



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

SAMIRA SPINELI SILVA

DESEQUILÍBRIOS GENÔMICOS NO ESPECTRO ÓCULO-AURÍCULO-
VERTEBRAL

CAMPINAS

2018

SAMIRA SPINELI SILVA

DESEQUILÍBRIOS GENÔMICOS NO ESPECTRO ÓCULO-AURÍCULO-
VERTEBRAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, Área de Concentração Genética Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. TÁRSIS ANTONIO PAIVA VIEIRA
COORIENTADORA: PROFA. DRA. VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA SAMIRA SPINELI SILVA E ORIENTADA PELO
PROF. DR. TÁRSIS ANTÔNIO PAIVA VIEIRA

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3368/2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Sp46d Spineli-Silva, Samira, 1991-
Desequilíbrios genômicos no espectro óculo-aurículo-vertebral / Samira Spineli Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Tárzis Antonio Paiva Vieira.
Coorientador: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndrome de Goldenhar. 2. Síndrome da deleção 22q11. 3. MLPA. I. Vieira, Tárzis Antonio Paiva, 1981-. II. Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genomic imbalances in the oculo-auriculo-vertebral spectrum

Palavras-chave em inglês:

Goldenhar syndrome
22q11 deletion syndrome
MLPA

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Tárzis Antonio Paiva Vieira [Orientador]
Andréa Trevas Maciel Guerra
Gianna Maria Griz Carvalheira

Data de defesa: 19-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

SAMIRA SPINELI SILVA

ORIENTADOR(A): PROF. DR. TÁRSIS ANTONIO PAIVA VIEIRA

COORIENTADOR(A): PROF(A). DRA. VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). TÁRSIS ANTONIO PAIVA VIEIRA

2. PROF(A). DR(A). ANDRÉA TREVAS MACIEL GUERRA

3. PROF(A). DR(A). GIANNA MARIA GRIZ CARVALHEIRA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA [19/02/2018]

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as portas que se abrem em minha vida e pelas pessoas que encontro nesta caminhada.

Aos meus pais e aos meus irmãos por todo apoio às minhas escolhas, pela torcida e incentivo, por acreditarem muitas vezes mais do que eu na minha capacidade e por estarem sempre presentes nos momentos importantes para mim.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Társis Antonio Paiva Vieira, pela oportunidade de realizar este trabalho e de ser sua aluna de mestrado. Pela confiança que depositou em mim, por todo conhecimento compartilhado, disposição e paciência em sanar minhas dúvidas mesmo em horas de muito trabalho. Obrigada por ser esse profissional excelente que nos motiva a buscar ser sempre melhor. Aprendi muito com você e tenho certeza de que vou aprender muito mais.

Agradeço a minha coorientadora Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, conhecer a sua história no Projeto Crânio-Face Brasil em sua comemoração de seus 15 anos me fez admirá-la ainda mais. Obrigada pela oportunidade de fazer parte deste projeto, por todo aprendizado e conhecimento transmitido.

Agradeço à Profa. Roseane Lopes da Silva Grecco e à Profa. Marly Spadotto Balarin da UFTM que me deram a oportunidade de ter o meu primeiro contato com a pesquisa na área da genética na Iniciação Científica. Essa experiência tão boa despertou em mim o interesse pela área acadêmica.

Agradeço à médica residente Luciana Mota Bispo e aos médicos Geneticistas dos outros centros colaboradores, Isabella, Têmis, Erlane, Elaine e a Fonoaudióloga Ana Carolina. Também aos participantes e familiares pela confiança e credibilidade neste trabalho, todos foram muito importantes para a sua realização.

Agradeço à Ilária Sgardoli, Nilma Viguetti, Ana Paula dos Santos e Matheus Copelli por terem me recebido tão bem no laboratório de citogenética e me ensinado muito sobre as técnicas que utilizei neste trabalho. Também agradeço a vocês, a Laiara Souza, Flávia Marcorin e aos alunos do aprimoramento e estágio, por nossos momentos de descontração e nossas conversas na hora do café.

Agradeço ao meu amigo Roby Will por ter me apresentado o campus da UNICAMP de Campinas, os outros Institutos e bibliotecas, pelas nossas conversas, conselhos e risadas regadas a chocolate quente, chá e café.

