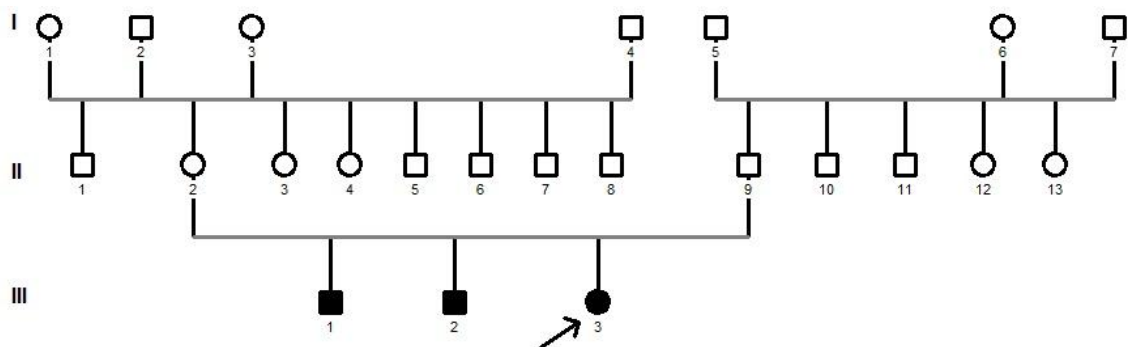


Figura 63. Heredograma da família da paciente 20. O círculo e os quadrados preenchidos em preto representam a propósita e seus irmãos, respectivamente.

Paciente 21

Data de nascimento: 25/11/1992

Segundo filho de pais consanguíneos. Apresenta coloboma de íris, cegueira no olho esquerdo, apêndices pré-auriculares, retardo mental, mamilo esquerdo mais alto que o mamilo direito. A irmã mais nova possui apêndice pré-auricular.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.



Figura 64. Paciente 21 com apêndice pré-auricular (retirado cirurgicamente).

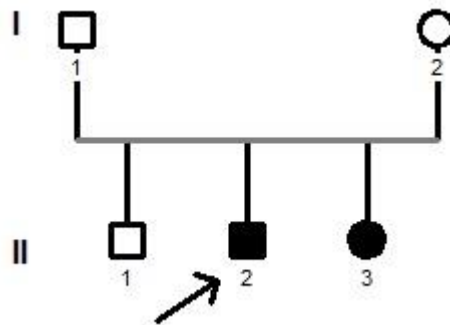


Figura 65. Heredograma da família do paciente 21. O quadrado e o círculo preenchidos em preto representam o propósito e sua irmã, respectivamente.

Paciente 22

Data de nascimento: 9/12/2004

Apresenta assimetria facial e microtia/anotia à esquerda. Tinha comunicação intraventricular mas aparentemente resolveu sozinho. Cariótipo normal 46, XY. Tem surdez condutiva unilateral.

A análise por *array* não encontrou alterações patogênicas.



Figura 66. Paciente 22 apresentando microtia/anotia a esquerda e nariz tubular.

Paciente 23

Data de nascimento: 02/03/2003

Paciente apresenta ausência do pavilhão auricular bilateral, apêndice pré-auricular à esquerda e na bochecha direita, assimetria facial. Tomografia da orelha mostrou ausência de pavilhão bilateral, conduto auditivo externo, caixa timpânica direita e cadeia ossicular, hipoplasia da caixa timpânica esquerda e displasia da cadeia ossicular.

A análise por *array* mostrou uma perda de heterozigose de 20,257 kbp na posição genômica chr12:72,248,741-92,506,140 (GRCh37/hg19) na região 12q15-q22.



Figura 67. Paciente 23 com microtia bilateral, apêndices pré-auriculares e assimetria facial.

Paciente 24

Data de nascimento: 09/11/2010

É o primeiro filho de mãe de 31 anos e pai de 38 anos, sem casos semelhantes na família. A gravidez ocorreu em uso de anticoncepcional oral e sangramento transvaginal vermelho vivo em todos os meses de gestação. A criança nasceu de parto cesáreo, a termo, com P=2090g, E=47 cm, sem sofrimento fetal, e ao exame físico havia fenótipo de Síndrome de Down, OAVS e pé torto congênito bilateral. O cariótipo foi 47 xy +21, o ecocardiograma mostrou CIA pequena. Ultrassom de abdome normal. A análise por array não mostrou alterações patogênicas compatíveis com OAVS.



Figura 68. Paciente com dermóide epibulbar, apêndices pré-auriculares bilateral, pé torto e síndrome de Down.

Paciente 25

A análise por array não mostrou alterações patogênicas. Até o momento não foi possível acesso aos dados clínicos deste paciente.

