

**MILENA SIMIONI**

**INVESTIGAÇÃO DA REGIÃO 22q11.2 EM DEFEITOS DE  
LINHA MÉDIA FACIAL COM HIPERTELORISMO**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**MILENA SIMIONI**

**INVESTIGAÇÃO DA REGIÃO 22q11.2 EM DEFEITOS DE  
LINHA MÉDIA FACIAL COM HIPERTELORISMO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em  
Ciências Biomédicas.

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Si57i                      Simioni, Milena  
                                Investigação da região 22q11.2 em defeitos de linha média facial  
                                com hipertelorismo / Milena Simioni. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Vera Lúcia Gil da Silva Lopes  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertelorismo. 2. Anomalias craniofaciais. I. Lopes, Vera  
Lúcia Gil da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : 22q11.2 chromosome region and the Midline facial defects  
with Hipertelorism**

**Keywords:** • Hipertelorism  
                  • Craniofacial abnormalities

**Titulação: Mestre em Ciências Médicas**  
**Área de concentração: Ciências Biomédicas**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**  
**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
**Profa. Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini**

**Data da defesa: 21 - 02 - 2008**

---

## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

**Orientador: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes**

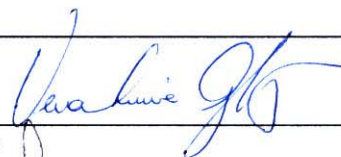
---

---

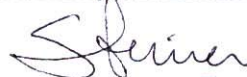
**Membros:**

---

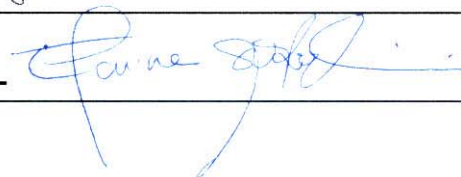
**1. Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes-**



**2. Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner -**



**3. Profa. Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini -**



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

**Data: 21/02/2008**

---

## ***DEDICATÓRIA***

*Dedico este trabalho aos meus pais Anésia e Celso,  
as minhas irmãs Lenita e Daniela por todo o amor e  
apoio em todos os momentos da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus por todas as graças que realizou e realiza em todos os dias da minha vida.

Aos meus pais Celso e Anésia e as minhas irmãs Lenita e Daniela por estarem sempre ao meu lado. Tudo o que sou hoje eu devo ao amor incondicional de vocês.

Ao Alex por todo seu amor, confiança, compreensão, amizade e por tudo o que me ensinou com seu imenso coração durante estes anos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, por todo aprendizado e dedicação durante estes dois anos e pela confiança que teve em mim para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Iscia Lopes Cendes, pelo apoio científico.

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

Aos professores do Dept. de Genética Médica, por todo o conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Laboratório de Citogenética Humana e do Laboratório de Genética Molecular, principalmente Marilza e Luciana, por todos os momentos que me auxiliaram durante estes dois anos.

Às secretárias do Dept. de Genética Médica e à secretaria do curso de Pós Graduação em Ciências Médicas.

À Teresa Vieira Chiodetto, por todo apoio durante o período em que trabalhou na secretaria do Dept. de Genética Médica, pela amizade e carinho de mãe que sempre teve comigo.

Aos meus amigos, que junto comigo formam o “quarteto fenomenal” da Vera: Érika, Társis e Bernardo, e a “irmã adotiva” Carolina Linconl. Obrigada por sempre me ajudarem na realização deste trabalho e pelos bons momentos que passamos e que vou sempre guardar em meu coração.

A todos meus amigos do laboratório e do Dept., Romênia, Fábio, Simone, Danizinha, Renato, Karina, Carolina Moreno, Fabíola, Aline, Estela, Lidiane, Rodrigo, por todo auxílio e pela amizade. Cada um, ao seu modo, tornou-se especial pra mim.

À Banca Examinadora, Dr. Carlos Eduardo Steiner, Dra. Elaine Sbroggio de Oliveira Rodini, Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli e Dra. Marly Ap. Spadotto Balarin, pela contribuição na elaboração da minha tese.

Aos pacientes e familiares que participaram do estudo.

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xiv</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xvi</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1- Desenvolvimento embrionário e formação da linha média</b> .....	19
<b>1.2- Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo</b> .....	20
<b>1.3- A região 22q11.2 e os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo</b> .....	23
<b>1.4- Síndromes de deleção 22q11.2</b> .....	25
<b>1.5- Anomalias estruturais e funcionais do sistema nervoso central associados à deleção 22q11.2</b> .....	27
<b>1.6- Região 22q11.2: a deleção e os genes candidatos <i>HIRA/TUPLE1</i> e <i>TBX1</i></b> .....	28
1.6.1- Gene <i>HIRA/TUPLE</i> .....	30
1.6.2- Gene <i>TBX1</i> .....	32
<b>2- JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3.1- Objetivo geral</b> .....	41
<b>3.2- Objetivos específicos</b> .....	41
<b>4- CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	42
<b>4.1- Casuística</b> .....	43
<b>4.2- Métodos</b> .....	43
4.2.1- Técnica de <i>FISH</i> .....	44
4.2.2- Triagem de mutações para os genes candidatos: <i>HIRA/TUPLE1</i> e <i>TBX1</i> .....	45



4.2.2.1- Coleta das amostras e extração de DNA.....	45
4.2.2.2- Desenho dos oligonucleotídeos.....	45
4.2.2.3- Amplificação dos fragmentos de interesse.....	48
4.2.2.4- Componentes e volumes das reações de PCR.....	48
4.2.2.5- Condições das reações de PCR.....	49
4.2.2.6- Sequenciamento automático	50
4.2.2.7- <i>Denaturing High Performace Liquid Chrormatography</i> ...	50
4.2.2.8- <i>Análise in silico</i> .....	51
<b>5- RESULTADOS</b> .....	53
<b>5.1- Técnica de <i>FISH</i></b> .....	54
<b>5.2- Triagem de mutações dos genes candidatos <i>HIRA/TUPLE1</i> e <i>TBX1</i>...</b>	55
5.2.1- Amplificação dos fragmentos.....	55
5.2.2- Sequenciamento automático.....	56
5.2.3- dHPLC.....	59
<b>6- DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>7- CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69
<b>9- ANEXOS</b> .....	83
<b>Anexo I-</b> Parecer do Comitê de Ética.....	84
<b>Anexo II-</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	85
<b>Anexo III-</b> Dados Clínicos dos Indivíduos.....	90
<b>Anexo IV-</b> Composição das Soluções – <i>FISH</i> .....	91
<b>Anexo V-</b> Protocolo da <i>FISH</i> .....	93
<b>Anexo VI-</b> Protocolo de Extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio..	95
<b>Anexo VII-</b> Componentes e volumes das reações de PCR para a amplificação dos exons do gene <i>TBX1</i> .....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ACF</b>	Anomalias craniofaciais
<b>ACM</b>	Anomalias congênitas múltiplas
<b>AR</b>	Ácido retinóico
<b>CAFS</b>	<i>Conotruncal Anomaly Face Syndrome</i>
<b>CATCH22</b>	<i>Cardiac Abnormality/abnormal facies, T cell deficit due to thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia due to hypoparathyroidism resulting from 22q11 deletion</i>
<b>del</b>	deleção
<b>DFN</b>	Displasia Frontonasal
<b>dHPLC</b>	<i>Denaturing High Performace Liquid Chrormatography</i>
<b>DLMFH</b>	Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo
<b>FGF8</b>	<i>Fibroblast Growth Factor 8</i>
<b>FISH</b>	<i>fluorescence in situ hybridization</i> (hibridação <i>in situ</i> com fluorescência)
<b>HGMD</b>	<i>Human Genome Mutation Database</i>
<b>HIRA</b>	<i>H.sapiens HIR histone cell cycle regulation defective homolog A</i>
<b>LCR</b>	<i>low copy repeat sequences</i>
<b>MFD</b>	<i>Median Facial Dysplasia</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>OMIM</b>	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim</a>
<b>pb</b>	pares de base
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PolyPhen</b>	Polymorphism Phenotyping

<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>SDG</b>	Seqüência de DiGeorge
<b><i>SHH</i></b>	<i>Sonic hedgehog</i>
<b>SIFT</b>	<i>Sorting Intolerant from Tolerant</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	<i>single nucleotide polymorphism</i>
<b>SVCF</b>	Síndrome Velocardiofacial
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b><i>TBX1</i></b>	<i>T-BOX1</i>
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada de crânio
<b><i>TUPLE1</i></b>	<i>H. sapiens TUP1-like enhancer of split gene 1</i>
<b>VSD</b>	defeito de septo ventricular
<b>WD</b>	dipeptídeo triptofano-aspartato

## LISTA DE TABELAS

---

	PÁG.
<b>Tabela 4.1-</b> Pares de oligonucleotídeos construídos para a amplificação das regiões exônicas do gene <i>HIRA/TUPLE1</i> .....	46
<b>Tabela 4.2-</b> Pares de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene <i>TBX1</i> . TD: <i>touch down</i> de 64°C a 58°C.....	47
<b>Tabela 5.1-</b> Resumo dos polimorfismos encontrados no gene <i>TBX1</i> .....	58

## LISTA DE FIGURAS

---

	PÁG.
<b>Figura 1.1-</b> Marcadores, sondas e genes da região 22q11.2 (adaptado de Yagi et al, 2003).....	29
<b>Figura 1.2-</b> Representação esquemática do gene <i>HIRA/ TUPLE1</i> , conforme o tamanho dos exons e suas posições (Ensembl Genome Browser).....	30
<b>Figura 1.3-</b> Representação esquemática dos transcritos <i>TBX1A</i> , <i>TBX1B</i> e <i>TBX1C</i> . Em verde: seqüências codificantes em cinza: seqüências não-codificantes <i>U</i> (adaptado Paylor et al., 2006)..	33
<b>Figura 4.1-</b> Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9B.....	49
<b>Figura 4.2-</b> Ciclos utilizados na amplificação do exons 3 e 9C.....	49
<b>Figura 4.3-</b> Ciclos utilizados na reação de sequenciamento.....	50
<b>Figura 5.1-</b> Metáfase de um indivíduo (indivíduo 8) com DLMFH. Os pontos verdes indicam a região controle telomérica e os vermelhos a região 22q11.2. A presença de marcação vermelha indica que os dois cromossomos 22 encontra-se íntegros nesta região.....	54
<b>Figura 5.2-</b> Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do gene <i>TBX1</i> . L: marcador de peso molecular 100pb.....	55
<b>Figura 5.3-</b> Troca <b>C → G</b> , exon 2 do gene <i>TBX1</i> (rs737868), presente no indivíduo 1.....	56
<b>Figura 5.4-</b> Troca <b>T → C</b> , exon 4 do gene <i>TBX1</i> (rs41298814), presente no indivíduo 3.....	56

<b>Figura 5.5-</b>	Troca <b>C→ T</b> , exon 5 do gene <i>TBX1</i> (rs2301558), presente no indivíduo 1.....	57
<b>Figura 5.6-</b>	Troca <b>A→ G</b> , exon 8 do gene <i>TBX1</i> (rs41298840), presente no indivíduo 3.....	57
<b>Figura 5.7-</b>	Troca <b>A→ G</b> , exon 9C do gene <i>TBX1</i> (rs13054377), presente no indivíduo 3.....	57
<b>Figura 5.8-</b>	Troca <b>G→ A</b> , exon 9C do gene <i>TBX1</i> (indivíduo 8), presente no indivíduo 8.....	58
<b>Figura 5.9-</b>	Perfil cromatográfico do indivíduo 7 (a) e indivíduo controle (b) a temperatura de 64,2°C.....	60
<b>Figura 5.10-</b>	Perfil cromatográfico do indivíduo 5 (a) e indivíduo controle (b) a temperatura de 69,8°C.....	60
<b>Figura 5.11-</b>	Troca <b>G → A</b> , exon 3 do gene <i>TBX1</i> , presente no indivíduo 5.....	61

# RESUMO

Os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo (DLMFH) constituem um grupo de anomalias craniofaciais raras e heterogêneas caracterizado por hipertelorismo ocular e fenda nasal mediana e (ou) lateral. Esses defeitos podem ocorrer isoladamente ou associados a dismorfismos com ou sem padrão definido, motivo pelo qual sua incidência não foi estabelecida até o momento. Dentre os fatores que podem participar da sua gênese encontra-se a perda de controle de genes de desenvolvimento envolvidos no processo de formação facial. A microdeleção 22q11.2, região dos genes *HIRA/TUPLE1* e *TBX1*, causa a Síndrome Velocardiofacial e a Sequência de DiGeorge. Essa deleção também foi descrita em casos esporádicos de anomalias congênitas múltiplas e DLMFH. Esses fatos, corroborados por extensa revisão da literatura, sugerem que os DLMFH possam fazer parte do espectro dessas condições clínicas e estarem associados a alterações na região 22q11.2. Para estudar essa hipótese, 10 indivíduos com DLMFH foram analisados por meio da técnica de *FISH*, utilizando a sonda comercial 22q11.2 DiGeorge – *HIRA/TUPLE1* locus (Vysis<sup>TM</sup>). Não foi encontrada perda de fragmento cromossômico nessa região em nenhum dos indivíduos analisados. Os genes *HIRA/TUPLE1* e *TBX1* foram estudados por meio de técnicas moleculares. Não foi possível realizar a padronização da amplificação dos exons do gene *HIRA/TUPLE1*. Alterações de sequência no gene *TBX1*, descritas como polimorfismos de nucleotídeo único e uma alteração inédita no exon 9C, 1132G → A, foram encontradas. Em vista do tamanho amostral e da heterogeneidade clínica e etiológica, o presente trabalho não pode relacionar o envolvimento da região 22q11.2 na patogenia dos DLMFH.





# **ABSTRACT**

Midline Facial Defects with Hipertelorism (MFDH) is a rare and heterogeneous group of craniofacial disorders characterized by ocular hypertelorism and bifid nose. This group of craniofacial defects occurs isolated or as part of a syndrome. For these reasons, its prevalence is still unknown. Alterations in developmental genes involved in facial process could be implicated in the genesis of this condition. The 22q11.2 microdeletion, localization of the *HIRA/TUPLE1* and *TBX1* genes, causes Velocardiofacial Syndrome and DiGeorge Syndrome. This deletion was also described in few cases of multiple congenital anomalies and MFDH. These facts suggested that some cases of MFDH may be part of the spectrum of these conditions and associated to alterations in the 22q11.2 region. In order to verify this hypothesis, fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for 22q11.2 region (DiGeorge – *HIRA/TUPLE1* locus probe, Vysis<sup>TM</sup>) was performed on metaphase chromosomes and nuclei of 10 individuals with MFDH. The 22q11.2 deletion was not found in any patient. Molecular techniques were applied in the study of *HIRA/TUPLE1* and *TBX1* genes. The amplification of *HIRA/TUPLE1* exons was not possible to be realized. Alterations in the sequence of *TBX1* gene, classified as single nucleotide polymorphism and a new alteration in exon 9C, 1132G → A, were found. In view of the size of the sample and the clinical-genetic heterogeneity, we could not associate the involvement of 22q11.2 region in the genesis of MFDH.

## **1- INTRODUÇÃO**

Entre os defeitos congênitos, as anomalias craniofaciais (ACF) constituem um grupo altamente diverso e complexo que, em conjunto, afeta uma significativa proporção de pessoas no mundo (American Cleft Palate-Craniofacial Association – ACPA, 2000; WHO, 2002). As ACF podem incluir anomalias isoladas e quadros de dismorfismos múltiplos, de etiologia genética ou não. Via de regra, referem-se a situações em que os arcos craniano e (ou) facial apresentam alterações de contorno (Gorlin et al., 1990; WHO, 2002).

Devido a toda complexidade das ACF, a adequada caracterização de cada caso torna-se muito importante pois, muitas vezes, o delineamento clínico é pouco consistente com a literatura. Esse fato ocorre em razão da raridade e (ou) da heterogeneidade clínico-etiológica dos distúrbios craniofaciais (Gil-da-Silva-Lopes, 1997). Dentro da caracterização das anomalias craniofaciais raras está o delineamento dos Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo (DLMFH). Esse grupo de defeitos vem sendo cuidadosamente estudado e descrito por este grupo de pesquisa, denominado História Natural das Anomalias Craniofaciais.

Considerando que as anomalias craniofaciais, incluindo os DLMFH, bem como outros defeitos do desenvolvimento têm uma etiologia complexa e pouco conhecida (Gil-da-Silva-Lopes, 1997), acredita-se que a futura identificação de genes ou regiões cromossômicas, envolvidas nessas malformações, poderia ser útil no esclarecimento dos mecanismos que causam distúrbios do desenvolvimento humano.

### **1.1- Desenvolvimento embrionário e formação da linha média**

O desenvolvimento embrionário segue um processo epigenético com interação permanente entre fatores genéticos e ambientais. Cada região embrionária corresponde a uma unidade formadora, chamada de campo de desenvolvimento. Esses campos correspondem a áreas embrionárias onde o desenvolvimento de estruturas complexas e apropriadas para cada região é determinado e controlado de uma maneira espacialmente coordenada, temporalmente sincronizada e hierarquicamente epimórfica. Essas unidades sofreriam a ação de diversos fatores estando sujeitas a modificações durante o desenvolvimento embrionário (Opitz, 1982a).

A formação da linha média é um dos principais eventos da primeira fase do desenvolvimento do embrião (blastogênese). Em torno dela originam-se todos os processos que garantem simetria ao embrião (Martinez-Frias, 1995). Durante esse processo ocorre a formação da face e qualquer alteração que ocorra no desenvolvimento do mesênquima frontonasal, nos ossos membranosos da abóbada craniana, no condrocrânio ou nos dois primeiros arcos branquiais resultará em anomalias cranianas ou craniofaciais das mais diversas (Cohen, 2002).

Como a face e o sistema nervoso central (SNC) iniciam sua formação em um período muito próximo e ambos pertencem ao mesmo campo de desenvolvimento (linha média), várias alterações faciais podem ser acompanhadas de anomalias corticais (Slavkin, 1990).

## **1.2- Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo**

Os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo fazem parte de um grupo raro de anomalias craniofaciais caracterizado, principalmente, por hipertelorismo ocular e fenda nasal mediana ou lateral (Gil-da-Silva-Lopes, 1997; Guion-Almeida, 2000; Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra, 2007). Podem, ainda, ser observados crânio anterior bífido, ausência da ponta nasal, implantação em "V" dos cabelos na fronte, fissura labial mediana e (ou) fissura labial lateral e fissura palatina (DeMyer, 1967; Rosasco e Masa, 1968; Sedano et al., 1970; Sedano e Gorlin, 1988).