Agradeço a minha amiga Camila Casagrande pela amizade que foi essencial nesses meus dois anos de mestrado. Voltar a minha cidade natal depois de quatro anos e me ver longe de todos os meus amigos que fiz na graduação foi muito difícil, mas não tanto porque tive a sua amizade. Obrigada por ser uma amiga tão presente, que torce por mim e comemora comigo cada passo alcançado.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e defesa pelas contribuições na dissertação.

Ao departamento de Genética Médica da FCM.

Às agências de fomento FAEPEX/UNICAMP, FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O Espectro óculo-aurículo-vertebral (EOAV), também conhecido como Microssomia Craniofacial ou Síndrome de Goldenhar, é uma condição congênita rara que apresenta ampla heterogeneidade fenotípica e etiológica. Esta condição clínica ocorre por um defeito no desenvolvimento do primeiro e segundo arcos faríngeos, acometendo principalmente orelhas, olhos, boca, maxila, mandíbula e coluna cervical. Cardiopatias congênitas e anomalias geniturinárias, entre outras, também são descritas. Os critérios clínicos para diagnóstico ainda não são consenso, mas incluem principalmente a presença de microtia e (ou) apêndices pré-auriculares com microssomia hemifacial. Alguns estudos recentes têm investigado desequilíbrios genômicos em indivíduos com essa condição, sendo os mais frequentes aqueles que envolvem a região 22q11.2. O objetivo deste trabalho foi investigar desequilíbrios genômicos em indivíduos com fenótipo sugestivo de EOAV. A casuística foi composta por 30 indivíduos com essa hipótese diagnóstica. A triagem inicial da região 22q11.2 foi realizada pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) que revelou desequilíbrios nessa região em três indivíduos. No entanto, somente um foi classificado como patogênico (1/30 – 3,3%). Nos casos em que foram encontradas alterações por MLPA e nos casos com anomalias *major* adicionais, desequilíbrios genômicos em todo o genoma foram investigados pela técnica de Análise Cromossômica por *microarray* (ACM) utilizando o chip CytoScan 750K Array (Affymetrix®). Encontrou-se desequilíbrios genômicos em cinco indivíduos, sendo que em dois as alterações foram classificadas como patogênicas (2/13 – 15,38%): del(22)(q11.2) de 1.048 kb; e del(5)(p15) de 10.772 kb concomitante a dup(13)(q34) de 2.000 kb. Foram detectadas variantes de significado incerto em três indivíduos: dup(9)(p22.1) de 425 kb; dup(5)(q22.1) de 536 kb; região de perda de heterozigose (*Loss of heterozygosity* – LOH) em 17p12 de 8.000 kb associada a deleção de oito éxons do gene *TBX1*. As alterações patogênicas encontradas em 5p15 e em 22q11.2 reforçam os dados da literatura que apontam que os desequilíbrios genômicos nessas regiões são os mais recorrentes no EOAV. Ambos os indivíduos com essas alterações apresentavam sinais clínicos *major* adicionais. Dessa forma, a investigação de desequilíbrios genômicos pela técnica de ACM seria mais vantajosa na detecção de alterações patogênicas para o diagnóstico diferencial dos indivíduos que possuem sinais clínicos *major* adicionais, uma vez que os desequilíbrios genômicos patogênicos na região 22q11.2 não foram frequentes neste estudo.

Palavras-chave: Microssomia Hemifacial; Síndrome de Goldenhar; MLPA.