Paciente 26

Data de nascimento: 19/09/2003

Filho de pais jovens, sadios e não consanguíneos. Único caso na família, mãe teve um aborto anterior e um filho falecido com Síndrome de Down e cardiopatia.

Nasceu a termo com p=3030g, e=47, PC=34, apgar 9/9. Apresentou desenvolvimento neurológico normal, e possui dificuldade para aprender na escola. Paciente apresenta microtia à direita, fenda palatina transforame, apêndice pré-auricular e assimetria facial. Exames: Eletrocardiograma normal; ultrassom abdominal normal, avaliação fonoaudiológica indicou perda condutiva à direita e audição normal à esquerda.

A análise por *array* mostrou uma duplicação de 847 kbp na posição genômica chr12:21,969,669-22,817,436 (GRCh37/hg19) na região 12p12.1. Os pais ainda não foram testados.

Paciente 27

Data de nascimento: 01/03/2010

Paciente possui fenda palatina pósforame, convulsão e fenótipo facial de OAVS. Os pais são jovens, sadios e não consanguíneos, é caso único na família. Foi abandonada pela mãe, e hoje está aos cuidados da avó. Nasceu a termo de parto cesáreo, apgar 8/9, p=2940, e=49, PC=35.

Exames: ultrassom abdominal normal, ecocardiograma normal e desenvolvimento neuropsicomotor normal.

Foi observada por *array* uma microduplicação na posição genômica chr6:106,566,922-106,942,362 na região 6q21, compreendendo 375 kbp. Os pais ainda não foram testados.

ANEXO I

Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do projeto: Implantação de novas metodologias moleculares para o diagnóstico e pesquisa de distúrbios de origem genética.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância. Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4 a 8 mL de sangue de uma das veias do antebraço do paciente e seus genitores para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue será realizado por pessoa qualificada, é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto. Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Professora Doutora Iris Ferrari é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB. Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor entendimento das causas de doenças genéticas.

Eu, _____, profissão _____, residente em _____ e domiciliado em _____, portador da Cédula de Identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____, nascido(a) em ___/___/___, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar no estudo “ _____”, e afirmo que obtive todas as informações que considero necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- () Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- () Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- () Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, ____ de _____ de 20__

Assinatura do participante

Dra.
Pesquisadora responsável
Telefone para contato: (61) 3107 1745

ANEXO II



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 086/2009.

Título: “Implantação de novas metodologias moleculares para o diagnóstico e pesquisa de dismorfologias de origem genética”.

Pesquisador Responsável: Iris Ferrari.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 15/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 10/11/2009.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 09/12/2009.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** “*ad referendum*”, conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 09 de Dezembro de 2009.

Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

ANEXO III

RESEARCH LETTER

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics PART A

Non-Overlapping 22q11.2 Microdeletions in Patients With Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum

Pollyanna Almeida Costa dos Santos,^{1,2} Silviene Fabiana de Oliveira,² Erika L. Freitas,³ Heloisa Pires Neto Safatle,⁴ Carla Rosenberg,³ Iris Ferrari,² and Juliana Forte Mazzeu^{1,5*}¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, DF, Brazil²Laboratório de Genética, Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil³Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, SP, Brazil⁴Hospital Universitário, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Manuscript Received: 2 February 2013; Manuscript Accepted: 7 August 2013

TO THE EDITOR:

Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS) is a congenital defect from anomalous development of first and second branchial arches. It is genetically heterogeneous and its etiology includes unknown genetic factors, different chromosome aberrations and environmental factors, like maternal vasoactive medication, thalidomide, and maternal diabetes [Hartsfield, 2007].

Chromosome 22q11 microduplications and microdeletions have been reported on previously in patients with OAVS and several candidate genes have been proposed but no one has been confirmed as causative of the phenotype. Five studies described patients with GS spectrum with abnormal chromosome 22 or deletion in 22q11.2 (Table I), suggesting a role of genes in this region in branchial arch development [Hathout et al., 1998; Xu et al., 2008; Digilio et al., 2009; Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011]. Hemizygous microdeletions of 22q11.2 including *TERT* are responsible for DiGeorge/Velocardiofacial syndrome (MIM192430).

Preauricular skin tags have been reported in other patients with distal chromosome 22q11.2 microdeletion syndrome, but without other supporting features of Goldenhar syndrome [Rauch et al., 2005; Wieser et al., 2005]. Here we report on a patient with mild clinical signs of OAVS and velocardiofacial syndrome carrying a typical DG/VCFS 22q11.2 microdeletion.