Inúmeras denominações já foram utilizadas para esse grupo de defeitos congênitos: síndrome da fenda facial mediana (DeMyer, 1967), síndrome frontonasal (Rosasco e Masa, 1968), disostose frontonasal (Gollop, 1981), seqüência malformativa frontonasal (Toriello et al., 1986), displasia frontonasal (Sedano et al., 1970) e malformação frontonasal (Sedano e Gorlin, 1988).

Considerando as particularidades citadas e após o resultado de investigações de casuísticas de tamanho relevante foi proposta por nosso grupo de pesquisa a denominação DLMFH. A utilização de um nome descritivo veio na tentativa de integrar os dados sobre esses defeitos e assim facilitar o diagnóstico (Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra, 2007).

A primeira classificação para os DLMFH surgiu em 1967, conforme os estudos clínico-radiológicos e revisão da literatura realizados por DeMyer. A partir de estudos sobre desenvolvimento embriológico da face e de revisão da literatura, Sedano et al. (1970) propuseram uma segunda classificação. Tessier (1976) elaborou uma classificação anatômico–descritiva das fissuras crânio-faciais e látero-faciais a partir de sua experiência cirúrgica e clínico-radiológica. Esta classificação utiliza a órbita como estrutura de referência e, a partir desta, são traçados eixos (1-14), definidos segundo sua relação com a linha média.

Trata-se de defeitos heterogêneos, tanto clínica como etiologicamente (Guion-Almeida et al., 1996), podendo ser encontrados isoladamente ou associados a quadros de anomalias congênitas múltiplas, com padrão de transmissão hereditário definido ou não (Gil-da-Silva-Lopes, 1997, Guion-Almeida, 2000). A maior parte das anomalias associadas aos DLMFH corresponde a defeitos do mesmo campo de desenvolvimento (Opitz, 1982b). Em relação à epidemiologia dos DLMFH, sabe-se que não há desvio em relação ao sexo e que a maioria dos casos é esporádica. Não existem estudos sobre a variabilidade racial ou dados globais sobre incidência (Guion-Almeida, 2000; Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra, 2007).

Considerando a raridade desses defeitos congênitos, os estudos de grandes casuísticas têm sido limitados e, assim, a patogênese permanece parcialmente desconhecida. Falência na formação da cápsula nasal, alteração na migração das células da crista neural, alteração no suprimento sanguíneo nos processos frontonasais, deficiência mesenquimal no plano facial mediano, fatores teratogênicos e perda de controle de genes de desenvolvimento envolvidos no processo de formação facial podem estar envolvidos na gênese desse quadro (Cohen et al., 1971; Gil-da-Silva-Lopes, 1997).

A primeira publicação sobre esses defeitos já relatava anomalias no SNC, tais como encefalocele frontal, mielomeningocele, malformações de Chiari e hidrocefalia (DeMyer, 1967). Dentre os 25 indivíduos estudados nesse trabalho, 8% apresentavam retardo mental grave e 12% retardo mental moderado.

Em 1991, Guion-Almeida avaliou indivíduos com DLMFH (18 de casuística própria e 100 da literatura) e apontou a presença de lipoma de corpo caloso em 44,4% dos casos, agenesia de corpo caloso em 40,7%, calcificação cerebral em 33,3%, anomalias ventriculares em 29,6% e encefalocele em 11,1%. Sintomas de retardo mental foram observados 44% dos indivíduos analisados nesse estudo. Além do lipoma de corpo caloso, a calcificação dessa estrutura já havia sido descrita anteriormente por Pascual-Castroviejo et al. (1985).

A anteriorização frontal do corpo caloso foi encontrada em um indivíduo com DLMFH (caso isolado) avaliado por Gabrielli et al. (1993). Esse achado foi posteriormente confirmado em uma amostra de 18 indivíduos com DLMFH por Giffoni et al. (2004). No estudo realizado por Giachetti (1996), alterações cognitivas e de linguagem foram descritas em 19 indivíduos com o quadro de DLMFH. Tais características ocorreram, principalmente, no grupo de indivíduos com alterações estruturais no corpo caloso.

Posteriormente, em 2005, Giffoni et al. detectaram alterações dismorfológicas, neuroradiológicas e neurológicas em um grupo de indivíduos com DLMFH, sendo que 24 foram analisados por tomografia computadorizada de crânio (TC) e 17 por ressonância magnética (RM). Dentre as dismorfológicas, alterações cranianas foram relatadas em todos os casos, com prevalência de dolicocefalia e falha óssea frontal na região da linha média (10/24). Dentre as neuroradiológicas, hipoplasia de vermis cerebelar (8/17), cerebelo no limite inferior da normalidade (5/17) e sinais de hipoplasia cerebelar global (3/17) foram encontradas. Tais achados poderiam explicar a hipotonia (24/24), problemas de linguagem (8/24), anormalidades na coordenação motora (18/24) e no equilíbrio (14/24) observados nos indivíduos dessa amostra.

Utilizando RM com reconstrução multiplanar, Giffoni (2005) avaliou uma amostra de indivíduos com DLMFH. Anomalias comissurais foram observadas em 94% dos casos com predomínio de alterações no corpo caloso (53% com hipogenesia e 17% com agenesia), seguidas por alterações hipocâmpais (41%). Setenta por cento dos indivíduos apresentavam mais de uma malformação cortical, consistente com defeitos ocorrendo em diferentes fases do desenvolvimento. A associação mais freqüente foi a heterotopia nodular com o complexo esquizecefalia-polimicrogiria (29%). Distúrbios de fechamento do tubo

neural foram observados 41% dos casos, com predomínio de encefalocele ou ventriculocele (23%).

Comparando achados de RM, TC e radiografias de face e de crânio de um grupo de indivíduos com DLMFH isolado e um grupo com DLMFH associado a anomalias congênitas múltiplas (ACM) sem quadro sindrômico definido, Gil-da-Silva-Lopes e Giffoni (2006) constataram que ambos os grupos não apresentavam diferenças significativas. As radiografias de face e crânio detectaram hipertelorismo ocular em 100% dos casos, crânio anterior bífido em 33% e falha óssea frontal em 16%. A TC do crânio apontou anomalias no corpo caloso em 38%, defeitos ósseos em 33%, anomalia ventricular e encefalocele frontal em 14%, displasia cortical e atrofia do lobo frontal em 9,5%. A RM evidenciou anomalias ventriculares e no corpo caloso em 44% e hipoplasia cerebral em 16%.

Anomalias no corpo caloso, encefalocele frontal e outras anomalias complexas do SNC foram posteriormente revisadas por Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra (2007). As autoras concluíram que a associação entre DLMFH e anomalias no SNC envolvendo a linha média reforça a hipótese de um defeito nesse campo de desenvolvimento, porém não há uma base genética definida nos casos isolados.

Baseado nos dados obtidos nesses estudos e em revisão da literatura sugere-se que as anomalias cerebrais seriam uma constante em casos de DLMFH. Tais anomalias poderiam ser explicadas por uma predisposição genética variável associada a fatores ambientais que romperiam o processo de formação facial e do SNC em uma fase crítica do desenvolvimento dessas estruturas.

### **1.3- A região 22q11.2 e os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo**

Alterações na região 22q11.2 foram associadas a casos de DLMFH e condições similares. Stratton e Payne (1997) relataram um caso de DLMFH e tetratologia de Fallot caracterizado por hipertelorismo ocular, nariz bífido, ponte nasal plana, filtro nasolabial plano e braquicefalia. Através da técnica de *FISH*, utilizando a sonda Oncor DiGeorge (D22S75), foi constatada deleção na região 22q11.2. Nesse trabalho foi sugerido que



alterações no desenvolvimento das células da crista neural podem estar envolvidas nas malformações frontonasais e que mais de um gene influencie esse processo.

Em 1998, Kirkpatrick e Pauli descreveram o caso de um menino com anomalias frontonasais e deleção 22q11.2, similar ao descrito por Stratton e Payne (1997). As características clínicas principais compreendiam base nasal larga, ponta nasal bífida e narinas antevertidas, columela proeminente, face assimétrica ao choro, orelhas pequenas e malformadas e hipospadia. Nenhuma alteração cardíaca foi encontrada. Com o crescimento, apresentou retardo mental, déficit de atenção e outros distúrbios de comportamento.

Gripp et al. (1997) descreveram dois indivíduos com síndrome de deleção 22q11.2 que apresentavam fenótipo bem variável, sendo a deleção confirmada pela técnica de *FISH* (sonda Oncor D22S75). O indivíduo 1 apresentava nariz largo e bífido e tetralogia de Fallot. Ao nascimento, o indivíduo 2 apresentou hipocalcemia neonatal, defeito no septo atrial, nariz largo e bífido, fissura palatal, úvula bífida e insuficiência velofaríngea. Na fase adulta, Lynch et al. (1995) realizaram uma avaliação neurológica que detectou dismetria e disdiadococinesia, consistente com a degeneração cerebelar. Devido à fissura palatal, ao atraso no desenvolvimento, a hipocalcemia neonatal e as anomalias faciais foi levantada a hipótese diagnóstica de Síndrome Velocardiofacial.

Fryns et al. (1993) relataram um indivíduo com DLMFH que apresentava uma translocação de herança materna entre os cromossomos 15/22, cariótipo 46,XX,t(15;22)(q22;q13). É possível que essa translocação cause perda de material cromossômico na região 22q11.2 (Stratton e Payne 1997). As características clínicas encontradas incluíam hipertelorismo ocular, fissuras palpebrais oblíquas para baixo, epicanto, estrabismo divergente, nariz bífido, crânio bífido, bossa frontal proeminente, palato alto e implantação baixa e em “V” dos cabelos na fronte. A TC do crânio detectou dilatação dos ventrículos laterais, calcificações epifisárias e hiperpneumatização dos seios paranasais.

Schulze et al. (2001) descreveram dois indivíduos com Displasia Facial Média (MFD, do inglês *Median Facial Dysplasia*) e deleção 22q11.2. Essa condição foi primeiramente descrita por Noordhoff e Cheng (1982). O indivíduo 1 apresentava fissura

lábiopalatina bilateral, ponte nasal alta, filtro naso-labial curto, ausência de freio labial, pré-maxila hipoplasica, atraso no desenvolvimento da cartilagem septal e anomalias cardíacas. Durante a infância, o indivíduo evidenciou atraso no desenvolvimento da linguagem e no desenvolvimento psicomotor. A RM do cérebro detectou alargamento dos seios frontais bilaterais e redução da porção anterior de ambos os hemisférios cerebrais. O indivíduo 2 apresentava fissura lábiopalatina bilateral, filtro naso-labial curto, ausência de freio labial, premaxila hipoplásica, ponte nasal larga, fóvea profunda na ponta nasal, tetralogia de Fallot e outras anomalias cardíacas. Durante a infância, atraso no desenvolvimento psicomotor, na linguagem e no crescimento foram relatados. A RM detectou um padrão de giro frontal sugerindo polimicrogiria e redução da porção frontal de ambos os hemisférios cerebrais.

#### **1.4- Síndromes de deleção 22q11.2**

A deleção 22q11.2 é a deleção intersticial mais encontrada nos seres humanos com incidência de 1/4000 a 1/5000 indivíduos nascidos vivos (Devriendt et al., 1998). Relatos na literatura associam essa deleção a mais de 80 tipos diferentes de condições clínicas, incluindo a Síndrome Velocardiofacial (SVCF), Sequência de DiGeorge (SDG) e Síndrome das Anomalias Conotrunciais-Face (CAFS, do inglês *Conotruncal Anomaly Face Syndrome*), sendo a SVCF e a SDG distúrbios autossômicos dominantes (Driscoll et al., 1992; Wilson et al., 1991; Stevens et al., 1990). Como SVCF, SDG e CAFS compartilham um amplo espectro fenotípico e são causadas pela deleção 22q11.2, essas condições representam variações na expressão do mesmo defeito genético (Swillen et al., 2000).

A SVCF é caracterizada por fissura palatal, defeitos cardíacos conotrunciais, face característica e dificuldade de aprendizagem. Em menor frequência encontram-se microcefalia, retardo mental, estatura baixa, anomalias digitais, anomalias no pavilhão auricular e hérnia inguinal (Shprintzen et al., 1981). O espectro completo da SVCF, revisado Goldberg et al. (1993), com base na análise de 120 indivíduos, inclui dificuldade de aprendizagem, fissura palatal, hipotonia de faringe em 90% ou mais dos casos, anomalias

cardíacas em 82%, mãos e dedos esguios em 63%, deslocamento medial interno das artérias carótidas em 25%, hérnia umbilical em 23% e hipospadia em 10% dos homens.

O fenótipo da SDG inclui defeitos cardíacos conotruncais, hipoparatiroidismo, deficiência imunológica causada por hipoplasia da glândula tímica, malformações no ouvido e nas orelhas, além de face típica (Scambler et al., 1991; Carey et al., 1992) caracterizada por hipertelorismo ocular, anomalias no nariz, fissura palatal e micrognatia (Zoupa et al., 2006).

Na síndrome CAFS as características faciais típicas incluem o hipertelorismo ocular, fissuras palpebrais pequenas, ponte nasal baixa, boca pequena e anomalias menores no lobo da orelha. Essas características estão frequentemente associadas ao retardo mental moderado e a anomalias cardiovasculares que consistem principalmente em anomalias do fluxo nos vasos cardíacos, como tetralogia de Fallot, tronco arterial comum e anomalias de arcos aórticos (Matsuoka et al., 1998).

Ao longo desta apresentação, pode-se perceber que a deleção 22q11.2 se apresenta associada a uma variedade de fenótipos. Um acrônimo coletivo CATCH22, do inglês *C*ardiac *A*bnormality/*ab*normal *f*acies, *T* cell deficit due to thymic hypoplasia, *C*left *p*alate, *H*ypocalcemia due to hypoparathyroidism resulting from *22q11* deletion foi proposto na tentativa de integrar essas diferentes condições. Entretanto, Burn (1999), um dos autores que propuseram o acrônimo CATCH22, fez uma revisão da nomenclatura e reconheceu que esse termo possui conotações negativas e que, na prática, termos diferentes devem continuar sendo utilizados para os fenótipos observados.

Halder et al. (2005) utilizaram esse termo para descrever o caso de um indivíduo com deleção 22q11.2 que apresentava um quadro de dismorfismos faciais incluindo hipertelorismo ocular, telecanto, pálpebras caídas, nariz arredondado e proeminente, filtro curto, linha do cabelo baixa e orelhas de implantação baixa. Dificuldade de aprendizagem e tetralogia de Fallot também foram relatadas.

### **1.5- Anomalias estruturais e funcionais do sistema nervoso central associadas à deleção 22q11.2**

Anomalias estruturais e funcionais em determinadas regiões do SNC têm sido descritas em indivíduos com a deleção 22q11.2. Achados de RM incluem anomalias no desenvolvimento da linha média, atrofia cerebral, agenesia de corpo caloso e anomalias de base de crânio (Chow et al., 1999).

Redução no volume da substância cinzenta cerebelar (Van Amelsvoort et al., 2001; Campbel et al., 2006), particularmente na região da insula, lobo frontal e temporal direito (Van Amelsvoort et al., 2001) e lobo parietal (Eliez et al., 2000; Simon et al., 2005) foram descritos em indivíduos com deleção 22q11.2. Já a diminuição no volume da substância branca cerebelar foi relatada por Eliez et al. (2000), especificamente nas regiões frontal, parietal e temporal, no cerebelo e na cápsula interna (Simon et al., 2005; Campbel et al., 2006; Van Amelsvoort et al., 2001).

Anomalias nas estruturas cerebrais da região da linha média, incluindo disgenesia do corpo caloso e *cavum* do septo pelúcido foram encontradas em uma amostra de indivíduos com deleção 22q11.2 por Shashi et al. (2004). Posteriormente, em 2007, Machado et al. relataram alterações significantes na forma, tamanho e ângulo de curvatura do corpo caloso em um grupo de indivíduos com deleção a 22q11.2.

Em relação aos achados cognitivos, Swillen et al. (1997) descreveram que 45% dos indivíduos com SVCF de um grupo de 37 apresentavam retardo mental. Posteriormente, Moss et al. (1999) relataram níveis variáveis de QI, entre normal e retardo mental moderado, bem como comprometimento de linguagem em indivíduos com SVCF. De acordo com Rauch et al. (2006), a deleção 22q11.2 é a segunda causa mais comum diagnosticada em indivíduos com retardo mental, acometendo aproximadamente 2,4% dos indivíduos com atraso de desenvolvimento.

Na idade pré-escolar, crianças com a deleção 22q11.2 comumente apresentam atraso no desenvolvimento, hipotonia e atrasos de linguagem e na fala (Gerdes et al., 1999). Problemas de equilíbrio como balanço pobre e dificuldades motoras específicas também

são frequentes (Oskarsdottir et al., 2005). Déficits motores significativos em indivíduos com síndromes de deleção 22q11.2 foram revisados por Van Aken et al. (2007).

### **1.6- Região 22q11.2: a deleção e os genes candidatos *HIRA/TUPLE1* e *TBX1***

A região cromossômica 22q11.2, conhecida como região DiGeorge, apresenta seqüências repetidas curtas (LCR, do inglês *low copy repeat sequences*). Recombinações entre as LCRs explicam a recorrência uniforme do tamanho da deleção, comumente de 3Mb (Baumer et al., 1998; Edelman et al.; 1999; Shaik et al., 2000).

Marcadores polimórficos para a região 22q11.2 foram utilizados na genotipagem de mais de 150 indivíduos com SVCF e seus genitores não afetados. Dentre os indivíduos com SVCF mais de 90% possuíam uma deleção similar de aproximadamente 3Mb (Carlson et al., 1997). Entretanto, um em cada 12 indivíduos com SVCF/SDG tem uma deleção menor de 1,5Mb e os sinais observados em indivíduos com esta deleção não são diferentes daqueles observados em indivíduos com a deleção de 3Mb. Assim, pode-se deduzir que essa região de 1,5Mb é fundamental para o desenvolvimento do fenótipo visto nas síndromes de deleção 22q11.2 (Maynard et al., 2002).