ABSTRACT

The oculo-auriculo-vertebral Spectrum (OAVS) also known as Craniofacial Microsomia and Goldenhar Syndrome is a rare congenital condition which presents wide phenotypic and etiological heterogeneity. This condition occurs due to a developmental defect in the first and second pharyngeal arches, affecting mainly ears, eyes, mouth, maxilla, mandible and cervical spine. Congenital heart defects and genitourinary anomalies, among others, are also described. There is not a consensus in the literature regarding clinical criteria for diagnosis, but most of the authors suggest the presence of microtia and (or) preauricular tags with hemifacial microsomia as the minimum criteria. Some recent studies have been investigated genomic imbalances in individuals with this condition and deletions or duplications in the 22q11.2 region represent the most frequent alterations found. The aim of this study was to investigate genomic imbalances in individuals with a phenotype suggestive of OAVS. The sample consisted of 30 individuals with this clinical suspicion. The screening of the 22q11.2 region, using the MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) technique, showed imbalances in this region in three individuals. However, only one was classified as pathogenic (1/30 – 3.3%). In the cases with imbalances in the 22q11.2 region found by MLPA and in the cases with additional *major* abnormalities, imbalances throughout the whole genome were investigated using the Microarray Chromosome Analysis (CMA) technique, with the CytoScan 750K Array (Affymetrix®). We found genomic imbalances in five individuals, which were classified as pathogenic in two of them (2/13 – 15,38%): del(22)(q11.2) of 1,048 kb; del(5)(p15) of 10,772 kb concomitant to a dup(13)(q34) of 2,000 kb. Variants of unknown significance were detected in three individuals: dup(9)(p22.1) of 425 kb; dup(5)(q22.1) of 536 kb; region of loss of heterozygosity (LOH) in 17p12 of 8,000 kb associated to a deletion of eight exons of the *TBX1* gene. The pathogenic alterations found in 5p15 and 22q11.2 region reinforce that the genomic imbalances in these regions are the most recurrent in the OAVS. Both individuals with these alterations presented additional *major* congenital anomalies. Thus, we suggest that genomic imbalances investigation by CMA technique would be advantageous to find pathogenic alterations as a differential diagnosis for individuals with EOAV and additional *major* signs, since genomic imbalances in the 22q11.2 region were not common in this study.

keywords: Goldenhar Syndrome; Craniofacial Microsomia; 22q11.2 deletion;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ilustração do aparelho faríngeo humano. **A:** aspecto lateral mostrando o desenvolvimento dos quatro arcos faríngeos; **B e C:** aspectos ventrais (faciais) mostrando a relação dos arcos faríngeos com o estomodeu (boca primitiva). **Fonte:** Embriologia Básica, 8ª edição, Moore e Persaud, 2013.....21
- Figura 2.** **A:** vista frontal mostrando assimetria facial, macrostomia e hipoplasia mandibular. **B:** vista lateral de um menino com microtia e apêndice pré-auricular do lado direito, macrostomia e hipoplasia mandibular com tecido flácido. Ilustração por Bridget Rafferty. **Fonte:** Craniofacial Microsomia OverView - Heike, Luquetti e Hing, 2009-2014, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5199/>.22
- Figura 3.** **A:** orelha normal; **B:** grau I, quando todas as partes da orelha estão presentes, mas o pavilhão auricular é menor do que o normal; **C:** grau II, algumas estruturas anatômicas são reconhecidas; **D e E:** grau III, presença de um tecido mole rudimentar. A anotia ou grau IV é a ausência de orelha. Fonte: Beleza-Meireles et al, 2014.....22
- Figura 4.** Região 22q11.2 mostrando as LCRs de A a H. Em azul estão esquematizadas as deleções encontradas em indivíduos diagnosticados com EOAV em trabalhos da literatura. Nesta região as deleções possuem tamanhos similares flanqueadas pelas LCRs pressupondo o mesmo mecanismo de origem NAHR.31
- Figura 5.** Gel de agarose 2% com o padrão de bandas dos produtos amplificados da PCR. A maioria dos fragmentos devem estar entre 150 a 2.000 pb. **Fonte:** Cytoscan™ Assay Protocol.42

Figura 6. Gel de agarose 4% com o padrão de bandas dos produtos da reação da fragmentação. A maioria dos fragmentos deve estar entre 25 e 125 pb. Fonte: Cytoscan™ Assay Protocol.....	44
Figura 7. Desenho esquemático da análise e interpretação dos resultados da ACM nas etapas 1 a 4.....	47
Figura 8. Desenho esquemático da análise e interpretação dos resultados da ACM nas etapas 5 a 7.....	49
Figura 9. Desenho esquemático da análise e interpretação dos resultados da ACM da etapa 7.	50
Figura 10. Heredograma do indivíduo 8.	52
Figura 11. Heredograma do indivíduo 19.	53
Figura 12. Heredograma do indivíduo 20.	53
Figura 13. Heredograma do indivíduo 22.	53
Figura 14. Heredograma do indivíduo 27.	54
Figura 15. Heredograma do indivíduo 29.	54
Figura 16. Principais características fenotípicas observadas nos indivíduos com EOAV.	57
Figura 17. Principais características fenotípicas adicionais encontradas nos indivíduos com EOAV e que foram selecionados para a investigação por ACM.....	58