The proband (Fig. 1A) is the second daughter of four children of a non-consanguineous young couple. She was born at term by normal delivery, weighing 2.250 kg (3rd centile), 49 cm high (25th centile), and 32 cm of head circumference (2nd centile). She was mildly developmentally delayed; she sat at 9 months and walked at 18 months. She presented with regurgitation with suffocation since the first year of life and was hospitalized several times because of vomiting, diarrhea, bronchitis, and pneumonia.

Clinical examination at age 8 years old showed mild right hemifacial microsomia, left ptosis, tubular nose, dysmorphic right ear, high palate, right hypoplasia of the depression anguli oris, mild retrognathia, ligament laxity, hyperextensible fingers, and right

How to Cite this Article:

dos Santos PAC, de Oliveira SF, Freitas EL, Safatle HPN, Rosenberg C, Ferrari I, Mazzeu JF. 2014. Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Am J Med Genet Part A* 164A:551–553.

deafness. She has feeding difficulty, hearing loss, and speech difficulties. The echocardiogram showed anterior mitral leaflet prolapse without valvular dysfunction. Cranial CT, X-ray of the spine and renal ultrasound did not disclose any abnormalities.

The parents provided written informed consent and the study was approved by institutional ethics committee.

We identified a 2,493,883 bp *de novo* deletion at genomic position chr22:17,276,772–19,770,655 (Build36/hg18) in the 22q11.21 region by array-CGH (44K Agilent) (Fig. 1B). The deletion was *de novo* and there is no family history of OAVS or VCFS.

This microdeletion maps to the typical DG/VCFS region. In the patient with OAVS reported by Digilio et al. [2009] a 22q11.2 deletion was confirmed by FISH with N25 (D22s75) probe, which maps to the typical VCFS deletion segment. Since no further analysis was performed to determine the extension of the deletion we cannot speculate

Conflict of interest: none.

Grant numbers: FAPESP, FAPDF-DF PPSUS 2010, CAPES.

*Correspondence to:

Juliana Forte Mazzeu, Universidade Católica de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências, Genômicas e Biotecnologia, SGAN 916 C-207, ZIP code: 70790-160, Brasília, DF, Brazil.

E-mail: julianamazzeu@yahoo.com

Article first published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 5 December 2013

DOI 10.1002/ajmg.a.36231

TABLE I. Clinical Summary of Patients With OAVS and 22q11 Microdeletion or Microduplication

Clinical features	Patients*					
	1	2	3	4	5	6
Epibulbar dermoid	-	+	-	+	-	-
Iris coloboma			+			
Dysmorphic ears	+	+	+		+	+
Preauricular tags	+	+	+	+	+	-
Microtia			+			-
Hearing loss			+	+	+	+
Hemifacial microsomia		+	+	+	+	+
Hypoplasia mandibular			+		+	-
Cleft palate			+		+	-
Other facial dysmorphisms	+					+
Long fingers			+			-
Cardiac malformations	+	-	+			+
Feeding difficulties			+			+

*Patient 1—Kuerst [2000]; Patient 2—Lafay-Cousin et al. [2009]; Patient 3—Digirola et al. [2009]; Patient 4—Tessier [2011]; Patient 5—Hathout et al. [1998]; Patient 6—Cantos et al. [2012].

on the deletion length. Other patients with OAVS have been reported to have deletions which are distal to the typical VCFS region and that do not overlap with the deletion here described (Fig. 1C).

These results show that non-overlapping 22q11 deletions may cause a similar phenotype thus pointing to a possible regula-

tory mechanism in the etiology of the syndrome with positional effect.

The deletion in our patient includes genes involved in embryogenesis of the first and second branchial arches and that are important in the formation of the oronasal and auditory cavity.