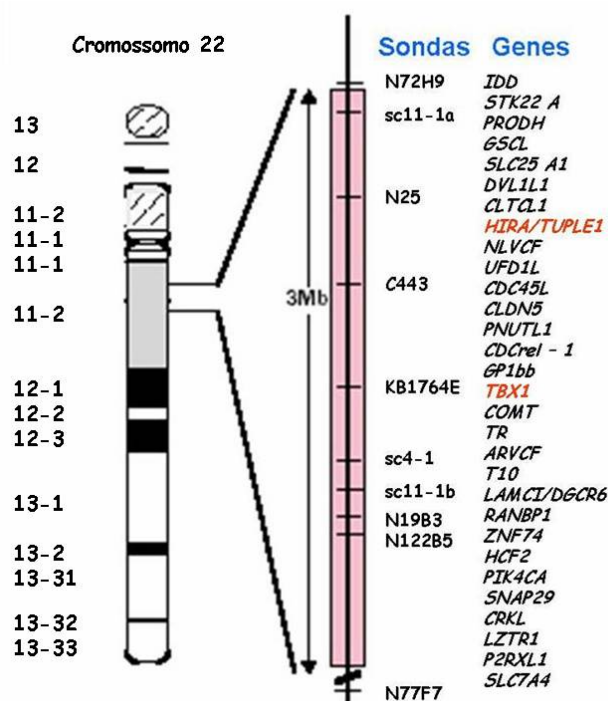
Em um estudo realizado por Sandrin-Garcia et al. (2007) utilizando seis marcadores polimórficos localizados na região 22q11.2, 29 indivíduos com SVCF e seus genitores não afetados foram genotipados. Os indivíduos com SVCF apresentavam face típica e anomalias palatais como insuficiência velofaríngea e fissura palatal (100% dos casos), dificuldade de aprendizagem associada ou não ao retardo mental (93%), distúrbios comportamentais (86%), atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (69%) e anomalias cardíacas (34%). Dentre os 29 indivíduos afetados pela SVCF, 21 apresentavam deleção de algum dos marcadores dentro da região de 3Mb comumente deletada. Entretanto, nenhuma correlação positiva foi detectada entre a extensão de cada deleção encontrada e o fenótipo dos indivíduos.

A técnica de Hibridação *in situ* com Fluorescência (*FISH*), utilizando as sondas D22S75 e *HIRA/TUPLE1* localizadas na região de 3Mb tipicamente deletada, é o exame laboratorial comumente aplicado e aceito para o diagnóstico da deleção 22q11.2. O uso da

sonda *HIRA/TUPLE1* detecta de 85 a 90% dos casos com esta suspeita (Weksberg et al., 2005).

Na região crítica deletada de 1,5Mb localizam-se aproximadamente 30 genes incluindo o gene *HIRA/TUPLE1* e o gene *TBX1* (Maynard et al., 2002). Esses dois genes codificam fatores de transcrição envolvidos na regulação dos processos de desenvolvimento (Halford et al., 1993; Chieffo et al., 1997). Em modelos embrionários de camundongos com a deleção 22q11.2, o nível de expressão desses genes declina de 40 a 60% na massa frontonasal/porção anterior do cérebro (Meechan et al., 2006).

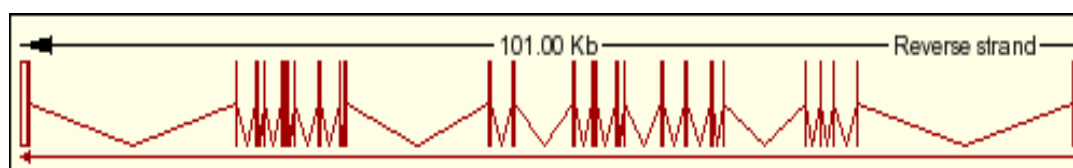
A figura 1.1 apresenta um resumo da localização no cromossomo da região de 3Mb comumente deletada, algumas sondas disponíveis para esta região e os genes, com destaque para os genes *HIRA/TUPLE1* e *TBX1*.



**Figura 1.1-** Marcadores, sondas e genes da região 22q11.2 (adaptado de Yagi et al, 2003).

### 1.6.1- Gene *HIRA/TUPLE* (OMIM 600237)

O gene *HIRA* (*H.sapiens* HIR histone cell cycle regulation defective homolog A) / *TUPLE1* (*H. sapiens* TUP1-like enhancer of split gene 1) localiza-se na região 22q11.2. O cDNA completo desse gene possui 4018 nucleotídeos e 25 exons ricos em CG (Lorain et al., 1996), representados na figura 1.2. Homólogos desse gene são extremamente conservados como genes únicos em espécies eucariontes (Llevadot et al., 1998a; Llevadot et al., 1998b; Roberts et al., 1997) e como genes relacionados, *HIR1* e *HIR2*, em *Saccharomyces cerevisiae* (Sherwood et al., 1993). Os genes *HIR1* e *HIR2* participam da regulação do ciclo celular, agindo sobre a expressão de genes histona (Sherwood et al., 1993; Spector et al., 1997).



**Figura 1.2-** Representação esquemática do gene *HIRA/TUPLE1*, conforme o tamanho dos exons e suas posições (Ensembl Genome Browser).

A família das proteínas HIR inclui HIR1P e HIR2P que são proteínas nucleares e participam da constituição das cromátides ou de seu processo de remodelamento (Osley e Lycan, 1987; Sherwood et al., 1993). O terceiro membro desta família foi descrito por Scamps et al. (1996) e denominado HIRA. Essa proteína possui um domínio N-terminal semelhante à proteína HIR1P, constituído de repetições WD. Cada repetição apresenta cerca de 40 aminoácidos (tamanho) e geralmente terminam com o dipeptídeo triptofano-aspartato (WD). A presença de cada uma das repetições numa proteína sugere o envolvimento dessa na interação proteína-proteína. Além disso, essas repetições são características de proteínas do controle da transcrição gênica (Neer et al., 1994). A proteína HIRIP3 (*HIRA-interacting protein 3*) interage *in vitro* com a proteína HIRA, sendo que o complexo HIRA-HIRIP3 pode ter função em certos aspectos do metabolismo das cromátides e das histonas (Lorain et al., 1998).

Scamps et al. (1996) também relataram que a proteína HIRA em camundongos é 95,3% idêntica à proteína HIRA humana e a sequência do cDNA dos camundongos é 87,7% idêntica ao cDNA do gene *HIRA* humano. Este alto nível de conservação entre espécies sugere que a estrutura tridimensional deve ser extremamente preservada para haver atividade funcional da proteína HIRA.

Hall et al. (2001) sugeriram que a proteína HIRA participa da regulação do ciclo celular. A ativação periódica de complexos ciclina-cdc2 é responsável pela sequência característica dos eventos do ciclo celular como mitose, síntese de DNA, organização das cromátides e outros processos biosintéticos (Hunter e Pines, 1994). A Cdc2 seria a subunidade enzimática de proteínas e a ciclina uma proteína regulatória que controla a capacidade da Cdc2 para fosforilar proteínas alvo adequadas (Junqueira e Carneiro, 2000).

No estudo realizado por Hall et al. (2001) foi identificado que a proteína HIRA contém sequências alvo e substratos de fosforilação para o complexo ciclinas-cdc2. Condizendo com a idéia de que o gene *HIRA/TUPLE1* seja regulador do ciclo celular foi demonstrado que expressão ectópica desse gene causa a suspensão do ciclo celular na fase S. O desenvolvimento espacial adequado de organismos multicelulares requer uma integração fina entre a proliferação celular e a migração celular. Como uma proteína do controle celular, HIRA poderia afetar estes processos (Hall et al., 2001).

A banda cromossômica 22q11 pertence a um grupo de bandas com alta concentração de CG, alta densidade de genes e replicação no momento do estabelecimento da fase S (Federico et al., 1998; Saccone et al., 1999). Em relação à localização, o território do cromossomo 22 foi precisamente localizado no interior do núcleo celular (Boyle et al., 2001; Saccone et al., 2002).

Com a finalidade de se estudar o tempo de replicação e a localização nuclear do gene *HIRA/TUPLE1*, situado na região 22q11.2, D'Antoni et al. (2004) aplicaram o método de *FISH* em núcleos de células linfóides de seis indivíduos com SVCF/SDG e em três indivíduos normais controle. Todos os indivíduos com SVCF/SDG apresentaram deleção 22q11.2 em heterozigose. Os indivíduos controle apresentaram núcleos com tempo de replicação correto, já os resultados dos indivíduos com SVCF/SDG revelaram um



grande número de núcleos com alteração no tempo de replicação da região 22q11.2. Em relação à localização, D'Antoni et al. (2004) confirmaram, a partir da observação dos núcleos celulares dos indivíduos controles, que o gene *HIRA/TUPLE1* geralmente localiza-se no interior do núcleo dos linfócitos T. Entretanto, nos seis indivíduos com SVCF/SDG foi observada localização periférica do gene *HIRA/TUPLE1* em 14% dos núcleos analisados. O tempo de replicação e a localização nuclear dos genes estão relacionados com o padrão de expressão desses (Saccone et al., 2002). Assim, os achados de D'Antoni et al. (2004) sugerem uma possível alteração no padrão de expressão dos genes localizados na região 22q11.2 em indivíduos com SVCF/SDG que não apresentam essa deleção.

Análises da expressão *in situ* do homólogo do gene *HIRA/TUPLE1* em galinhas, durante o desenvolvimento embrionário, foram realizadas por Roberts et al. (1997). A expressão desse gene foi detectada durante o desenvolvimento da placa neural, do tubo neural, durante a migração das células da crista neural, no mesênquima da cabeça e nos arcos branquiais. A partir desses achados, foi sugerido que o gene *HIRA/TUPLE1* pode exercer uma função nas síndromes de deleção 22q11.2. Além disso, a localização, a expressão e a interação com o gene Pax3, expresso durante o desenvolvimento do SNC (Magnaghi et al., 1998), tornam esse gene um ótimo candidato para o fenótipo visto na SDG.

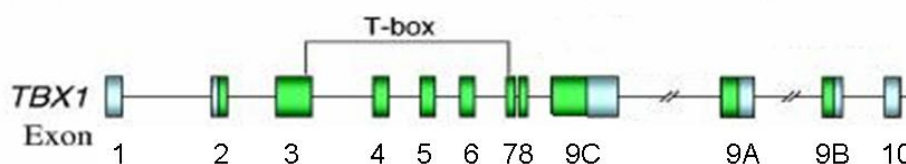
Também em 1997, Wilming et al. analisaram a expressão do homólogo do gene *HIRA/TUPLE1* em camundongos. Foi relatada uma intensa transcrição desse gene nas placas neurais, massa frontonasal, dois primeiros arcos faríngeos, cristas neurais circunfaríngeanas e brotos de membros. Como várias dessas estruturas são afetadas na SDG, Wilming et al. (1997) propuseram que a haploinsuficiência desse gene pode contribuir para determinadas características observadas nessa condição clínica.

#### 1.6.2- Gene *TBX1* (OMIM 602054)

O gene *T-BOX 1* (*TBX1*), localizado na região 22q11.2, é membro de uma família de genes filogeneticamente conservada que possui um domínio de ligação ao DNA, denominado *T-BOX*. A sequência codificadora do gene *TBX1* em humanos tem grande

homologia à sequência dos camundongos, com 86% de nucleotídeos idênticos e 98% de aminoácidos idênticos (Chieffo et al., 1997).

O locus do gene *TBX1* codifica três isoformas diferentes devido a um mecanismo de *splicing* alternativo. A variante *TBX1A* apresenta 1462 nucleotídeos e nove exons. *TBX1B* apresenta 1539 nucleotídeos e 10 exons, sendo que o exon 10 não é codificado (Chieffo et al., 1997). *TBX1C* possui 2082 nucleotídeos e nove exons, sendo esta isoforma altamente conservada em camundongos e é a mais frequentemente transcrita em humanos (Gong et al., 2001). O esquema das variantes do gene *TBX1* está representado na figura 1.3, mostrando que os transcritos diferem nos exons terminais e que o domínio *T-BOX* está delimitado entre os exons 3 e 7.



**Figura 1.3-** Representação esquemática dos transcritos *TBX1A*, *TBX1B* e *TBX1C*. Em verde: seqüências codificantes; em cinza: seqüências não-codificantes (adaptado de Paylor et al., 2006).

Devido ao padrão de expressão do gene *TBX1*, esse se torna um candidato potencial para determinadas anomalias observadas nas síndromes de deleção 22q11.2 (Chapman et al. 1996; Jerome e Papaioannou 2001; Lindsay et al. 2001; Kelly et al. 2004; Zoupa et al. 2006).

Chapman et al. (1996) detectaram expressão do gene *TBX1* no mesoderma anterior embrionário. Quando o embrião está com 9,5 dias pós-concepção (dpc) a expressão desse gene é limitada à região da cabeça, arcos faríngeos (porções mesenquimal e epitelial) e vesícula óptica.

O desenvolvimento dos músculos branquiais é gravemente afetado em camundongos mutantes *TBX1*. Na ausência desse gene, a ativação dos genes de determinação miogênica *MYF5* e *MYOD* é alterada no mesoderma faríngeo. Assim, sugeriu-se que a redução dos níveis de expressão do gene *TBX1* poderia contribuir para a hipotonia faríngea presente em indivíduos com deleção 22q11.2 (Kelly et al., 2004).

Zoupa et al. (2006) analisaram a expressão do gene *TBX1* em murinos durante o desenvolvimento facial e encontraram transcritos em regiões de interação epitelial-mesenquimal, que possuem um papel crucial no desenvolvimento normal da face e apêndices. O gene *TBX1* foi encontrado expresso no epitélio inicial dos processos faciais, incluindo o processo frontonasal, processo nasal e processo palatino medial e lateral. Transcritos também foram detectados no epitélio dos brotos dos dentes em desenvolvimento e em folículos capilares. Juntos, esses domínios de expressão sugerem que o gene *TBX1* tenha um papel na mediação da sinalização epitelial-mesenquimal em regiões da face em desenvolvimento, um achado condizente com o espectro de deformidades faciais encontrado nos indivíduos com SVCF/SDG.

Outros autores relataram a expressão do gene *TBX1* no sistema cardiovascular. Lindsay et al. (2001) demonstraram que o gene *TBX1* é necessário para o desenvolvimento normal das artérias dos arcos faríngeos. Jerome e Papaioannou (2001) relataram que camundongos heterozigotos para uma mutação nula no gene *TBX1* apresentaram anomalias no sistema cardíaco.

Apesar de ser um achado comum, a manifestação de defeitos cardíacos congênitos em indivíduos com a deleção 22q11.2 é variável. A fim de esclarecer esse ponto, Rauch et al. (2004) analisaram a sequência do gene *TBX1* em indivíduos com e sem defeitos cardíacos. Foram encontradas 16 sequências variantes, sendo que sete correspondiam a polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*). Nenhuma das variantes apresentou uma frequência significativamente diferente entre os indivíduos com e sem defeitos cardíacos congênitos e controles normais. Entretanto, uma deleção de 9pb  $\Delta$ AGG379–381 (exon 9C), não detectada em indivíduos controles normais e indivíduos sem defeitos cardíacos, foi encontrada segregando em uma família com defeito de septo ventricular (VSD). A variante V107V (exon 3), detectada em

um menino com atresia pulmonar e VSD, foi a única descrita que afetava um aminoácido conservado, entretanto essa alteração é sinônima.

A triagem de mutações no gene *TBX1*, realizada por Chieffo et al. (1997), em uma amostra de 16 indivíduos com SVCF/SDG mas sem a deleção 22q11.2, não identificou alterações patogênicas. Nesse estudo, a isoforma *TBX1A* foi seqüenciada. Cinco polimorfismos foram encontrados. Apenas uma das variantes detectadas troca C → T na posição 1178 (exon 9A), causava a substituição de aminoácido (Thr → Met), mas essa variante também foi vista em controles normais. Assim, os autores concluíram que mutações no gene *TBX1* provavelmente não estariam associadas ao quadro clínico dos indivíduos dessa amostra.

Gong et al. (2001) analisaram 105 indivíduos com SDG/SVCF, sem a deleção 22q11.2, para mutações na isoforma *TBX1C*. Foram detectados oito polimorfismos comuns e 10 variantes raras. Dentre os polimorfismos, a troca 1189C → A (exon 9C) resultava em mudança de aminoácido no códon 397 (His → Asn). Dentre as variantes raras foram encontradas três deleções, uma inserção, uma duplicação e cinco mutações de troca de um único nucleotídeo. A deleção de 8pb 1274-1281delACTATCTC (exon 9C) causava uma mutação *frameshift*. Esta deleção foi encontrada em uma criança afetada e em sua mãe aparentemente normal, mas não foi encontrada em 139 indivíduos controle.

Em 2003, Yagi et al. realizaram uma triagem de mutações em 13 indivíduos que apresentavam o fenótipo da síndrome de deleção 22q11.2, nos quais essa deleção não foi evidenciada. Duas mutações *missense* e uma *frameshift* foram encontradas. A mutação *missense* F148Y (exon 4), que ocorre na região altamente conservada (domínio *T-BOX*), causa a troca 443T → A e converte um resíduo fenilalanina em tirosina, foi encontrada em um caso esporádico de CAFS/SVCF. Já a mutação *missense* G310S (exon 8), encontrada em um caso esporádico de SDG, causa troca 928G → A e converte um resíduo glicina em serina. A mutação *frameshift* 1223delC (exon 9C) no códon 408 foi encontrada segregando em uma família com o fenótipo de CAFS/SVCF. Stoller e Epstein (2005) comprovaram que essa mutação causava perda de função protéica e deleção de um sinal de localização nuclear C-terminal do gene *TBX1*. Os achados de Yagi et al. (2003) indicam que mutações no gene *TBX1* são responsáveis por cinco características fenotípicas principais da síndrome de

deleção 22q11.2: dismorfismos faciais, defeitos cardíacos, hipoplasia tímica, insuficiência velofaríngea com fissura de palato e disfunção na glândula paratireóide com hipocalcemia.

Paylor et al. (2006) identificaram uma deleção *frameshift* de 23pb denominada 1320-1342del23 (exon 9C) em uma mãe com SVCF e seus dois filhos, sendo que um deles foi diagnosticado como portador da síndrome de Asperger. Essa deleção não foi encontrada em nenhum dos 716 indivíduos controle analisados. Os autores sugeriram que o gene *TBX1* seja candidato para as doenças psiquiátricas vistas em indivíduos com a SVCF e SDG.