Figura 18. A: resultados de *MLPA* do **indivíduo 1** mostrando uma deleção das sondas HIC2, PPIL2 e TOP3B; **B:** Perfil de hibridação parcial do cromossomo 22 mostrando uma deleção de 1.048 kb na região 22q11.2 arr[GRCh37]22q11.21q11.22(21464763_22962962)^{x1}, classificada como patogênica.....64

Figura 19. Resultado de ACM do **indivíduo 5** mostrando duas variantes patogênicas **A:** perfil de hibridação parcial do cromossomo 5 mostrando uma deleção de 10.772 kb na região 5p15.33 arr[GRCh37]5p15.33p15.2(113576_10885441)^{x1}. **B:** perfil de hibridação do cromossomo 13 mostrando uma duplicação de 2.000 kb na região 13q34 arr[GRCh37]13q34(113107756_115107733)^{x3}; **C:** Resultado de *FISH* (Hibridação Fluorescente *in situ*) da mãe do paciente mostrando o sinal da sonda 5pter subtelomérica marcada em verde.68

Figura 20. Resultados de ACM do **indivíduo 6** mostrando perfil de hibridação do cromossomo 9 com uma duplicação de 425 kb na região 9p22.1 arr[GRCh37]9p22.1(19037935_19463385)^{x3}, classificada como variante de significado incerto..70

Figura 21. A: resultado e *MLPA* do **indivíduo 13** mostrando uma duplicação no *TOP3B*. **B-C:** resultado de ACM; **B:** perfil de hibridação do cromossomo 22 mostrando uma duplicação de 261 kb na região 22q11.22 arr[GRCh37]22q11.22(22311348_22572480)^{x3}; **C:** perfil de hibridação do cromossomo 5 mostrando uma duplicação de 536 kb na região 5q22.1 arr[GRCh37]5q22.1(110237190_110772699)^{x3}.....72

Figura 22. Resultado de *MLPA* do **indivíduo 25** mostrando as deleções das sondas dos genes *TBX1* e *SHANK3*.....74

Figura 23. A: controle negativo; **B:** controle positivo de deleção proximal 22q11.2; **C:** deleção de 8 éxons do gene *TBX1* do **indivíduo 25**. Obs: As sondas dos genes *GSC2* e *PRODH* frequentemente aparecem deletadas por estarem localizada dentro ou próxima a uma ilha CpG e pela presença de SNPs, respectivamente.75

Figura 24. Resultado de ACM do **indivíduo 25**: perfil de hibridação parcial do cromossomo 17 mostrando uma região de perda de heterozigose em 17p12 de 8.000 kb arr[GRCh37]17p12p11.2(13678238_22170994) hmz.....75

Figura 25. Número de indivíduos que preenchem os critérios clínicos mínimos de EOAV sugeridos na literatura e número de alterações encontradas nos testes de MLPA e ACM.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diagnósticos Diferenciais mais comuns do EOAV	28
Tabela 2. Alterações cromossômicas descritas em pacientes com EOAV	29
Tabela 3. Achados clínicos e resultado da análise de cariótipo dos 30 indivíduos. ..	56
Tabela 4. Comparação da casuística do presente trabalho com outros da literatura.	60
Tabela 5. Fenótipo dos indivíduos selecionados para ACM	61
Tabela 6. Desequilíbrios genômicos encontrados por MLPA e ACM.....	63
Tabela 7. Comparação do fenótipo dos casos de EOAV com deleção 5p descritos na literatura e o indivíduo 5.	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACER2: *Alkaline ceramidase 2*