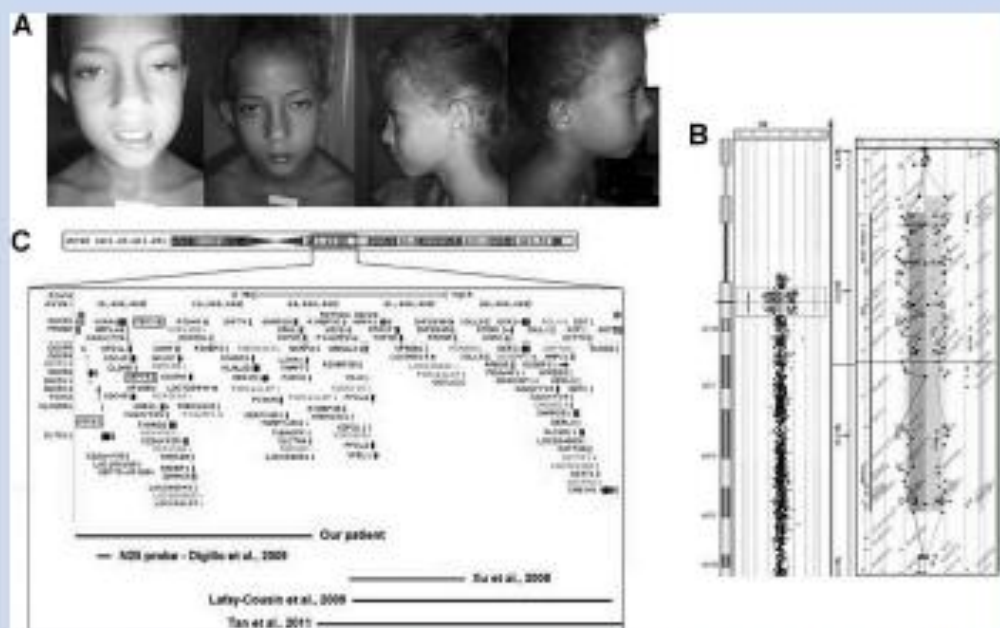


FIG. 1. A: Patient at age 8 years old showing facial asymmetry, ptosis, tubular nose, and right dysplastic ear. B: The overlap of two reverse-labeled a-may-based comparative genomic hybridization profiles of part of chromosome 22 shows a deletion detected by a 44k array. C: Representation of 22q11.2 region showing the genes mapped to this region and the segments deleted in patients with Goldenhar syndrome.

GSC2, also called GSC-like, mapped to 22q11.2 is related to velocardiofacial syndrome and is homologous to GSC, a gene mapped to 14q32, that has an important role in the development of branchial arches. GSC has been proposed as a candidate for OAVS based on a linkage study [Kelberman et al., 2001]. Other genes mapped to this segment such as *TBX1*, required for ear development, and *SETP5* that regulates the cytoskeleton and cell division may also be involved in the etiology of the syndrome [Alast and Van Camp, 2009].

These data suggest that the occurrence of OAVS and 22q11.2 microdeletion is not casual. Since non-overlapping deletions cause similar phenotypes it points to a possible regulatory mechanism acting on 22q11.2 mapped genes, particularly those involved in the development of neural crest and branchial arches.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patient and her family for agreeing to take part in the study. This work was partially supported by FAPESP, FAPDF-DF PPSUS 2010, and CAPES.

REFERENCES

- Alast and Van Camp. 2009. Genetics of microtia and associated syndromes. *J Med Genet* 46:631–639.
- Digilio MC, McDonald-McGinn DM, Heike C, Catania C, Dallapiccola B, Marino B, Zackai EH. 2009. Three patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and microdeletion 22q11.2. *Am J Med Genet Part A* 149A:2860–2864.
- Hathout EH, Elmendorf E, Bartley J. 1998. Hemifacial microsomia and abnormal chromosome 22. *Am J Med Genet* 76:71–73.
- Hansfield JK. 2007. Review of the etiologic heterogeneity of the oculo-auriculo-vertebral spectrum (Hemifacial Microsomia). *Orthod Craniofac Res* 10:121–128.
- Kelberman D, Tyson J, Chandler DC, McInerney AM, Slee J, Albert D, Aymat A, Botma M, Calvert M, Goldblatt J, Haan EA, Laing NG, Lim J, Malcolm S, Singer SL, Winter RM, Ritzner-Gilendicz M. 2001. Hemifacial microsomia: Progress in understanding the genetic basis of a complex malformation syndrome. *Hum Genet* 109:638–645.
- Lafay-Cosman I, Payne E, Strother D, Chemos J, Chan M, Bemier FP. 2009. Goldenhar phenotype in a child with distal 22q11.2 deletion and intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor. *Am J Med Genet Part A* 149A:2855–2859.
- Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z, Gordon CT, Leventer RJ, Pope K, Forbes R, Croll JA, Ganesamoorthy D, Burgess T, Bruno DL, Slater HR, Fudie PG, Amor DJ. 2011. Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormality. *Am J Med Genet Part A* 155A:1623–1633.
- Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, Lascorz J, Huffmeier U, Weyand M, Singer H, Hofbeck M. 2005. Systematic assessment of a typical deletion reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet* 42:871–876.
- Wieser R, Fritz B, Ullmann R, Müller I, Gahuber M, Storazzi CT, Ramaswamy A, Christiansen H, Shimizu N, Rehder H. 2005. Novel rearrangement of chromosome band 22q11.2 causing 22q11 microdeletion syndrome-like phenotype and rhabdoid tumor of the kidney. *Hum Mutat* 26:78–83.
- Xu J, Fan YS, Siu VM. 2008. A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide array CGH: Is this a candidate region for the syndrome? *Am J Med Genet Part A* 146A:1816–1819.