Zweier et al. (2007) selecionaram 10 indivíduos sem a deleção 22q11.2, mas com o fenótipo típico dessa deleção para triagem de mutações das três isoformas do gene *TBX1*. A terceira mutação *missense* encontrada nesse gene, de herança paterna, foi descrita em um indivíduo que apresentava face típica da SVCF/SDG. Essa mutação denominada H194Q, troca 582C→ G (exon 5), resulta na substituição de um resíduo histidina por um resíduo glutamina no códon 194 dentro do domínio *T-BOX*. Essa alteração não foi encontrada em 384 indivíduos controle. Nesse trabalho, a ação desta e de outras mutações na atividade de transcrição do gene *TBX1* também foi analisada. Como esperado, a mutação 1223delC, descrita por Yagi et al. (2003), virtualmente não apresentou atividade. Entretanto, as duas mutações *missense* F148Y e G310S, apresentaram um relativo, mas significativo aumento na ativação de transcrição protéica comparado com o tipo selvagem do gene *TBX1*. A mutação H194Q apresentou um aumento ainda maior. Esses achados sugerem que essas três alterações *missense* causam um ganho de função, possivelmente devido a uma estabilização protéica. Além disso, Zweier et al. (2007) concluíram que mutações no gene *TBX1* do tipo ganho de função podem resultar em um espectro fenotípico semelhante aos causados pela haploinsuficiência gênica devido a mutações de perda de função ou deleções.

Uma mutação *de novo* denominada L411P, troca 1232T→ C (exon 9C) foi encontrada em um indivíduo que apresentava tetralogia de Fallot, imunodeficiência de células T e atraso moderado de linguagem. Essa mutação afeta um resíduo conservado em todas as espécies de vertebrados e, por esse motivo, parece ser essencial para o correto funcionamento do gene *TBX1*. Outra mutação denominada -39 C→ T foi encontrada em dois irmãos com tetralogia de Fallot. Essa alteração situa-se na porção 5'UTR do exon 2 e

afeta um resíduo citosina conservado entre espécies, tendo sido previamente descrita como uma variante rara por Gong et al. (2001). Um grupo com 200 indivíduos com distúrbios comportamentais e cognitivos foram triados e dentre estes, três indivíduos foram detectados como portadores desta mutação. Um dos indivíduos apresentava retardo mental e motor grave, atraso de linguagem, hipotonia, atrofia cerebelar e sinais dismórficos como braquicefalia, micrognatia, hipertelorismo ocular, epicanto e orelhas de implantação baixa. O segundo indivíduo apresentava retardo mental e motor, atraso no desenvolvimento, polimicrogíria e sinais dismórficos como hipertelorismo ocular e ponte nasal larga. A triagem de cerca de 400 indivíduos controle para esta alteração não a identificou em nenhum deles (Torres-Juan et al., 2007).

O gene *TBX1* é um gene dose-dependente e a dose pode ser afetada por modificadores genéticos e ambientais (Garg et al. 2001; Zhang et al. 2006).

O gene *Sonic hedgehog (SHH)* é expresso nos arcos faríngeos e é necessário para o normal desenvolvimento craniofacial e do SNC (Chiang et al., 1996; Litingtung et al., 1998). Por esse motivo, Garg et al. (2001) estudaram a interação e a expressão dos genes *SHH* e *TBX1*. Foi detectado que a expressão do gene *TBX1* depende da sinalização do gene *SHH*, o que é condizente com a sobreposição da expressão desses genes nos arcos faríngeos. Yamagishi et al. (2003) também sugeriram que a expressão do gene *TBX1* depende da sinalização do gene *SHH*.

O padrão de expressão do fator de crescimento de fibroblasto 8, o gene *FGF8*, é alterado em mutantes *TBX1*<sup>-/-</sup> e sua expressão é abolida no endoderma faríngeo (Vitelli et al., 2002). Hu et al. (2004) relataram que o gene *FGF8* é ativado pelo gene *TBX1* durante sua expressão no trato cardíaco.

Tanto o ácido retinóico (AR) como o gene *TBX1* são indispensáveis para o desenvolvimento dos arcos faríngeos. Por esta razão, Zhang et al. (2006) estudaram os efeitos do AR no padrão de expressão do gene *TBX1* durante o desenvolvimento dos arcos faríngeos na espécie *zebrafish*. A expressão do gene *TBX1* foi reduzida, e até abolida, nos arcos faríngeos e trato cardíaco nos grupos tratados com AR. Tal resultado sugere que o AR exógeno pode alterar o padrão de expressão do gene *TBX1* em *zebrafish*.

## **2- JUSTIFICATIVA**

Após a revisão da literatura, observa-se uma semelhança dos achados faciais e neurológicos entre DLMFH e as síndromes de deleção 22q11.2, principalmente o hipertelorismo ocular, anomalias no nariz e alterações cerebrais na região da linha média como alterações na estrutura do corpo caloso. Além disso, relatos do envolvimento da região 22q11.2 em indivíduos com fenótipo facial sugestivo de DLMFH (Stratton e Payne, 1997; Gripp et al., 1997 ; Fryns et al., 1993; Kirkpatrick e Pauli, 1998; Schulze et al., 2001) reforçam a hipótese de uma possível etiologia comum para essas condições clínicas, ao menos em parte dos casos, em vista da heterogeneidade clínica dos DLMFH.

Considerando também a expressão dos genes *HIRA/TUPLE1* e *TBX1* no processo frontonasal (Wilming et al., 1997; Zoupa et al., 2006; Meechan et al., 2006) e a relação desses genes com outros envolvidos no processo de desenvolvimento craniofacial e do SNC (Magnaghi et al., 1998; Garg et al., 2001; Vitelli et al., 2002), a investigação da influência da região cromossômica 22q11.2 e desses genes na etiologia dos DLMFH torna-se pertinente.



### **3- OBJETIVOS**

### **3.1- Objetivo geral**

Contribuir para o esclarecimento etiológico dos Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo.

### **3.2- Objetivos específicos**

Verificar a ocorrência de deleção na região 22q11.2 em indivíduos com DLMFH por meio de Hibridação *in situ* com Fluorescência (*FISH*).

Investigar possíveis mutações nos genes candidatos *HIRA/TUPLE1* e *TBX1*, localizados na região 22q11.2 em indivíduos com DLMFH.

## **4- CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### 4.1- Casuística

Este projeto foi aprovado pelo CEP / FCM/ UNICAMP (488/2002 / CONEP 7016) (Anexo I). Após a anuência do participante ou de seu responsável, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

A casuística foi composta por indivíduos com DLMFH, tendo como critério de inclusão o hipertelorismo ocular e o nariz bífido, conforme revisado por Gil-da-Silva-Lopes e Guerra (2007). Foram excluídos casos em que esses sinais, acompanhados de outros, eram sugestivos de um quadro sindrômico previamente conhecido e (ou) com padrão de transmissão estabelecido, a fim de minimizar o efeito gênico e pleiotrópico.

Foram estudados 10 indivíduos, sete mulheres e três homens, atendidos no Ambulatório de Anomalias Craniofaciais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no período de 2001 a 2005. A avaliação dismorfológica foi feita por um geneticista clínico com ficha padronizada de coleta de dados e investigados de acordo com a rotina dismorfológica padrão (AASE, 1990).

A avaliação dismorfológica foi acompanhada de exame de cariótipo pela técnica padrão (bandamento G), realizada no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp e também de avaliação neurológica, exames de ressonância magnética e, em alguns casos, exame de SPECT (Giffoni, 2005). As características clínicas de cada indivíduo são apresentadas no quadro em anexo (Anexo III).

#### 4.2- Métodos

Para a análise da região 22q11.2 em indivíduos com DLMFH, foi empregada a técnica de *FISH* e técnicas de biologia molecular para realizar uma triagem de mutações nos genes *HIRA/TUPLE1* e *TBX1*.

#### 4.2.1- Técnica de FISH

A técnica de *FISH* foi realizada no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp, utilizando protocolo modificado de Pinkel et al. (1986). Essa técnica baseia-se na capacidade de hibridação de sondas de DNA, marcadas por fluorescência, às seqüências que lhes são complementares no DNA genômico permitindo sua visualização e análise (Guerra, 2004).

Para investigação da amostra foi utilizada uma sonda do tipo locus-específica para região 22q11.2 – DiGeorge/VCFS, *HIRA/TUPLE1* locus de 120 Kb espectro *orange* e uma sonda controle telomérica banda 22q13 espectro *green*.

Para a preparação das lâminas foram utilizadas suspensões de linfócitos de sangue periférico, estocadas em solução de metanol e ácido acético (3:1) a -20°C. Antes do procedimento, as lâminas permaneceram à temperatura ambiente em média 24 horas. Em seguida, foram incubadas a 37°C por duas horas em solução de 2XSSC (pH 7,0). Na seqüência, as lâminas foram colocadas em ácido acético 70% e depois em solução PBS1X por um minuto e então lavadas em solução de PBS1X três vezes por quatro minutos cada. Logo após, passaram por uma série de etanóis (70%, 85% e 100%) sendo, depois, lavadas em solução de PBS1X. Em seguida, foram incubadas à temperatura ambiente por seis minutos em solução de 1% formaldeído/ PBS. Depois, as lâminas foram lavadas em solução de PBS1X e novamente passadas na série de etanóis.

Após essa etapa, a sonda foi aplicada em uma área previamente selecionada e marcada com caneta diamante. Em seguida, a área de hibridação foi coberta com uma lamínula e selada com cola especial. Na seqüência, as lâminas foram incubadas a 75 °C por 10 minutos para a desnaturação dos cromossomos e do DNA da sonda. A hibridação ocorreu em caixa umedecida a 37°C por 16 horas. Após a hibridação, as lâminas passaram por um processo de lavagem rápida que utiliza as soluções 0,4XSSC/0,3% Tween 20 a 73 °C e 2X SSC/0,1% Tween 20. Em seguida, o DAPI contracorante foi aplicado.

Foram analisados 20 metáfases e 50 núcleos para cada caso utilizando um microscópio de epifluorescência Olympus (BX51-BF-II/BX2 ®) e um sistema automático de análise de imagem (Applied Spectral Imaging).

As soluções utilizadas para a realização da técnica de *FISH* estão no Anexo IV e o protocolo padronizado da técnica de *FISH* está no Anexo V.

#### 4.2.2- Triagem de mutações para os genes candidatos: *HIRA/TUPLE1* e *TBX1*

##### 4.2.2.1- Coleta das amostras e extração de DNA

Foram coletados de 10 a 20 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O) 10 % pH 8,0 como anti-coagulante. Para obtenção das amostras de DNA genômico utilizou-se o método de extração fenol-clorofórmio (Araújo et al., 1996). O protocolo de extração encontra-se no Anexo VI.

##### 4.2.2.2- Desenho dos oligonucleotídeos

Para a confecção dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes candidatos foram consideradas as seguintes recomendações de Mc Pherson e Moller (2000):

- Tamanho de 18-30 nucleotídeos
- Sequências não capazes de formar estruturas secundárias
- Pares de *primers* com temperaturas de anelamento semelhantes

- **Gene *HIRA/TUPLE1***

Utilizando o programa Gene Runner, foram construídos 52 oligonucleotídeos (26 pares de *primers*) para a amplificação dos 25 exons do gene *HIRA/TUPLE1*.

A sequência dos oligonucleotídeos e o tamanho dos fragmentos estão representados na tabela 4.1.

**Tabela 4.1-** Pares de oligonucleotídeos construídos para a amplificação das regiões exônicas do gene *HIRA/TUPLE1*.

Frag		Seqüência dos primers (5'-3')	Tamanho (pb)
1	sense	TCGCTGTCCGCCGTCCAG	545
	antisense	CAAGTCCTGCCTGTCTCGCC	
2	sense	AGCTGTGTGCCCTTTTCACT	570
	antisense	ATTTTGGCAGCGGATGTATC	
3	sense	CGTCCCCATGAGTACTTATC	457
	antisense	CTGCACACCTGGGTGAGTTA	
4	sense	GATGACCCTTTTGAAATAAT	533
	antisense	TAGCCCTGACCTCATAAGT	
5	sense	CCAGTGCTTTCCAGTTCTT	490
	antisense	TAATGTAGAACTTCCCACGTT	
6	sense	TGCTTTACCCACTGTGTCTC	593
	antisense	GGCAACAGATGTGTCACAGT	
7	sense	TCTGCTTCTGTCTGGTGTGG	448
	antisense	GGATTACCAAGGCTCTCTG	
8	sense	CTTTATCCTCGAGGCCAG	575
	antisense	CACACCTGGCAGCATCAA	
9	sense	GCATCCCTTCTACTTGGC	600
	antisense	TGCTGAAGACTGGGTCTGTG	
10	sense	TGAATAGAGTTGAAGATGCC	502
	antisense	ACTTTACTCCGTCAGTGCAT	
11	sense	ACCAGGAGTTTCCAGCATC	569
	antisense	TGTCACTTTCACCTTCATGG	
12	sense	CTCATTTACTGTCATCCCAG	565
	antisense	GGGGTTTGTTTAGAGTGGTA	
13	sense	TGAATACTGGGGTCAGAGGA	528
	antisense	CAAAGCCCATACTCCTCCTG	
14	sense	CATTCTCCTAAGACATGTG	571
	antisense	GTTCAGGTTTGCACATAGTT	
15	sense	GTGAGTGGCTGGAGTGGTTT	593
	antisense	GTCAACAGCACAGTGGCAGT	
16	sense	AGATTCCGGTGTCTCTTTGT	567
	antisense	ACGCTCTCCCTCAGATGT	
17	sense	TCTGGGTGACCTGCCTTTAC	457
	antisense	CACATGTTCTGGTGCTCTTCA	
18	sense	GGCACTGCTTCTCTTCTCTG	596
	antisense	TGTCATCTCAGTCCCTGCAG	
19	sense	GGGTGATCATCAGAGGCATT	564
	antisense	AGGGAAGGCAGTGGACAA	
20	sense	TAGTGGCACATGGAGAGCAG	512
	antisense	GGACTGTGGGAGCCTAGAGT	
21	sense	GTCCCCAAGAGGTGACAAAA	454
	antisense	TATCTGTGCATGCTCCCCT	
22	sense	GTCAGTGATAGGCGCCTGTG	553
	antisense	CAGATGGCAGGTGCTGGG	
23	sense	ATCACTGGCCCTGTCACTTC	575
	antisense	AGTCAAGGCAGCTCAGCAG	
24	sense	ATCTGTGATTATGGGTCTCA	427
	antisense	TCAGGTCCCAGCATCAGT	
25a	sense	CTTCACTGACACTTGCACTC	578
	antisense	GGTATTACAGCAGACTGACC	
25b	sense	CCAGCAAGGCAGTCCCAG	535
	antisense	TCCCCACACAGTGCATCTC	

- **Gene *TBX1***

Para a amplificação dos exons 1, 3, 6, 7 e 8 os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa Gene Runner.

Para a amplificação dos exons 2, 4, 5 e 9B do gene *TBX1*, a confecção dos oligonucleotídeos foi de acordo com a descrição de Vieira et al. (2005). Embora com as temperaturas de anelamento já definidas no trabalho citado, foi necessária a realização de um gradiente para encontrar a *T<sub>m</sub>* adequada para a amplificação de cada exon.

Para a amplificação da porção transcrita do exon 9 (isoforma C) foi utilizado um par de oligonucleotídeos de acordo com a descrição de Zweier et al. (2007).

A sequência dos oligonucleotídeos e as temperaturas de anelamento estão representadas na tabela abaixo.

**Tabela 4.2-** Pares dos oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para amplificação dos exons do gene *TBX1*. TD: *towch down* de 64°C a 58°C.

Exon	Seqüência do primer (5'-3')	Tamanho (pb)	T <sub>m</sub> (°C)
1	<b>forward:</b> CTCCCAGTCAGGCCTCCTAT <b>reverse:</b> CCCACACTCCTCTTCACCTG	243	59
2	<b>forward:</b> CCATGACGCCATAATCCTCT <b>reverse:</b> CTTCTCTCTGCCCCAGAA	477	56
3	<b>forward:</b> CAGCTCTCGCATTTCTGC <b>reverse:</b> CGGAGGATAGGTGTTAGGA	626	TD 64 - 58
4	<b>forward:</b> GCCAAGCTCCCAGTTGAGTA <b>reverse:</b> CTGAGAGGGCATGGAGTAGG	494	57
5	<b>forward:</b> GCAGCAGAGGGTTCAATCTC <b>reverse:</b> TAGCCTCGCAGGGACTCTAA	458	56
6	<b>forward:</b> CTCAGACCTCAGCCCATTTC <b>reverse:</b> TTTCCAGAGGCGTTGAATC	291	56
7	<b>forward:</b> CTTGGTGCCTTCTCCTAAC <b>reverse:</b> CCCGGCCCTACCTTTCTC	354	63
8	<b>forward:</b> ACTGTGACCCTGAGGACTGG <b>reverse:</b> GGGGTAGAGCGCGCACAG	248	60
9B	<b>forward:</b> GATGGTGTGTGAGGCTGATG <b>reverse:</b> AGCAGCATAACAGCCATTCT	499	59
9C	<b>forward:</b> GACTGGTCGGGGAACACC <b>reverse:</b> AACGTATTCTTGCTTGCCC	693	TD 64 - 58



#### 4.2.2.3- Amplificação dos fragmentos de interesse

A partir do DNA genômico, foi realizada a técnica de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos fragmentos de interesse. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.2.2.4- Componentes e volumes das reações de PCR

- **Gene HIRA/TUPLE1**

Foram testadas diferentes titulações visando a melhor condição de amplificação dos exons desse gene. A seguir, a descrição de algumas titulações que foram realizadas separadamente:

- Concentração de  $MgCl_2$
- Concentração de DMSO
- Concentração de Enhancer de PCR
- Concentração de Formamida
- Gradiente para temperatura de anelamento
- Tentativas em diferentes Termocicladores
- PCR *touch down*

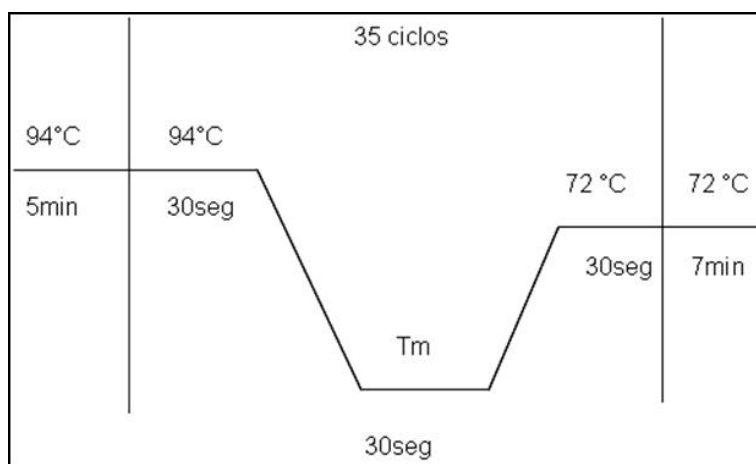
- **Gene TBX1**

Para a amplificação dos exons desse gene foram utilizados protocolos já anteriormente padronizados no laboratório. O protocolo para uma reação incluiu tampão (10X),  $MgCl_2$  (25 $\mu$ M), dNTP (2 $\mu$ M), *primer* (5pmoles), DMSO, *Taq* DNA Polimerase (5U), DNA (200ng/ $\mu$ l) e água até completar o volume final de 15 $\mu$ L. No caso dos exons 3 e 9C foi utilizado um tampão específico da Qiagen. Os componentes e volumes para a amplificação de cada exon encontram-se no anexo V (Tabelas 1 a 6).