ACM: Análise cromossômica em microarray

CMA: *Chromosomal microarray analysis*

AR: Ácido retinóico

BE: *Buffer Elution*

CAMK4: *Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV*

CGH: Hibridação genômica comparativa

ChAS: *Chromosome Analysis Suite*

CHD7: *Chromodomain helicase DNA binding protein 7*

CNV: *Copy Number Variation*

CRA: *Chromosome Resolution Additive*

DCT: Defeitos conotruncais

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

DGV: *Database of Genomic Variants*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

DS: Duplicações segmentares

EDTA: Etilenediaminotetracetato dissódico 2H₂O

EFTUD2: *Elongation factor Tu GTP binding domain containing 2*

EOAV: Espectro óculo-aurículo-vertebral

ERK2/MAPK1: *Mitogen-activated protein kinase 1*

EYA1: *EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1*

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

FISH: *Fluorescence in situ Hybridization*

GNAI3: *G protein subunit alpha i3*

HAUS6: HAUS augmin like complex subunit 6

HIC2: *Hypermethylated in cancer 2*

IMC: *Índice de massa corporal*

Kb: Quilobase

KCl: Cloreto de potássio

LCR: *Low Copy Repeat*

MAPD: *Median Absolute Pairwise Difference*

Mb: Megabase

MH: Microsomia Hemifacial

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MYO15A: *Myosin XVA*

MYT1: *Myelin transcription factor 1*

NAHR: *Non Allelic Homologous Recombination*

OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

OTX2: *Orthodenticle homeobox 2*

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PIGL: *Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class L*

PLCB4: *Phospholipase C beta 4*

PLIN2: *Perilipin 2*

POLR1C: *RNA polymerase I subunit C*

POLR1D: *RNA polymerase I subunit D*

PRAGA: *Ras related GTP binding A*

RPS6: *Ribosomal protein S6*

SALL1: *Spalt like transcription factor 1*

SF3B4: *Splicing factor 3b subunit 4*

SHANK3: *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*

SIX1: *SIX homeobox 1*

SIX5: *SIX homeobox 5*

SIX6: *SIX homeobox 6*

STC: Síndrome de Treacher Collins

SNPQC: *Single Nucleotide Polymorphism Quality Control*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SVFC: Síndrome Velocardiofacial

TBX1: *T-box 1*

TE: Tris-EDTA

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TCOF1: *Treacle ribosome biogenesis factor 1*

TGA: Transposição de grandes artérias

TOP3B: *Topoisomerase (DNA) III beta*

TRA: Técnicas de reprodução assistida

TSLP: *Thymic stromal lymphopoietin*

UCSC: *University of California, Santa Cruz*

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

VUS: *Variation of Unknow significance*

WavinessSD: *Waviness Standard Deviation*

WDR36: *WD repeat domain 36*

YPEL1: *Yippee like 1*

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Revisão da literatura	20
2.1 Aspectos gerais do EOAV	20
2.2 Manifestações clínicas	21
2.3 Etiologia e genética do EOAV	24
2.3.1 Fatores ambientais	24
2.3.2 Fatores genéticos	25
2.3.2.1 Diagnóstico diferencial do EOAV.....	26
2.3.2.2 Alterações cromossômicas e desequilíbrios genômicos detectados por ACM no EOAV	29
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. Casuística e métodos	33
4.1 Casuística.....	33
4.2 Métodos.....	33
4.2.1 Critério de inclusão	33
4.2.2 Coleta das amostras.....	34
4.2.3 Cultura de linfócitos	34
4.2.4 Extração de DNA genômico	35
4.2.5 MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)	37
4.2.5.1 Ensaio P250 - B2.....	37
4.2.5.2 Ensaio P324 - A1.....	38
4.2.5.3 Separação dos Produtos Amplificados:.....	39
4.2.5.4 Análise dos resultados de MLPA.....	39
4.2.6 Análise Cromossômica por <i>microarray</i> (ACM)	40
4.2.6.1 Análise e interpretação dos resultados da ACM.....	46
4.2.7 Investigação complementar por FISH (hibridação fluorescente <i>in situ</i>).....	50
5. Resultados e discussão	52
5.1 Caracterização clínica da casuística	52