#### 4.2.2.5- Condições das reações de PCR

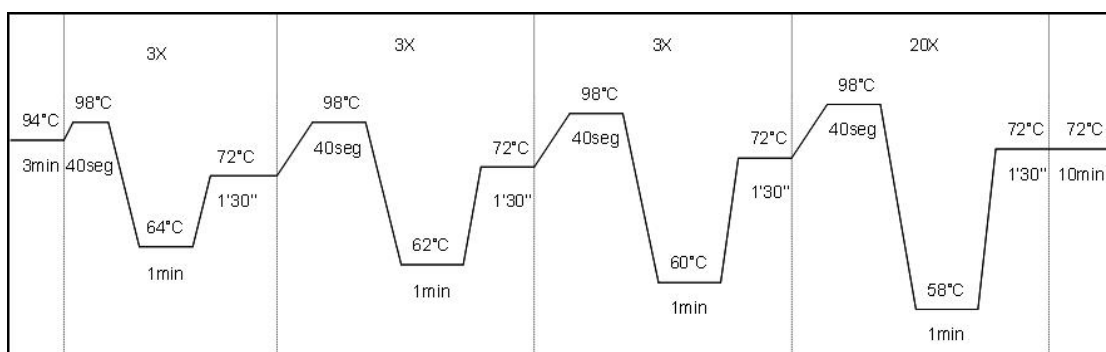
- **Gene *TBX1***

As condições para a amplificação dos exons 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9B estão ilustradas na figura seguinte.



**Figura 4.1-** Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9B.

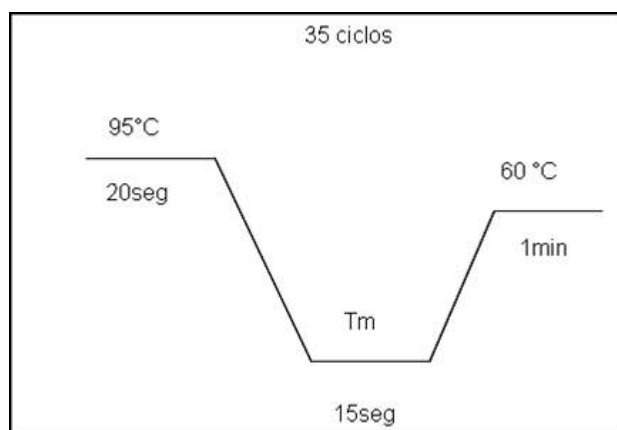
As condições para a amplificação dos exons 3 e 9C estão ilustradas na figura abaixo.



**Figura 4.2-** Ciclos utilizados na amplificação do exons 3 e 9C.

#### 4.2.2.6- Sequenciamento automático

Os fragmentos obtidos foram diretamente seqüenciados. Para tanto foi necessária uma purificação anterior com a enzima Exo-Sap (GE<sup>TM</sup>). Utilizou-se o kit de sequenciamento para MegaBACE 1000 DYEnamic ET (Amersham Biosciences). Os componentes para a reação foram 4µl de pré-mix, 1,0 µl de *primer* (5pmoles), 2 µl do PCR tratado e completar com água para um volume final de 10µl. A condição para a reação está representada na figura abaixo.



**Figura 4.3-** Ciclos utilizados na reação de sequenciamento.

Depois de prontas, as reações foram purificadas utilizando acetato de amônio e etanol, também para remover as impurezas que poderiam atrapalhar o sequenciamento.

As reações foram corridas em seqüenciador MegaABACE<sup>TM</sup> 1000 (Amersham Biosciences) para a determinação da seqüência linear dos fragmentos amplificados.

#### 4.2.2.7- Denaturing High Performace Liquid Chrormatography (dHPLC)

O método de dHPLC foi utilizado para triagem de mutações no exon 3 do gene *TBX1*.

A técnica de dHPLC baseia-se no fato de que, após a desnaturação do DNA, as fitas podem se reanelar aleatoriamente durante um resfriamento gradual, formando duplas-fitas com pareamento perfeito (homoduplex) e duplas-fitas que não possuem um pareamento perfeito (heteroduplex), devido a alterações na sequência de pares de bases. Como as fitas heteroduplex são menos estáveis do que as fitas homoduplex, essas apresentam retenção diferencial em uma coluna de cromatografia em determinadas temperaturas (Xiao e Oefner, 2001).

Para análise da sequência do exon 3, os produtos da PCR foram desnaturados a uma temperatura de 95°C por cinco minutos e deixados em repouso por 45 minutos em temperatura ambiente. Após o reanelamento por resfriamento gradual, os produtos da PCR foram analisados pelo sistema WAVE<sup>®</sup> 4500 (Transgenomic). As temperaturas específicas para análise deste fragmento, definidas pelo software WAVEMAKER<sup>™</sup>, foram: 64,2°C; 65,6°C; 69,8°C; 70,3°C e 72°C.

#### 4.2.2.8- Análise *in silico*

Alterações não sinônimas, que causam substituição de um único aminoácido na sequência protéica, podem ou não alterar a função e a estrutura da proteína. O uso de algoritmos computacionais pode auxiliar na estimativa dessas informações (Chan et al., 2007). Para a análise de uma alteração não sinônima encontrada foram utilizados três testes *in silico*: escala Grantham, algoritmos PolyPhen e SIFT. O nível de concordância entre os resultados desses testes é de 88,1% (Chan et al. 2007).

A escala Grantham, descrita em 1974, calcula o efeito da substituição de um aminoácido na conservação da estrutura protéica, considerando a composição, a polaridade e o volume molecular de cada aminoácido. Segundo a interpretação dessa escala por Li et al. (1984), a substituição de um aminoácido pode ser considerada “conservativa” (valores entre 0-50), “moderadamente conservativa” (valores entre 51-100), “moderadamente radical” (valores entre 101-150) e “radical” (valores acima de 151), de acordo com as diferenças físico-químicas.

O algoritmo PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*; [http:// genetics.bwh.harvard.edu/pph](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph)) estima o efeito da troca de aminoácidos em uma proteína, considerando o nível de conservação da sequência entre genes homólogos e a proximidade da substituição a domínios funcionais e estruturais da proteína (Ramensky et al., 2002). Para isso, a sequência de aminoácidos “selvagem” e a sequência de aminoácidos “alterada” são alinhadas a inúmeras sequências homólogas. Esse alinhamento é utilizado para calcular um escore que aponta a probabilidade de ocorrência de um aminoácido em uma determinada posição e em qualquer posição (*background frequency*). O escore de ambas as sequências são comparados para prever se a substituição tem efeito “benigno” ou “deletério” e determinar se a substituição em questão é ou não observada na família protéica (Chan et al., 2007). Os resultados do escore são classificados em, segundo Xi et al. (2004), “provavelmente deletério” ( $\geq 2.00$ ), “possivelmente deletério” (1.50-1.99), “potencialmente deletério” (1.25-1.49), “limítrofe” (1.00-1.24) ou “benigno” (0.00-0.99).

O algoritmo SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*; [http:// blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html](http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html)) estima se a substituição de um aminoácido afeta a função de uma proteína através do alinhamento de sequências protéicas homologas, baseando-se na premissa de que aminoácidos importantes estarão conservados entre sequências de uma família protéica (Ng e Henikoff, 2001). O programa analisa a sequência solicitada, seleciona sequências protéicas com funções similares a esta, alinha estas sequências a sequência selecionada e, assim, é calculado a probabilidade de ocorrência de todos os aminoácidos em todas as posições possíveis da sequência solicitada em relação ao aminoácido mais frequentemente encontrado em cada posição (Mathe et al., 2006; Chan et al., 2007). Segundo a classificação proposta por Ng e Henikoff (2001) e Xi et al. (2004), as variantes são classificadas em “intolerantes” (escore entre 0.00-0.05), “potencialmente intolerante” (escore 0.051-0.10), “limítrofe” (escores entre 0.101-0.20) e “tolerante” (escores entre 0.201-1.00). Além disso, esse algoritmo calcula a média de conservação da sequência solicitada e valores acima de 3,25 indicam que a sequência está em processo de evolução.

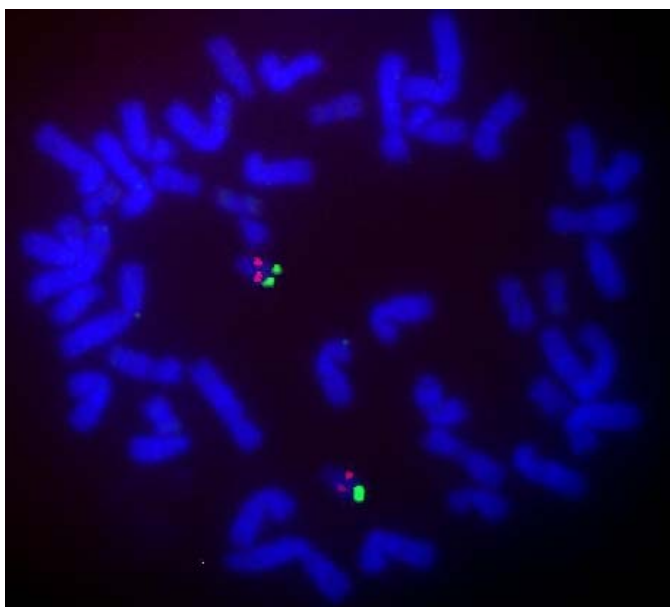
A aplicação desses três testes *in silico* teve como propósito simular o efeito na proteína de uma alteração encontrada no exon 9C do gene *TBX1* durante o presente trabalho.

## **5- RESULTADOS**

### 5.1- Técnica de *FISH*

A técnica de *FISH* permitiu investigar deleção da região 22q11.2 em 10 indivíduos com DLMFH.

Em todos os casos, a contagem de dois sinais verdes e dois sinais vermelhos ficou acima de 90% nos núcleos e em 100% das metáfases analisadas indicando que não houve perda de um fragmento cromossômico de 120Kb (tamanho da sonda utilizada) na região 22q11.2 (figura 4.1). Os resultados finais foram 46,XX. ish 22q11.2 (DiGeorge/VCFS *TUPLE1* x 2) para mulheres e 46,XY. ish 22q11.2 (DiGeorge/VCFS *TUPLE1* x 2) para homens.



**Figura 5.1-** Fotografia de uma metáfase do indivíduo 8, portador de DLMFH. Os pontos verdes indicaram a região controle telomérica e os vermelhos a região 22q11.2. A presença de marcação vermelha indicou que os dois cromossomos 22 encontravam-se íntegros nessa região.

## 5.2- Triagem de mutações dos genes candidatos *HIRA/TUPLE1* e *TBX1*

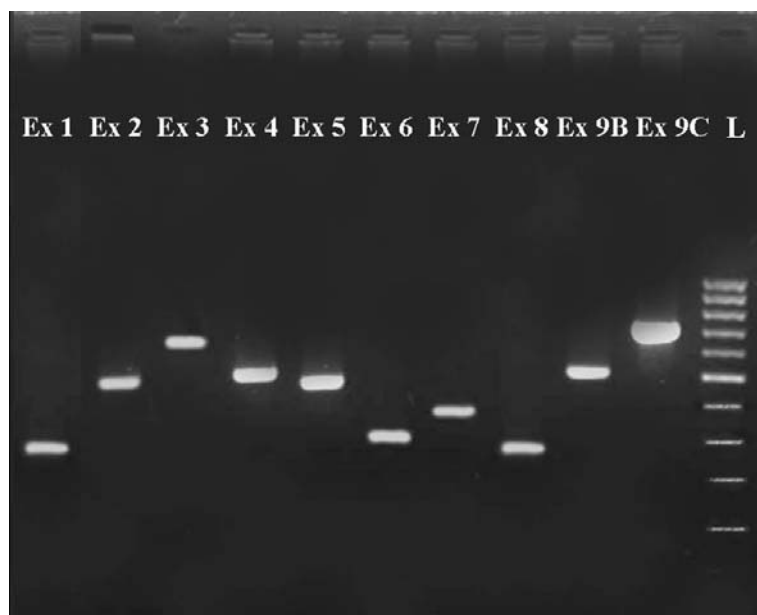
### 5.2.1- Amplificação dos fragmentos

- **Gene *HIRA/TUPLE1***

A despeito de inúmeras tentativas, descritas no item 4.2.2.4, não foi possível encontrar as temperaturas ideais de anelamento e os componentes para a amplificação dos exons desse gene.

- **Gene *TBX1***

A amplificação dos fragmentos de interesse desse gene foi realizada, como demonstrada na figura abaixo.



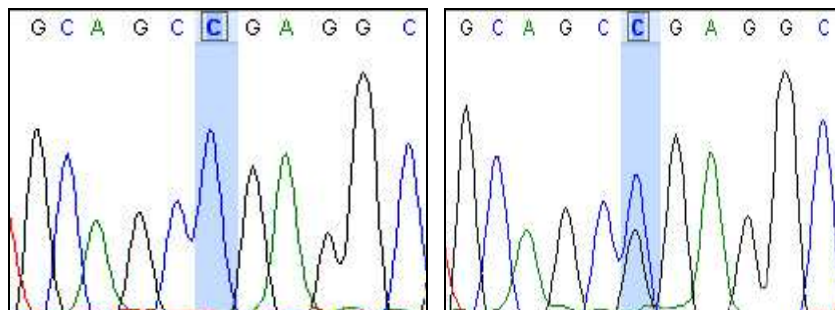
**Figura 5.2-** Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do gene *TBX1*. L: marcador de peso molecular 100pb.



### 5.2.2. Sequenciamento Automático

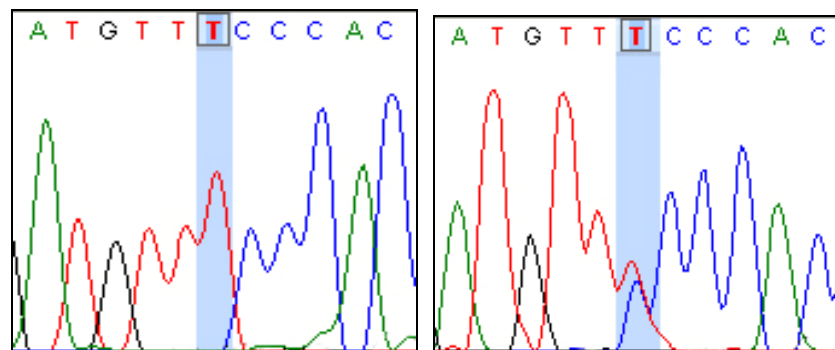
A leitura do sequenciamento dos exons 2, 4, 5, 8 e 9C do gene *TBX1* detectou alterações de sequência para os indivíduos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Os resultados seguem abaixo:

#### Exon 2



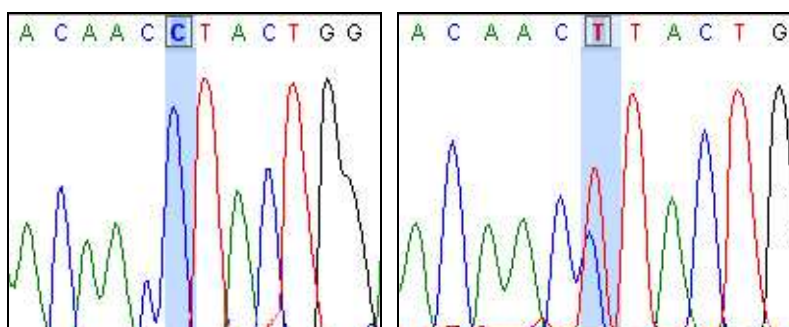
**Figura 5.3-** Troca C → G, exon 2 do gene *TBX1* (rs737868), presente no indivíduo 1.

#### Exon 4



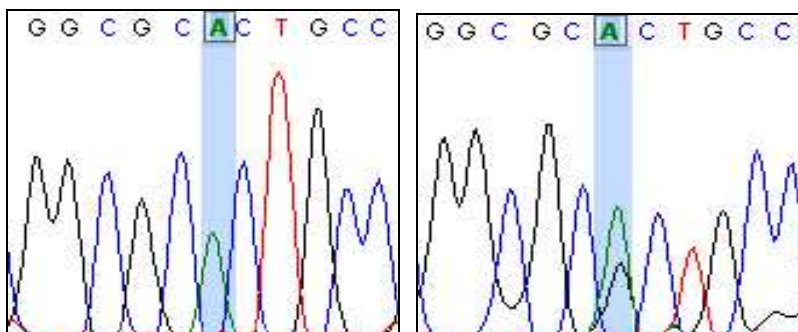
**Figura 5.4-** Troca T → C, exon 4 do gene *TBX1* (rs41298814), presente no indivíduo 3.

### Exon 5



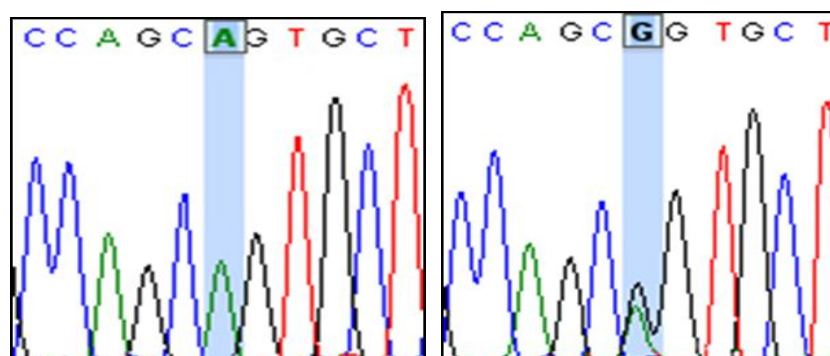
**Figura 5.5-** Troca C→ T, exon 5 do gene *TBX1* (rs2301558), presente no indivíduo 1.

### Exon 8



**Figura 5.6-** Troca A→ G, exon 8 do gene *TBX1* (rs41298840), presente no indivíduo 3.

### Exon 9C



**Figura 5.7-** Troca A→ G, exon 9C do gene *TBX1* (rs13054377), presente no indivíduo 3.

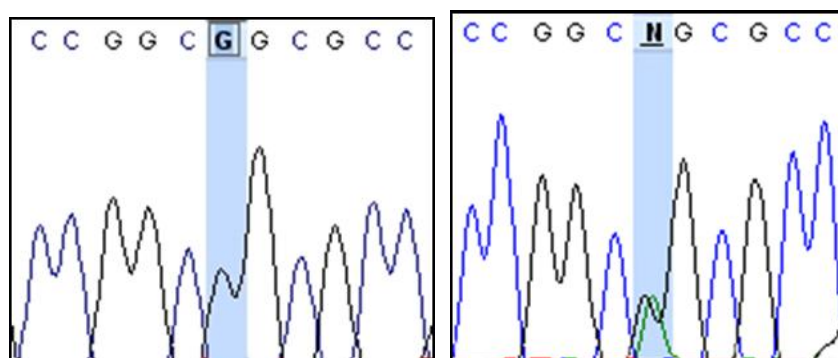
Abaixo segue o resumo dos polimorfismos encontrados nos exons do gene *TBX1* e que estão descritos na base de dados *Entrez SNP* do NCBI.

**Tabela 5.1-** Resumo dos polimorfismos encontrados no gene *TBX1*.

Indivíduos	Posição	SNP	Troca	Sequência
1, 2, 7, 8, 9, 10	exon 2	rs737868	C→G	GTTGCAGC[C/G]GAGGCGGC
3, 6, 10	exon 4	rs41298814	T→C	CGGATGTT[T/C]CCCACCTT
1, 3, 5, 8, 9, 10	exon 5	rs2301558	C→T	CCAACAAC[C/T]TACTGGAC
3, 6, 10	exon 8	rs41298840	A→G	CCCGGCGC[A/G]CTGCCGCT
3	exon 9C	rs13054377	A→G	GGGCCAGC[A/G]GTGCTCGG

A leitura do sequenciamento dos exons 1, 6, 7, 9B do gene *TBX1* não mostrou alterações entre os indivíduos analisados.

O indivíduo 8 apresentou um padrão alterado no exon 9C, troca G → A na posição 1132, códon 378 (GGC → AGC), que substitui um aminoácido glicina por uma serina. Para a confirmação desse resultado, o sequenciamento foi repetido utilizando novos produtos de PCR. Em todos os momentos houve detecção da alteração, como mostrado nas figuras a seguir.



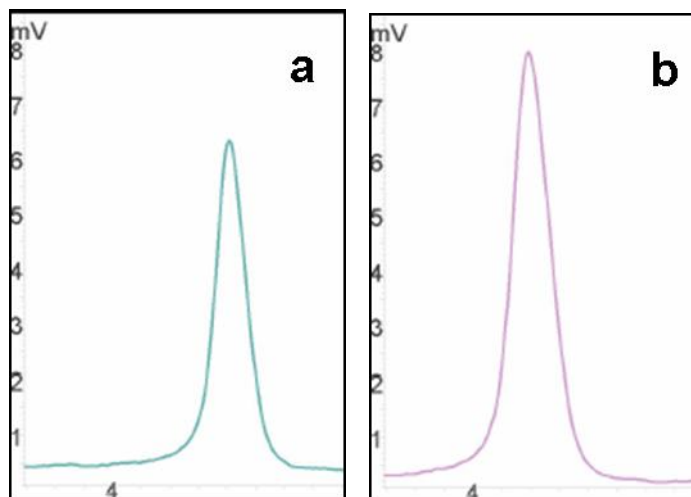
**Figura 5.8-** Troca G→A, exon 9C do gene *TBX1*, presente no indivíduo 8.

Para estimar se essa troca altera a função e a estrutura da proteína codificada pelo gene *TBX1*, foram aplicados três testes *in silico*: escala Grantham, algoritmos PolyPhen e SIFT. A sequência de aminoácidos utilizada nos testes foi obtida na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pela escala Grantham esta alteração é considerada “moderadamente conservativa” (valor 56). O algoritmo PolyPhen alinhou as sequências “selvagem” e “alterada” a 10 sequências homólogas e estimou que essa alteração é “benigna” (escore 0.23). O algoritmo SIFT alinhou a sequência solicitada a 28 sequências homólogas e estimou que essa alteração é “tolerante” (escore 0.21) e a média de conservação da sequência de 3.30.

### 5.2.3- dHPLC

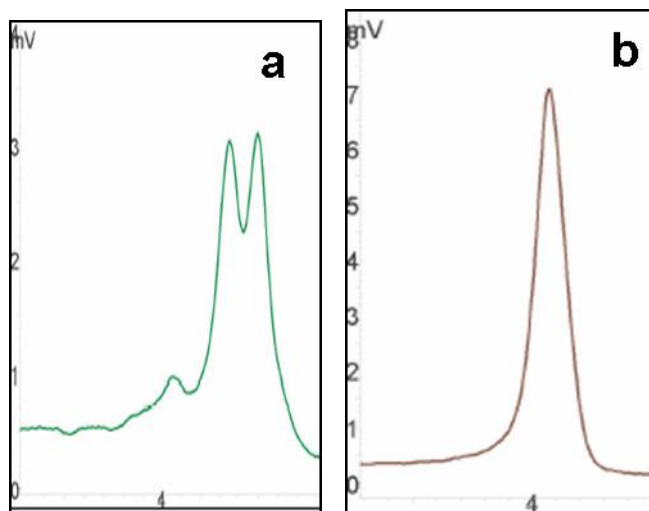
Diversas tentativas de padronização da técnica de sequenciamento para o exon 3 do gene *TBX1* foram realizadas sem sucesso. Por este motivo, foi utilizado o método de triagem de mutações dHPLC. Nessa técnica foram analisados oito indivíduos da casuística e cinco indivíduos controle. Posteriormente, para confirmação de uma alteração encontrada no dHPLC, o sequenciamento pôde ser realizado utilizando um novo par de oligonucleotídeos descrito por Zweier et al. (2007).

Os resultados gerados pelo software WAVEMAKER<sup>TM</sup> revelaram semelhança entre os perfis cromatográficos dos indivíduos 1, 2, 6, 7, 8, 9 e 10 e os indivíduos controle em todas as cinco temperaturas, como representado nas figuras seguintes.



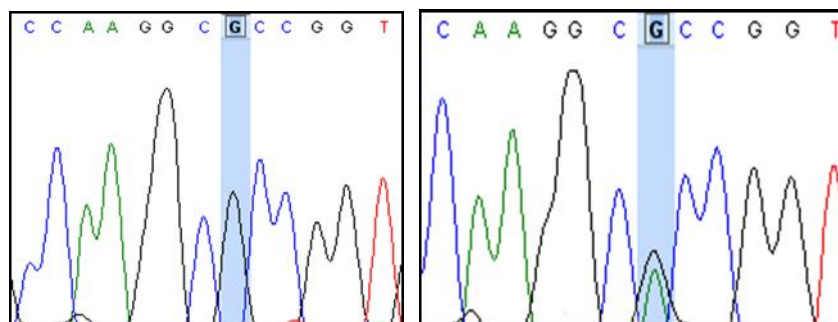
**Figura 5.9-** Perfil cromatográfico indivíduo 7 (a) e indivíduo controle (b) à temperatura de 64,2°C.

O indivíduo 5 apresentou perfil cromatográfico alterado, em comparação aos indivíduos controle na temperatura 69,8°C, como observado nas figuras abaixo.



**Figura 5.10-** Perfil cromatográfico do indivíduo 5 (a) e indivíduo controle (b) à temperatura de 69,8°C.

O posterior sequenciamento do exon 3 do indivíduo 5 foi realizado e mostrou a troca G → A na posição 297, como apresentado na figura 5.11.



**Figura 5.11-** Troca **G → A**, exon 3 do gene *TBX1*, presente no indivíduo 5.

Em relação aos indivíduos 3 e 4, o sequenciamento direto, utilizando os *primers* descritos por Zweier et al. (2007), não identificou alterações de sequência.

## **6- DISCUSSÃO**

Os 10 indivíduos com DLMFH, todos casos isolados, já haviam sido cuidadosamente estudados anteriormente. Outros protocolos previamente definidos como avaliação clínica, citogenética, avaliação morfológica (ressonância magnética) e investigação funcional (eletroencefalografia e/ou tomografia por emissão de fóton único) do SNC já tinham sido realizados. Através do exame de cariótipo preliminar selecionou-se uma amostra de indivíduos com cariótipo normal. A alteração encontrada no indivíduo 7 foi considerada um heteromorfismo cromossômico. A avaliação clínica e neurológica detectaram tanto alterações de face como alterações no SNC de modo estrutural ou funcional, apontando principalmente malformações do desenvolvimento cortical e alterações perfusionais e, ainda, envolvimento cerebelar.

Embora tenha-se procurado formar um grupo de indivíduos homogêneo que apresentassem apenas dismorfismos faciais observou-se que alguns indivíduos apresentavam sinais extra-faciais. O indivíduo 9, descrito por Gil-da-Silva Lopes et al. (2004), apresentava um conjunto de sinais que não se enquadrava em nenhuma classificação e, por esta razão, os autores levantaram a hipótese de uma possível “nova” condição.

Houve uma prevalência de mulheres afetadas, porém na literatura não há nenhum dado sobre predominância de sexo em DLMFH, principalmente devido à heterogeneidade clínica e à dificuldade diagnóstica. O fato de a casuística ser composta de mais mulheres pode ter ocorrido apenas ao acaso, provavelmente pela raridade do quadro e pelo tamanho amostral.

Considerando a heterogeneidade clínica e etiológica dos DLMFH, ainda não existem bases moleculares estabelecidas para essa condição. Através de revisão da literatura, levantou-se a hipótese de que alterações na região 22q11.2 pudessem ter participação ativa na gênese de parte dos casos de DLMFH.

Embora nesse estudo tenhamos empregado a sonda comercial 22q11.2 - DiGeorge/VCFS (Vysis<sup>TM</sup>), que detecta de 85 a 90% dos casos com suspeita dessa deleção (Weksberg et al., 2005) e que cobre o locus do gene *HIRA/TUPLE1*, apontado por alguns autores como candidato responsável por determinadas características vistas nas



síndromes de deleção 22q11.2 (Roberts et al., 1997; Wilming et al., 1997; D'Antoni et al., 2004), a deleção 22q11.2 não foi encontrada nos 10 indivíduos analisados. Apesar desse resultado, não podemos descartar a hipótese da localização no núcleo celular do gene *HIRA/TUPLE1* estar alterada, conforme observado por D'Antoni et al. (2004). Contudo, a confirmação desta hipótese não pôde ser feita no presente trabalho, já que o método exige análise em 3D. Além disso, apesar do alto índice de detecção dos casos com suspeita de deleção 22q11.2 utilizando essa sonda, devemos considerar que a mesma é específica para o locus do gene *HIRA/TUPLE1* e, portanto, não cobre toda a região de 3Mb comumente deletada.

Devido aos resultados negativos, obtidos pela técnica de *FISH*, o sequenciamento do gene *HIRA/TUPLE1* tornou-se necessário, sendo também optado por sequenciar o gene *TBX1*. Não há na literatura nenhuma descrição anterior sobre qualquer tipo de *screening* para o gene *HIRA/TUPLE1*. Sendo assim, nosso trabalho iniciou-se com o desenho dos oligonucleotídeos para a amplificação dos exons e toda a padronização das etapas da PCR. Diversas tentativas de padronização foram testadas, entretanto essas não foram satisfatórias. A extrema dificuldade na padronização da amplificação dos exons desse gene se justifica pelo fato de os fragmentos serem ricos em CGs. Esses pares de bases são mais estáveis e, assim, a desnaturação da dupla fita de DNA, necessária para a amplificação da sequência, torna-se difícil (Mc Pherson e Moller, 2000).

Dentre outros fatores, anteriormente relatados, o estudo molecular do gene *TBX1* foi realizado considerando que existem mutações descritas nesse gene em casos de indivíduos com fenótipo das síndromes de deleção 22q11.2 (Yagi et al., 2003; Paylor et al., 2006; Torres-Juan et al., 2007; Zweier et al., 2007).

A análise dos sequenciamentos desse gene para a presente casuística revelou alterações de sequência, tornando-se necessário identificar o tipo dessas alterações. Bancos de dados contendo polimorfismos já descritos na literatura, como o *Entrez SNP* do NCBI, foram pesquisados.

A troca C → G encontrada no exon 2 compreende um SNP validado, denominado rs737868, descrito na região 5'UTR do gene *TBX1*. Funke et al. (2007) descrevem que esse polimorfismo não apresenta associação a distúrbios psíquicos que

podem ser encontradas em indivíduos com síndromes de deleção 22q11.2. As alterações encontradas nas regiões transcritas dos exons 4 (rs41298814), 5 (rs2301558), 8 (rs41298840) e 9C (rs13054377) são sinônimas, ou seja, não há troca de aminoácido e estão validadas como SNPs.

A alteração encontrada no exon 9C (indivíduo 8) não está descrita na base de dados do *Entrez SNP* do NCBI como SNP e também não está descrita como mutação na base de dados do HGMD (*Human Genome Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff*) disponível em [www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk). Essa alteração não-sinônima causa a troca do aminoácido no códon 378 de glicina para serina. Os resultados dos testes *in silico* foram semelhantes. Pela escala Grantham, essa alteração foi considerada “moderadamente conservativa”, sugerindo que as propriedades físico-químicas desses aminoácidos são semelhantes e, deste modo, tal troca não prejudicaria de forma significativa a estrutura e a função da proteína. Os algoritmos PolyPhen e SIFT estimaram que essa alteração é “benigna” e “tolerante”, respectivamente, sendo que cada um comparou a sequência solicitada a 10 e 28 sequências homólogas. Isso ocorreu, provavelmente, pelo fato de a estrutura da proteína codificada pelo gene *TBX1* não estar totalmente caracterizada. Além disso, o algoritmo SIFT estimou a média de conservação da sequência em 3.30, o que sugere que essa sequência de aminoácidos está em processo de evolução. Esses resultados indicam que, apesar da sequência da proteína *TBX1* estar em processo de evolução e a sequência dessa ter sido comparada a um limitado número de sequências homólogas, a alteração G378S já foi encontrada em outras espécies. Isto reforça a estimativa de que essa alteração é benigna. Entretanto, os resultados desse tipo de análise não podem ser considerados conclusivos já que apenas a investigação experimental do efeito dessa mutação na proteína *TBX1* poderá elucidar as suposições apresentadas. Considerando esses resultados, o fato de a amostra ser pequena, a alteração ter sido encontrada em apenas um indivíduo e a raridade da condição, não podemos afirmar se essa alteração está ou não diretamente relacionada ao fenótipo visto de DLMFH. Para tanto, investigações posteriores dessa alteração em uma amostra maior de indivíduos afetados e em um grupo controle de indivíduos tornam-se necessárias.

No caso do exon 3 do gene *TBX1*, a técnica de PCR foi padronizada, entretanto o sequenciamento desse exon não foi possível, já que o resultado dos eletroferogramas não apresentava resolução necessária para a leitura dos dados. A fim de solucionar o problema, aditivos que auxiliam a reação de sequenciamento foram utilizados como DMSO e Enhancer, porém sem sucesso. Por esses motivos, o método de triagem de mutações dHPLC foi empregado. Posteriormente, utilizando um par de oligonucleotídeos descrito por Zweier et al. (2007), nos casos em que houve necessidade, o sequenciamento pôde ser realizado.

Os resultados da triagem por dHPLC mostraram alteração no perfil cromatográfico do indivíduo 5, o que poderia indicar alterações na sequência de bases deste exon. A técnica de sequenciamento detectou a troca 297G → A considerada sinônima, pois não altera o aminoácido (Alanina/Alanina) no códon 99. Essa alteração foi descrita por Gong et al. (2001) como um polimorfismo comum em um estudo com 105 indivíduos com SDG/SVCF sem a deleção 22q11.2. Posteriormente em 2004, essa alteração foi descrita como uma variante rara (frequência < 0,10) por Rauch et al. Entretanto, a frequência dessa alteração não apresentou diferença significativa entre os indivíduos com e sem defeitos cardíacos congênitos e em relação aos controles normais analisados no trabalho.

Neste trabalho, apenas os exons e as junções intron-exons do gene *TBX1* foram analisadas. Por esse motivo, mutações em regiões regulatórias, consideradas conservadas e semelhantes ao homólogo desse gene em camundongos (Gong et al., 2001), não foram identificadas. Assim, uma triagem de mutações nessas regiões controladoras poderia permitir uma análise mais completa.

Apesar de o tamanho da amostra ser considerada relevante, considerando que os DLMFH são raros, em vista do tamanho amostral e da heterogeneidade clínica e etiológica, o presente trabalho não pôde relacionar o envolvimento da região 22q11.2 na patogênese dos DLMFH. Por essas razões, consideramos que cada caso dessa condição deve ser analisado individualmente com a finalidade de prover um adequado atendimento aos seus portadores.

## **7- CONCLUSÕES**

Considerando os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

1. Não foi detectada deleção na região 22q11.2 nos 10 indivíduos com DLMFH analisados por FISH.
2. A triagem de mutações no gene *HIRA/TUPLE1* não pôde ser realizada, devido a problemas técnicos, impossibilitando a investigação de alterações nesse gene nos casos de DLMFH.
3. Foi encontrada a troca 1132G → A no gene *TBX1* (exon 9C) em um indivíduo (caso 8). Contudo, a relação desta com o fenótipo dos DLMFH não pôde ser estabelecida.
4. Estudos posteriores em casuísticas maiores e em grupo controle poderiam elucidar o papel da troca 1132G → A (exon 9C) em DLMFH.

Por tanto, o presente trabalho não pôde estabelecer uma relação patogênica entre os DLMFH e a região 22q11.2.

## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AASE JM. Diagnostic dysmorphology. New York: Plenum Medical Book Company, 1990; 299p.

American Cleft Palate-Craniofacial Association. Parameters for Evaluation and treatment of patients with cleft lip/palate or other craniofacial anomalies. Chapel Hill, 2000; 30p.

Araújo M, Sanches MR, Suzuki LA, Guerra JRG, Farah SB, Mello MP. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29: 1-13.

Baumer A, Dutly F, Balmer D, Riegel M, Tükel T, Krajewska-Walasek M, Schinzel A. A high level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 1998; 7(5):887-894.

Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 211 –219.

Burn J. Closing time for CATCH22. *J. Med. Genet.* 1999; 36: 737-738.

Campbell LE, Daly E, Toal F, Stevens A, Azuma R, Catani M, Virginia NG, van Amelsvoort T, Chitnis X, Cutter W, Murphy DGM, Murphy KC. Brain and behaviour in children with 22q11.2 deletion syndrome: a volumetric and voxel-based morphometry MRI study. *Brain* 2006; 129, 1218–1228.

Carey AH, Kelly D, Halford S, Wadey R, Wilson D, Goodship J, et al. Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 964-970.

Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, et al. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: 620-629.