5.2 Desequilíbrios genômicos encontrados por MLPA e ACM	62
5.2.1 Variantes patogênicas	64
5.2.1.1 Deleção distal em 22q11.2	64
5.2.1.2 Deleção em 5p15 associada à duplicação em 13q34	65
5.2.2 Variantes de significado incerto (<i>variants of unknown significance – vus</i>)	69
5.2.2.1 Duplicação em 9p22.1	70
5.2.2.2 Duplicação em 5q22.1	71
5.2.2.3 Deleção em 22q11.2 e perda de heterozigose em 17p12	73
5.3 Discussão geral	77
6. Conclusão	79
7. Referências	80
8. Anexos	89
8.1 Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP	89
8.2 Anexo 2. Termo de Consentimento Livre Esclarecido	94
8.3 Anexo 3. Fotos dos indivíduos da casuística	97
8.4 Anexo 4. Artigo – Relato de Caso	103

1. Introdução

O Espectro óculo-aurículo-vertebral (EOAV) (OAVS; OMIM: 164210) é um defeito congênito raro que ocorre no desenvolvimento das estruturas faciais derivadas dos primeiros arcos faríngeos. As manifestações clínicas são heterogêneas, assim como as causas, sendo a mais comum a origem multifatorial (1). Tais características desafiam o diagnóstico realizado por médicos geneticistas, pois não há um critério mínimo consensual na literatura. Devido a isso, a frequência na população também varia nos trabalhos encontrados, podendo ser consequência da complexidade desta condição (2).

Embora se aceite que a etiologia multifatorial seja a mais frequente, o fenótipo de EOAV também foi associado a agentes teratogênicos e disrupção. Há ainda, diversos relatos de anomalias cromossômicas em indivíduos com EOAV, desde aquelas observáveis por análise de cariótipo a desequilíbrios genômicos encontrados pela técnica de análise cromossômica em *microarray* (ACM) (3, 4). Recentemente foi descrito o primeiro gene associado ao EOAV, o *MYT1*, localizado em 20q13.33, que atua na via do ácido retinóico, teratogêno reconhecido como uma das causas ambientais do EOAV. No entanto, a frequência de casos com mutação nesse gene é muito baixa, sendo ainda mantida a heterogeneidade genética desta condição (5).

Na literatura, os desequilíbrios genômicos mais frequentes no EOAV se encontram na região 22q11.2 (4, 6). Tal região é conhecida por ser candidata a estudos de genes associados ao desenvolvimento craniofacial. A deleção proximal em 22q11.2 é associada à Síndrome Velocardiofacial, porém desequilíbrios genômicos nas regiões centrais e distais em 22q11.2 também foram observados no EOAV (7).

Tendo em vista a heterogeneidade clínica e etiológica, este estudo visou investigar desequilíbrios genômicos em indivíduos com sinais clínicos sugestivos de EOAV.

2. Revisão da literatura

2.1 Aspectos gerais do EOAV

O EOAV é uma condição congênita rara que foi registrada pela primeira vez pelo médico alemão Carl Ferdinand Von Arlt em 1845. Em 1952, esta foi nomeada Síndrome de Goldenhar ao ser descrita em três pacientes com dermóide epibulbar, apêndices pré-auriculares e assimetria mandibular pelo médico oftalmologista Dr. Maurice Goldenhar (8). Em 1963, Gorlin e colaboradores sugeriram o nome Displasia Óculo-aurículo-vertebral ao descreverem anomalias vertebrais como sinais clínicos adicionais da síndrome (9). Porém, mais tarde o termo “espectro” passou a ser utilizado no lugar de “displasia” por descrever melhor a variabilidade fenotípica observada nos pacientes com esta condição (1).

Outros termos também são encontrados, como: Síndrome do primeiro e segundo arcos branquiais; Disostose otomandibular; Síndrome Facio-aurículo-vertebral; Microsomia Hemifacial (MH), devido à assimetria facial causada pela hipoplasia que pode acometer estruturas apenas de um lado da face; ou Microsomia Craniofacial, um termo mais abrangente por incluir os pacientes que apresentam alterações bilaterais (6, 10). A frequência descrita na população varia, sendo estimada em 1:3.000 – 5.000 (11) a 1:26.000 nascimentos (2).