Chan PA, Duraisamy S, Miller PJ, Newell JA, McBride C, Bond JP, Raevaara T, Ollila S, Nystrom M, Grimm AJ, Christodoulou J, Oetting WS, Greenblatt MS. Interpreting Missense Variants: Comparing Computational Methods in Human Disease Genes

CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and Tyrosinase (TYR). *Human Mutation* 2007; 28(7): 683- 693 .

Chapman DL. et al. Expression of the T-box family genes, Tbx1–Tbx5, during early mouse development. *Dev. Dyn.* 1996; 206: 379–390.

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996; 383: 407–413.

Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML. Isolation and Characterization of a Gene from the DiGeorge Chromosomal Region Homologous to the Mouse Tbx1 Gene. *Genomics* 1997; 43: 267–277.

Chow E, Zipursky RB, Mikulis D. MRI findings in adults with 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *Schizophr Res* 1999; 138:89.

Cohen MMJr. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *Am J Med Genet* 2002; 115: 245-268.

Cohen MMJr, Sedano HO, Gorlin RJ, Jirasek JE. Frontonasal dysplasia (median cleft face syndrome): Comments on etiology and pathogenesis. *Birth Defects. OAS, White Plains,* 1971; 7: 117-119.

D’Antoni S, Mattina T, Di Mare P, Federico C, Motta S, Saccone S. Altered replication timing of the Hira/Tuple1 locus in the DiGeorge and Velocardiofacial syndromes. *Gene* 2004; 333: 111-119.

DeMyer W. The median cleft face syndrome: Differential diagnosis of cranium bifidum occultum, hypertelorism, and median cleft nose, lip, and palate. *Neurology* 1967; 17: 961-971.

Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, Van Thienen MN, Keymolen K. The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet* 1998; 35: 789-790.

Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, Shprintzen RJ, Saal HM, Zonana J, Jones MC, Mascarello JT, Emanuel BS. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1992; 44: 261-268.



Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. Low-copy repeats mediate the common 3Mb deletion in patients with the velocardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 1999; 64(4): 1076-1086.

Eliez S, Schmitt JE, White CD, Reiss AL. Children and adolescents with velocardiofacial syndrome: a volumetric MRI study. *Am J Psychiatry* 2000; 157(3): 409–415.

Ensembl Genome Browser. [acesso em 05/10/2006]. Disponível em: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000100084](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000100084)

Federico C, Saccone S, Bernardi G. The gene-richest bands of human chromosomes replicate at the onset of the S-phase. *Cytogenet. Cell Genet* 1998; 80:83–88.

Fryns JP, Kleczkowska A, Van Der Berghe H. Frontonasal malformation and reciprocal translocation t (15;22) (q22;q13). *Clin Genet* 1993; 44: 46-47.

Funke BH, Lencz T, Finn CT, DeRosse P, Poznik GD, Plocik AM, Kane J, Rogus J, Malhotra AK, Kucherlapati R. Analysis of TBX1 Variation in Patients with Psychotic and Affective Disorders. *Mol Med* 2007; 13: 407-414.

Gabrielli O, Salvolini U, Bonifazi V, Ciferri L, Lanza R, Rossi R, et al. Morphological studies of the corpus callosum by MRI in children with malformative syndromes. *Neurology* 1993; 35(2):109-12.

Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriyi IS, Yamagishi H, Srivastava D. Tbx1, a DiGeorge Syndrome Candidate Gene, Is Regulated by Sonic Hedgehog during Pharyngeal Arch Development. *Developmental Biology* 2001; 235: 62–73.

Gerdes M, Solot C, Wang PP, Moss E, LaRossa D, Randall P, Goldmuntz E, Clark BJ, Driscoll DA, Jawad A, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Batshaw ML, Zackai EH. Cognitive and Behavior Profile of Preschool Children With Chromosome 22q11.2 Deletion. *American Journal of Medical Genetics* 1999; 85: 127–133.

Giachetti CM. Achados fonoaudiológicos em indivíduos com agenesia de corpo caloso [Tese - Doutorado]. Bauru (SP): Universidade de São Paulo, 1996.

Giffoni SAD. Estudos de neuroimagem quantitativa em indivíduos com anomalias craniofaciais [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2005.

Giffoni SAD, Goncalves VMG, Zanardi VA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Angular analysis of corpus callosum in 18 patients with frontonasal dysplasia. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; 62(2A):195-8.

Giffoni SDA, Gonçalves VMG, Zanardi VA, Gil-da-Silva-Lopes VL. Cerebellar involvement in midline facial defects with ocular hypertelorism. *Cleft Palate Craniofac J*. 2005; 43 (4): 466-70.

Gil-da-Silva-Lopes VL. A Malformação Frontonasal: estudo genético-clínico de 31 pacientes não portadores de quadros sindrômicos já definidos [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 1997.

Gil-da-Silva-Lopes VL, Giffoni SD. Central nervous system abnormalities on midline facial defects with hypertelorism detected by magnetic resonance image and computed tomography. *Arq Neuropsiquiatr*. 2006; 64(4): 916-20.

Gil-da-Silva-Lopes VL, Guion-Almeida ML, Giffoni SAD. Frontonasal dysplasia, neuronal migration error and lymphoedema of limbs. *Clin Dysmorphol* 2004; 13(1):35-7.

Gil-da-Silva-Lopes VL, Maciel-Guerra AT. A clinical study of 31 individuals with midline facial defects with hypertelorism and a guideline for follow-up. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007;65(2B):396-401.

Goldberg R, Motzkin B, Marion R, Scambler PJ, Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: a review of 120 patients. *Am J Med Genet* 1993; 45(3):313-9.

Gollop TR. Fronto-facio-nasal dysostosis - a new autosomal recessive syndrome. *Am J Méd Genet* 1981; 10(4):409-12.

Gong W, Gottlieb S, Collins J, Blescia A, Dietz H, Goldmuntz E, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Emanuel BS, Driscoll DA, Budarf ML. Mutation analysis of TBX1 in non-deleted patients with features of DGS/VCFS or isolated cardiovascular defects. *JMG* 2001; 38:e45.

Gorlin R, Cohen MMJr, Levin LS. Syndromes of the Head and Neck. 3th ed. New York: Oxford University Press, 1990. p977.

Grantham R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. Science, New Series, 1974; Vol. 185, No. 4154 , pp. 862-864.

Gripp KW, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Reed LA, Emanuel BS, Zackai EH. Nasal dimple as part of the 22q11.2 deletion syndrome. Am J Med Genet 1997; 69(3):290-2.

Guerra M. FISH Conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.

Guion-Almeida ML. Estudo genético clínico da disostose frontonasal. [Tese – Mestrado] Bauru (SP): Universidade de São Paulo, 1991.

Guion-Almeida ML. Hipertelorismo e Defeitos de Linha Média Facial – Estudo genético clínico de uma amostra de pacientes [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2000.

Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A, Cohen MM JR. Frontonasal Dysplasia: analysis of 21 cases and literature review. Int J Oral Maxillofac Surg 1996; 25: 91-97.

Halder A, Fauzdar A, Kabra M, Saxena A. Detection of 22q11.2 Hemizygous Deletion by Interphase FISH in a Patient with Features of CATCH22 Syndrome. Indian Pediatrics 2005; vol 42.

Halford S, Wadey R, Roberts C, Daw SC, Whiting JA, O'Donnell H , Dunham I, et al. Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. Hum Mol Genet 1993; 2(12):2099-107.

Hall C, Nelson DM, Ye X, Baker K, Decaprio JA, Seeholzer S, et al. HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. Molecular and Cellular Biology 2001; p 1854-1865.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II Cyclin D and CDK inhibitors come of age. Cell 1994; 79:573-582.

Hu T, Yamagishi H, Maeda J, McAnally J, Yamagishi C, Srivastava D. Tbx1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development* 2004; 131: 5491-5502.

Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nature Genet.* 2001; 27: 286-291.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2000; p-187-90.

Kelly RG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomeric myogenesis. *Human Molecular Genetics* 2004; Vol. 13, No. 22

Kirkpatrick SJ, Pauli RM. Frontonasal Malformation and Deletion of 22q11. *American Journal of Medical Genetics* 1998; 75: 443–444.

Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, Jurecic V, Ogunrinu G, Sutherland HF, Scambler PJ, Bradley A, Baldini A. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 2001; 410: 97-101.

Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat. Genet.* 1998; 20: 58–61.

Li WH, Wu CI, Luo CC. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J Mol Evol* 1984; 21:58 – 71.

Llevadot R, Estivill X, Scambler P, Pritchard LE. Isolation and genomic characterization of the TUPLE1/HIRA gene of the pufferfish *Fugu rubripes*. *Gene* 1998a; 208: 279-283.

Llevadot R, Marques G, Pritchard M, Estivill X, Ferrus A, Scambler P. Cloning, chromosome mapping and expression analysis of the HIRA gene from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998b; 249: 486-491.

Lorain S, Demczuk S, Lamour V, Toth S, Aurias A, Roe BA, Lipinski M. Structural Organization of the WD repeat protein-encoding gene HIRA in the DiGeorge syndrome critical region of human chromosome 22. *Genome Res* 1996; 6(1): 43-50.

Lorain S, Quivy JP, Monier-Gavelle F, Scamps C, Lecluse Y, Almouzni G, Lipinski M. Core histones and HIRIP3, a novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein HIRA. *Molec Cell Biol* 1998; 18: 5546-5556.

Lynch DR, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Emanuel BS, Driscoll DA, Whitaker LA, Fischbek KH Cerebellar atrophy in a patient with velocardiofacial syndrome. *J Med Genet* 1995; 32: 561-563.

Machado AMC, Simon TJ, Nguyen V, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Gee JC. Corpus callosum morphology and ventricular size in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Brain Research* 2007; 1131: 197 – 210.

Magnaghi P, Roberts C, Lorain S, Lipinski M, Scambler PJ. HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nature Genet* 1998; 20: 74-77.

Martínez-Frías ML. Primary midline developmental field I. *Am J Med Genet* 1995; 56: 374-381.

Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Research* 2006; Vol. 34, No. 5 1317-1325.

Matsuoka R, Kimura M, Scambler PJ, Morrow BE, Imamura S, Minoshima S, et al. Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Hum. Genet* 1998; 103: 70-80.

Maynard TM, Haskell GT, Lieberman JA, LaMantia AS. 22q11 DS: genomic mechanisms and gene function in DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *Int. J. Devl Neuroscience* 2002; 407-419.

MC Pherson MJ, Moller SG. PCR: The basics from background to bench. BIOS Scientific Publishers Limited 2000; pag. 27 a 29.

Meechan DW, Maynard TM, Wu Y, Gopalakrishna D, Lieberman JA, LaMantia AS. Gene dosage in the developing and adult brain in a mouse model of 22q11 deletion syndrome. *Mol. Cell. Neurosci.* 2006; 33: 412-428.

Moss EM, Batshaw ML, Solot CB, Gerdes M, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Wang PP: Psychoeducational profile of the 22q11.2 microdeletion: a complex pattern. *J Pediatr* 1999; 134:193–198.

Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 1994; 22: 371(6495): 297-300.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001;11:863 – 74.

Noordhoff MS, Cheng WS. Median facial dysgenesis in cleft lip and palate. *Ann Plast Surg* 1982; 8:83-92.

Opitz JM, Gilbert EF. CNS anomalies and the midline as a "developmental field". *Am J Med Genet* 1982b; 12:443-455.

Opitz JM. The developmental field concept in clinical genetics. *J Pediatr* 1982a;101: 805-809.

Oskarsdottir S, Belfrage M, Sandstedt E, Viggedal G, Uvebrant P. Disabilities and cognition in children and adolescents with 22q11 deletion syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 177–184.

Osley MA, Lycan D. trans-Acting Regulatory Mutations That Alter Transcription of *Saccharomyces cerevisiae* Histone Genes. *Molecular and Cellular Biology* 1987; Vol. 7, No. 12 p. 4204-4210.

Pascual-Castroviejo I, Pascual-Pascual SI, Perez-Higueras A. Fronto-nasal dysplasia and lipoma of the corpus callosum. *Eur J Pediatr* 1985; 144(1):66-71.

Paylor R, Glaser B, Mupo A, Ataliotis P, Spencer C, Sobotka A, Sparks C, Choi C-H, Oghalai J, Curran S, Murphy KC, Monks S, Williams N, O'Donovan MC, Owen MJ,

Scambler PJ, Lindsay E. Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006; 103: 7729-7734.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; Vol. 83, pp. 2934-2938.

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human no-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research* 2002; Vol. 30 No. 17.

Rauch A, Devriendt K, Koch A, Rauch R, Gewillig M, Kraus C, Weyand M, Singer H, Hofbeck M, Reis A. Assessment of association between variants and haplotypes of the remaining TBX1 gene and manifestations of congenital heart defects in 22q11.2 deletion patients. *J. Med. Genet* 2004; 41-40.

Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Huffmeier U, Thiel C, Ruschendorf F, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet* 2006; 140: 2063–2074.

Roberts C, Daw SCM, Halford S, Scambler PJ. Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome. *Hum Molec Genet* 1997; 6: 237-245.

Rosasco SA, Massa JL. Frontonasal Syndrome *Br J Plast Surg* 1968; 21 (3): 244-9.

Saccone S, Federico C, Bernardi G. Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds. *Gene* 2002; 300, 169– 178.

Saccone S, Federico C, Solovei I, Croquette MF, Della Valle G, Bernardi G. Identification of the gene-richest bands in human prometaphase chromosomes. *Chromosome Res* 1999; 7: 379– 386.

Sandrin-Garcia P, Abramides DV, Martelli LR, Ramos ES, Richieri-Costa A, Passos GA. Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. *Mol Cell Biochem* 2007; 303(1-2): 9-17.

Scambler PJ, Carey AH, Wyse RK, Roach S, Dumanski JP, Nordenskjold M, Williamson R. Microdeletions within 22q11 associated with sporadic and familial DiGeorge syndrome. *Genomics* 1991;10: 201-206.

Scamps C, Lorain S, Lamour V, Lipins M. The HIR protein family: isolation and characterization of a complete murine cDNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1306: 5-8.

Schulze BRB, Tariverdian G, Komposch G, Stellzig A. Misclassification Risk of Patients with Bilateral Cleft Lip and Palate and Manifestations of Median Facial Dysplasia: A New Variant of Del(22q11.2) Syndrome? *American Journal of Medical Genetics* 2001; 99: 280±285.

Sedano HO, Cohen MMJr, Jirasek JE, Gorlin RJ. Frontonasal dysplasia. *J Pediatr* 1970; 76: 906-913.

Sedano HO, Gorlin RJ. Frontonasal Malformation as a field defect and in syndromic associations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988; 65: 704-710.

Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 489–501.

Shashi V, Muddasani S, Santos CC, Berry MN, Kwapil TR, Lewandowski E, Keshavanc MS. Abnormalities of the corpus callosum in nonpsychotic children with chromosome 22q11 deletion syndrome. *NeuroImage* 2004; 21:1399–1406.

Sherwood PW, Tsang SVM, Osley MA. Characterization of HIR1 and HIR2, two genes required for regulation of histone gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993; 13:28-38.

Shprintzen RJ, Goldberg R B, Young D, Wolford L. The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics* 1981; 67: 167-172.

Simon TJ, Ding L, Bish JP, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Gee J. Volumetric, connective, and morphologic changes in the brains of children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome: an integrative study. *NeuroImage* 2005; 25: 169–180.

Slavkin HC. Regulatory issues during early craniofacial development: a summary. *Cleft Palate J* 1990; 27(2): 101-109.

Spector MS, Raff A, Desilva H, Lee K, Osley MA. Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene tranacription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Mol Cell Biol* 1997; 17:545-552.



Stevens CA, Carey JC, Shigeoka AO. DiGeorge anomaly and velocardiofacial syndrome. *Pediatrics* 1990; 85: 526-530.

Stoller JZ, Epstein JA. Identification of a novel nuclear localization signal in Tbx1 that is deleted in DiGeorge syndrome patients harboring the 1223delC mutation. *Human Molecular Genetics* 2005; Vol. 14, No. 7.

Stratton RF, Payne RM. Frontonasal malformation with tetralogy of Fallot associated with a submicroscopic deletion of 22q11. *Am J Med Genet* 1997; 69(3):287-9.

Swillen A, Devriendt K, Legius E, Eyskens B, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP. Intelligence and psychosocial adjustment in velocardiofacial syndrome: a study of 37 children and adolescents with VCFS. *J Med Genet.* 1997;34(6):453-8.

Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. Chromosome 22q11 Deletion Syndrome: Update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 2000; 97:128-135.

Tessier P. Anatomical classification of facial, cranio-facial and latero-facial clefts. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 1976; 4: 69-92.

Toriello HV, Radecki LL, Sharda J, Looyenga D, Mann R. Frontonasal "dysplasia," cerebral anomalies, and polydactyly: report of a new syndrome and discussion from a developmental field perspective. *Am J Med Genet* 1986; 2: 89-96.

Torres-Juan L, Rosell J, Morla M, Vidal-Pou C, García-Algas F, la Fuente MA, Juan M, Tubau A, Bachiller D, Bernues M, Perez-Granero A, Govea N, Busquets X, Heine-Suñer D. Mutations in TBX1 genocopy the 22q11.2 deletion and duplication syndromes: a new susceptibility factor for mental retardation. *European Journal of Human Genetics* 2007; 15: 658–663.

Van Aken K, Smedt B, Van Roie A, Gewillig M, Devriendt K, Fryns JP, Simons J, Swillen A. Motor development in school-aged children with 22q11 deletion (velocardiofacial/DiGeorge syndrome). *Developmental Medicine & Child Neurology* 2007; 49: 210–213.

Van Amelsvoort T, Daly E, Robertson D, Suckling J, Virginia NG, Critchley H, Owen MJ, Henry J, Murphy KC, Murphy DGM. Structural brain abnormalities associated with deletion at chromosome 22q11.: Quantitative neuroimaging study of adults with velo-cardio-facial syndrome. *British Journal of Psychiatry* 2001; 178: 412-419.

Vieira AR, Ávila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, FitzPatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC. Medical Sequencing of Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *PLoS Genetics* 2005; Volume 1, Issue 6:e64.

Vitelli F, Taddei I, Morishima M, Meyers EN, Lindsay EA, Baldini A. A genetic link between *Tbx1* and fibroblast growth factor signaling. *Development* 2002; 129: 4605-4611.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 2001; 17(6):439-474.

Xi T, Jones IM, Mohrenweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics* 2004; 83: 970 – 9.

Zhang L, Zhong T, Wang Y, Jiang Q, Song H, Gui Y. *TBX1*, a DiGeorge syndrome candidate gene, is inhibited by retinoic acid. *Int. J. Dev. Biol.* 2006; 50: 55-61.

Zoupa M, Seppala M, Mitsiadis T, Cobourne MT. *Tbx1* is expressed at multiple sites of epithelial-mesenchymal interaction during early development of the facial complex. *Int. J. Dev. Biol.* 2006; 50: 505-510.

Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagul I, Campbell CE, Rauch A. Human *TBX1* Missense Mutations Cause Gain of Function Resulting in the Same Phenotype as 22q11.2 Deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 80: 510–517.

Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of *TBX1* in human del22q11.2 syndrome. *The Lancet* 2003; Vol 362.

Yamagishi H, Maeda J, Hu T, McAnally J, Conway SJ, Kume T, Meyers EN, Yamagishi C, Srivastava D. Tbx1 is regulated by tissue-specific forkhead proteins through a common Sonic hedgehog-responsive enhancer. *Genes & Development* 2003; 17:269–281.

Weksberg R, Hughes S, Moldovan L, Bassett AS, Chow EWC, Squire JA. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics* 2005; 6:180.

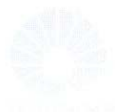
Wilming LG, Snoeren CAS, Van Rijswijk A, Grosveld F, Meijers C. The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients. *Hum Molec Genet* 1997; 6: 247-258.

Wilson DI, Cross IE, Goodship JA, Coulthard S, Carey AH, Scambler PJ, Bain HH, Hunter AS, Carter PE, Burn J. DiGeorge syndrome with isolated aortic coarctation and isolated ventricular septal defect in three sibs with a 22q11 deletion of paternal origin. *Brit. Heart J.* 1991; 66: 308-312.

World Health Organization (WHO). Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies. Geneva: WHO 2002.

## **9- ANEXOS**

## ANEXO I- Parecer do Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 27/09/05

(PARECER PROJETO 488/2002 – Registro CONEP 7016)

### PARECER

#### I-IDENTIFICAÇÃO:

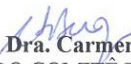
**PROJETO: “ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDIA FACIAL COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS”**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

#### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui a investigação molecular em Defeitos de Linha Média facial com Hipertelorismo, utilizando técnicas de citogenética e biologia molecular, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## **ANEXO II- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **TERMO DE CONCORDÂNCIA**

#### **Divulgação de Informações Clínicas e Divulgação de Imagens**

Eu, \_\_\_\_\_, portador do RG no. \_\_\_\_\_, responsável por \_\_\_\_\_, autorizo o Departamento de Genética Médica / UNICAMP a divulgar informações clínicas e divulgar imagens realizadas por meio de fotografias, slides e vídeos, quer anteriores ou posteriores a essa autorização. Este material poderá ser utilizado para fins didáticos, de pesquisa, publicações científicas, eventos científicos, sem identificação nominal.

Campinas, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Título do projeto: **ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA**

#### **QUAL O OBJETIVO DESSE ESTUDO?**

Existem alterações descritas de defeitos de formação e função do cérebro em pessoas que têm alterações do crânio e face. Assim, esse estudo que verificar como o cérebro é (pela exame de ressonância nuclear magnética - RNM), como é a circulação do sangue nele (pela Tomografia de Emissão de Fóton Único - SPECT) e como estão seus impulsos elétricos (com a realização do eletroencefalograma – EEG).

Dessa maneira, conheceremos melhor essas condições clínicas, as quais poderão ser compartilhadas com outros profissionais da saúde.

#### **COMO ESSE ESTUDO SERÁ FEITO?**

Com exceção do SPECT, o restante da investigação já é realizada de rotina, para as alterações do crânio e face.

Também será coletado sangue para guardar o DNA para estudos futuros dessas alterações. De todo modo, antes de qualquer estudo, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, antes de iniciarem. De qualquer maneira, qualquer coisa que seja feita você será informado. Para isso, é importante manter o endereço e telefone de contato atualizado.

Caso os responsáveis desistam do acompanhamento neste serviço ou não sejam encontrados para fornecer autorização específica, fica desde já permitida a utilização deste material, desde que o estudo seja aprovado pelos órgãos competentes (Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). Em qualquer situação, os resultados ficarão à disposição, com os médicos responsáveis por este estudo.

### **EXISTE RISCO OU DESCONFORTO?**

Para realização da RNM, as crianças menores de 5 anos e aquelas de difícil controle necessitarão receber um calmante. Normalmente, isso já é realizado. Durante todo o exame, sempre haverá um dos médicos responsáveis por este estudo.

A anestesia pode, em alguns casos, fazer o coração bater mais rápido, dificuldade para respirar, aumento de saliva na boca e agitação. Todos esses são sintomas temporários.

Para a realização do SPECT, nos casos em que for necessário, poderá ser utilizado anestesia. Para isso, será necessária uma consulta com o anestesista, que é chamado de visita pré-anestésica, que também é rotina nesses casos.

A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e com material adequado, mas existe possibilidade de formação de manchas roxas.

### **QUAIS AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESSE ESTUDO?**

Com esse estudo, poderemos saber mais sobre o cérebro e detectar alterações e se for necessário, tomar medidas de prevenção.

De modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo e é pouco provável que o diagnóstico ou tratamento sejam modificados.

Essa investigação, junto com aos exames moleculares que possam vir a ser realizados com o DNA extraído do sangue, poderá contribuir, no futuro, para uma melhor orientação genética da minha família ou de outras. É importante lembrar que estudos moleculares só serão feitos após os estudos neurológicos e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título do projeto: **ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA**

### **QUEM TERÁ ACESSO AOS RESULTADOS?**

Os exames de que já fazem parte da investigação de alterações de crânio e face farão parte do prontuário médico do indivíduo participante e serão submetidos aos regulamentos do HC - UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Aos indivíduos que são acompanhados em outros hospitais, será fornecido relatório médico com os exames realizados.

Os resultados dos exames estarão disponíveis em no prontuário do indivíduo participante e serão fornecidos ao paciente ou seu(s) responsável(is), em consulta previamente agendada no Ambulatório de Anomalias Craniofaciais que funciona toda Sexta-feira das 13:00 às 17:00 no 2º andar do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (0XX19) 3788 8908.

Se os resultados, fotografias ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação em revistas científicas, nenhuma identificação será utilizada.

Sempre que os resultados obtidos tenham relevância médica ou sejam importantes para o aconselhamento genético meu ou de minha família, eles serão comunicados à família. Para tanto, caso não haja retorno médico programado, será enviada correspondência referente à data de consulta para receber informações quanto aos resultados desses exames.

Esses resultados não poderão ser informados por telefone, correspondência ou para outras pessoas, ainda que autorizados pelos responsáveis. Por essa razão, é importante manter o endereço de correspondência atualizado.

### **COM QUEM POSSO ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS?**

Qualquer profissional envolvido no projeto poderá prestar esclarecimentos mas, de preferência, as dúvidas poderão ser esclarecidas com a Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes ou o Dr Silvyo David Araújo Giffoni, durante consulta ou a pelo tel (0XX19) 3788-8908.



A secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (0XX19) 3788-7232 Também poderá ser contatada, em caso de informações ou reclamações.

**A PARTICIPAÇÃO É OBRIGATÓRIA?:**

De jeito nenhum! Só participarão os interessados. Mesmo assim, se, durante o estudo não houver mais interesse, a participação poderá ser interrompida.

De maneira nenhuma os cuidados médicos rotineiros neste hospital serão interrompidos ou modificados, atualmente ou no futuro.

É importante dizer, também, que, se os profissionais responsáveis considerarem apropriado, a participação do paciente poderá ser suspensa.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA**

Eu confirmo que o (a) Dr.(a): \_\_\_\_\_  
me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais o indivíduo que participará do estudo, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo

Família No. \_\_\_\_\_ Registro no Hospital de Origem: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_ R.G.: \_\_\_\_\_

Endereço e telefone para contato: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

\_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha

data

### **RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:**

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

\_\_\_\_\_ Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

### ANEXO III- Dados Clínicos dos Indivíduos

Diagnóstico	Aspectos faciais e cranianos	Outros achados	Avaliação neurológica	Avaliação do SNC
DLMFH 46, XX	Hipertelorismo ocular, proeminência frontal, epicanto, coloboma ocular, nariz bifido com sulco mediano, palato alto, dolicocefalia	Anteriorização anal, clinodactilia do 5º dedo, fôvea coccígea	Hipotonia	Anteriorização do lobo frontal com poucos giros, encefalocoele frontal bilateral
DLMFH 46, XX	Hipertelorismo ocular, depressão frontal mediana, nariz bifido, falha óssea frontal	Excesso de pregas palmares, alteração da pigmentação da pele	Hipotonia	Anteriorização do lobo frontal, alteração de corpo caloso, micropoligiria perisilviana
DLMFH 46, XX	Hipertelorismo ocular, nariz bifido, estrabismo, exoftalmia, braquicefalia, assimetria craniana e facial, nariz com hipoplasia alar e assimétrico, palato ogival, implantação dos cabelos em "V"	Peito escavado, escoliose, clinodactilia discreta do 5º dedo, membros inferiores com sindactilia cutânea 2º e 3º bilateral	Convulsões tônico-clônicas generalizadas, hipoacusia	Anteriorização do lobo frontal, cisto hipofisário, alargamento dos forames parietais, alargamento das etmóides, hipertrofia dos cornetos nasais, agenesia do corpo caloso
DLMFH 46, XX, recorrência familiar	Hipertelorismo ocular, retração biparietal do crânio, epicanto, nariz com base nasal alargada e bifido, palato alto, dolicocefalia	Retardo mental leve, hipoplasia de grandes lábios, anteriorização anal, encurtamento de membros	Hipotonia, descoordenação motora	Anteriorização do lobo frontal, enlargamento da comissura talâmica
DLMFH 46, XX	Hipertelorismo ocular, fronte ampla com retração temporal, base nasal larga com sulco mediano, palato alto, dolicocefalia	Manchas café com leite, alargamento de hálux	Hipotonia	Não avaliado
DLMFH 46, XY	Hipertelorismo ocular, nariz bifido, telecanto, hipoplasia malar e maxilar, fenda labial mediana, dolicocefalia	Alteração da pigmentação da pele	Hipotonia	Anteriorização do lobo frontal, ventriculocoele esfenoidal, alteração de corpo caloso, astrocitoma
DLMFH; 46, XY, add (22p13)	Hipertelorismo ocular, nariz bifido, depressão frontal mediana, nariz com base nasal alargada, palato alto, dolicocefalia, implantação dos cabelos em "V"	Camptodactilia, distância aumentada entre hálux e 2º artelhos	Hipotonia, hipoacusia	Anteriorização do lobo frontal, alteração de corpo caloso
DLMFH 46, XX	Hipertelorismo ocular, occipital plano, crânio assimétrico, base nasal larga e ponta bifida, palato alto, dolicocefalia, implantação dos cabelos na fronte baixa	Orelhas inclinadas para trás	Hipotonia	Disgenesia de corpo caloso, heterotopia nodular do lobo frontal esquerdo, assimetria cerebelar
DLMFH 46, XX	Hipertelorismo ocular, proeminência frontal, nariz bifido, palato alto e estreito, dolicocefalia, falha óssea frontal, micrognatia	Linfoedema de membros superiores e inferiores	Hipotonia, descoordenação motora, marcha com base alargada, epilepsia	Anteriorização do lobo frontal, hipocampo esquerdo arredondado, displasia cortical, polimicrogiria, alteração de corpo caloso, ventriculocoele
DLMFH 46, XY	Hipertelorismo ocular, epicanto, estrabismo convergente, diâmetro biparietal estreito, base nasal alargada, ponta nasal, columenla e úvula bífida, filtro longo e plano, palato alto, dolicocefalia	Hérnia umbilical, hipospadia peniana	Hipotonia	Não avaliado

## **ANEXO IV- Composição das Soluções - *FISH***

### **Etanol 100%**

50ml

### **Etanol 85%**

42,5 ml etanol 100%

7,5 ml água destilada estéril

### **Etanol 70%**

35 ml etanol 100%

15 ml água destilada estéril

### **Ácido Acético 70%**

35ml de ácido acético 100%

### **Solução 20x SSC pH 5,3 – Solução mãe**

87,67g NaCl

44,12g citrato de sódio

Dissolver o NaCl e o citrato de sódio em 400ml de água destilada, ajustar o pH com HCL

1M e depois colocar 100ml de água destilada (volume final de 500ml) ajustando o pH

novamente para 5,3, filtrar e conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

### **Solução 2xSSC**

10ml 20xSSC

90ml água destilada estéril

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M. Conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

### **Solução PBS 10X pH 7,4 (Solução mãe)**

80g NaCl

2g KCl

14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Dissolver todos os reagentes até 1 litro de água destilada, ajustar o pH com HCl 1M, filtrar e conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

### **Solução PBS 1x pH 7,2**

450ml de água destilada

50 PBS 1x

### **Solução Formadido 1% /PBS 1x**

2,7 ml de formaldeído 37%

100ml de PBS 1x pH 7,2

**Solução 2x SSC/ 0,1 % Tween 20**

90ml de água destilada

10ml de 20Xssc

100 µl Tween 20

**Solução 0,4XSSC/0,3% Tween 20**

2ml de 20x SSC

300 µl de Tween 20

Água destilada para completar 100ml

## **ANEXO V- Protocolo da *FISH***

### **Preparação de lâminas e hibridização: suspensão de células com codenaturação**

#### **Preparação de Lâminas**

- 1) Incubar a lamina a 37° em 2XSSC por 2 horas
- 2) Ácido acético 70% por aproximadamente 20 – 25 segundos e PBS 1X por 1 minuto
- 3) Lavar em PBS1X 3 vezes, 4 minutos cada
- 4) Desidratar em série de etanóis 70%, 85% , 100% por 2 minutos cada
- 5) Lavar em PBS 1X por 5 minutos
- 6) Incubar em 1% formaldeído/ PBS por 6 min
- 7) Lavar em PBS 1X por 5 min
- 8) Desidratar em série de etanóis 70%, 85%, 100%, 2 minutos cada

#### **Hibridação**

- 9) Preparar o mix em um microtubo a temperatura ambiente com:
  - 3,5 µL LSI/WCP Tampão
  - 0,5 µL sonda
  - 1 µL H<sub>2</sub>O deionizada
- 10) Aplicar 5 µL do mix na região previamente selecionada e marcada com caneta diamante da lâmina
- 11) Cobrir a área da hibridação com laminula e selar com cola especial
- 12) Incubar a lamina a 75°C por 10 minutos
- 13) Colocar a lamina na caixa úmida a 37 °C por 16 horas

### **Processo de pós-hibridação para sondas utilizadas para células em suspensão**

#### **Lavagem Rápida**

- 1) Remover a laminula e em seguida lavar em solução 0,4XSSC/0,3% Tween 20 a 73 °C por 2 minutos
- 2) Mergulhar a lâmina em 2X SSC/0,1% Tween 20 a temperatura ambiente por 30 segundos

### **Visualização da Hibridização**

- 1) Secar a lâmina
- 2) Aplicar 10  $\mu$ L de contra corante DAPI II sobre a área demarcada e cobrir com lamínula
- 3) Analisar ao microscópio de fluorescência após 10 minutos

## **ANEXO VI- Protocolo de extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio**

### Extração de DNA – 1ª fase

1. Coletar o sangue em EDTA ou ACD, em tubos de vacunteiner em 2 alíquotas de 7-10mL.
2. Centrifugar o sangue por 10min a 2500rpm e descartar o plasma.
3. Transferir os leucócitos (+- 4mL) para um tubo falcon. Adicionar tampão RSB 1x até completar o volume final de 11mL no tubo. Homogeneizar por 10min.
4. Adicionar 6 gotas de nonidet P40. Homogeneizar por 10min.
5. Centrifugar por 10min a 2500rpm e desprezar o sobrenadante.
6. Ressuspender o pellet em 500µL de tampão RSB 1x.
7. Lisar os núcleos com 3mL de SDS e misturar por inversão repetidamente.
8. Adicionar 80µL de proteinase K. A concentração final deve ser de 100µg/mL. Encubar por 2-3h ou overnight a 37°C.
9. Esperar 1 semana para a 2ª fase.

### Extração de DNA – 2ª fase

1. Adicionar 3mL de fenol saturado. Misturar, invertendo o tubo gentilmente, e homogeneizar por 10min. Centrifugar por 10min a 2500rpm.
2. Remover a porção superior do tubo (transparente) com uma pipeta pasteur para outro tubo falcon. Tomar cuidado para não agitar a porção inferior, a qual será descartada.
3. Adicionar 1,5mL de clorofórmio álcool isoamílico e 1,5mL de fenol saturado. Homogeneizar por 10min e centrifugar por 10min, 2500rpm. Remover a porção inferior do tubo (fenol) com pipeta Pasteur e descartar.
4. Adicionar 3mL de clorofórmio álcool isoamílico, misturar a solução e homogeneizar por 10min. Centrifugar a 2500rpm por 10min. Remover completamente a porção inferior do tubo e descartar.
5. Adicionar 6mL de etanol 100% gelado e misturar levemente, até observar a precipitação do DNA.



6. Levar o frasco para a geladeira overnight.
7. “Pescar” o DNA precipitado com pipeta Pasteur de vidro e ressuspendê-lo em 200-250µL de TE 1x.

**ANEXO VII- Componentes e volumes das reações de PCR para amplificação dos exons do gene *TBX1***

**Exon 1**

**Tabela 1.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 1.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,6µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,9µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

**Exon 2**

**Tabela 2.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 2.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,5µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,9µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,7µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

### **Exons 3 e 9C**

**Tabela 3.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exons 3 e 9C.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	2,85µl
Tampão Qiagen (10X)	1,0µl
Qiagen Q-solution (5X)	2,0µl
dNTP (2µM)	1,0µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	1,0µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	1,0µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,15µl
DNA (200ng/µl)	1,0µl

### **Exons 4, 5, 6 e 7**

**Tabela 4.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação dos exons 4, 5, 6 e 7.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	9,0µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,5µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

## **Exon 8**

**Tabela 5.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 8.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,0µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,6µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	1,5µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

## **Exon 9B**

**Tabela 6.** Componentes e volumes utilizados na técnica de PCR para amplificação do exon 9B.

Reagente	Volume
ddH <sub>2</sub> O	8,8µl
Tampão (10X)	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25µM)	0,8µl
dNTP (2µM)	1,5µl
<i>primer sense</i> (5pmoles)	0,35µl
<i>primer antisense</i> (5pmoles)	0,35µl
DMSO <sub>4</sub>	0,5µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U)	0,2µl
DNA (200ng/µl)	1µl