O desenvolvimento das estruturas craniofaciais ocorre por meio de uma via de sinalização complexa que leva à composição do mesoderma e das células da crista neural (1). O EOAV é originado por um defeito na morfogênese do primeiro e segundo arcos faríngeos, que ocorre durante a quarta semana do desenvolvimento embrionário. Nesse período as células da crista neural migram do rombencéfalo para o mesênquima da futura região da cabeça e do pescoço onde os arcos faríngeos se desenvolvem como elevações superficiais ou cristas arredondadas laterais à região da faringe (Figura 1) (12). Desse modo, as estruturas mais acometidas são as que derivam dos arcos faríngeos: as orelhas, olhos, zigomático, maxila, mandíbula, lábio, palato e coluna cervical.

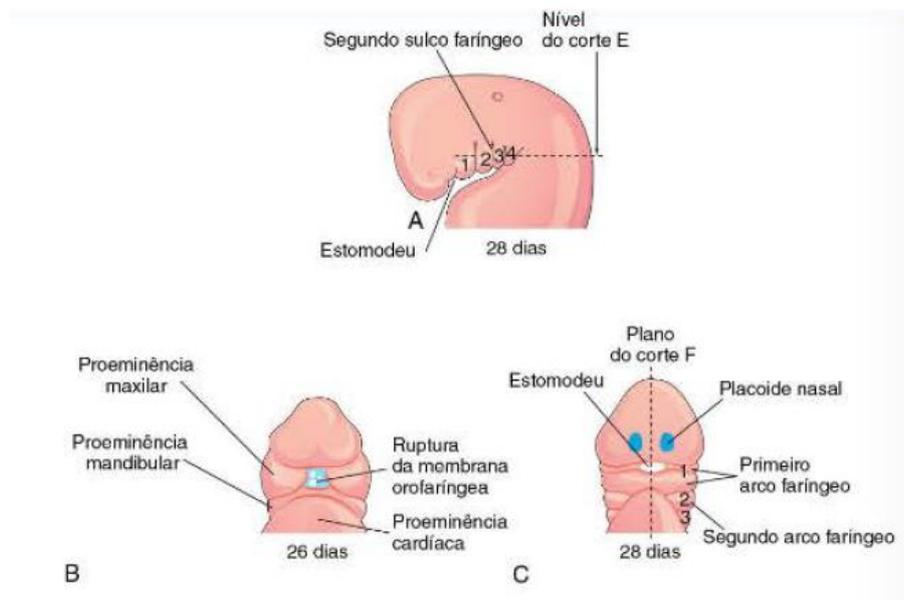


Figura 1. Ilustração do aparelho faríngeo humano. **A:** aspecto lateral mostrando o desenvolvimento dos quatro arcos faríngeos; **B e C:** aspectos ventrais (faciais) mostrando a relação dos arcos faríngeos com o estomodeu (boca primitiva). **Fonte:** Embriologia Básica, 8ª edição, Moore e Persaud, 2013 (12).

2.2 Manifestações clínicas

Devido à natureza heterogênea dos sinais clínicos do EOAV. O grau das alterações fenotípicas pode variar entre leve, moderado ou grave e na sua combinação. Desse modo, uma leve assimetria facial ou defeitos faciais graves podem fazer parte do quadro clínico (10), assim como alterações auriculares, oculares, dismorfismos craniofaciais, anomalias esqueléticas e de órgãos internos (13).

O diagnóstico desta condição é feito clinicamente, mas não existe ainda um critério mínimo que seja consenso na literatura. Alguns autores sugerem a presença de microtia isolada ou microssomia hemifacial com malformações moderadas na orelha, como apêndices pré-auriculares ou variações mais leves da microtia (14). Outros consideram a microssomia hemifacial isolada com história familiar de EOAV como critério mínimo para o diagnóstico (4). Embora não haja consenso, o critério diagnóstico mais utilizado é a presença de microtia e (ou) apêndices pré-auriculares com microssomia hemifacial (4).

As malformações e dismorfismos craniofaciais mais observados são microtia/anotia, apêndices pré-auriculares e faciais, dermóide epibulbar,

assimetria facial, fendas orofaciais, macrostomia, hipoplasia malar, hipoplasia mandibular e hipoplasia maxilar (Figura 2) (15).

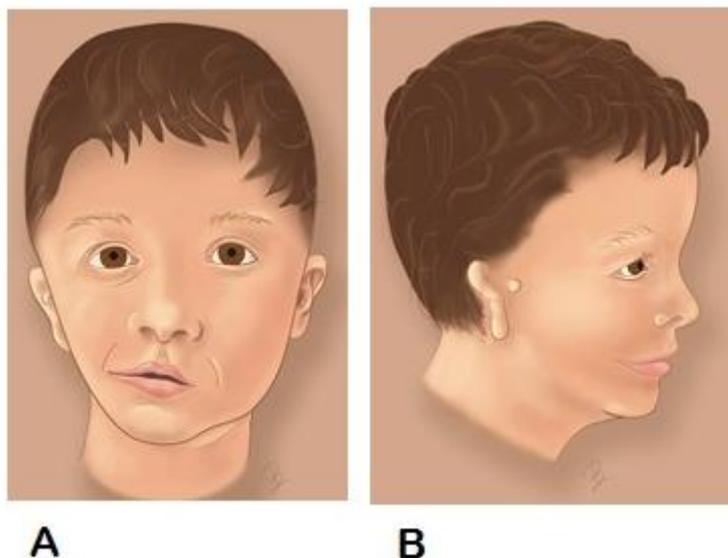


Figura 2. **A:** vista frontal mostrando assimetria facial, macrostomia e hipoplasia mandibular. **B:** vista lateral de um menino com microtia e apêndice pré-auricular do lado direito, macrostomia e hipoplasia mandibular com tecido flácido. Ilustração por Bridget Rafferty. **Fonte:** Craniofacial Microsossomia OverView - Heike, Luquetti e Hing, 2009-2014, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5199/>.

A microssomia hemifacial e a microtia têm sido descritas como as características clínicas mais frequentes nos pacientes com EOAV (4, 14). A microtia pode ocorrer uni ou bilateralmente e é caracterizada pela supressão do desenvolvimento das saliências auriculares podendo ser acompanhada de perda auditiva. Essas malformações são classificadas em graus, do mais leve ao mais grave, sendo a anotia (grau IV) a ausência total da orelha (Figura 3) (16).



Figura 3. **A:** orelha normal; **B:** grau I, quando todas as partes da orelha estão presentes, mas o pavilhão auricular é menor do que o normal; **C:** grau II, algumas estruturas anatômicas são reconhecidas; **D e E:** grau III, presença de um tecido mole rudimentar. A anotia ou grau IV é a ausência de orelha. **Fonte:** Beleza-Meireles et al, 2014.

No entanto, a microtia pode ocorrer como uma deficiência isolada ou como característica de outras condições geneticamente determinadas, como Síndrome de Treacher Collins, Síndrome de Nager e Síndrome de Townes-Brocks (17).

Outra malformação frequente é o dermóide epibulbar, manifestação ocular de um tecido rosado que cresce na esclera e pode necessitar de excisão. Outras alterações oculares como epicanto, coloboma palpebral, coloboma de íris, anoftalmia, microftalmia e estrabismo também são observadas (2, 15).

As manifestações esqueléticas mais comuns ocorrem na região craniofacial e podem ser observadas ao exame de raio-X. Essas incluem o deslocamento da órbita ocular, ramo mandibular curto, ausência da fossa glenóide e côndilo mandibular pequeno (10). Na coluna vertebral, as alterações radiográficas mais descritas ocorrem na região cervical, como vértebras fusionadas ou hemivértebras. Outras alterações, como escoliose e lordose, também são observadas em menor frequência nas regiões torácica, lombar e sacral (2).

Alterações esqueléticas, além daquelas encontradas na região craniofacial e na coluna vertebral, são os defeitos de membros, como hipoplasia ou agenesia do polegar, hipoplasia ou agenesia do rádio, polidactilia pré-axial e polegar trifalângico (18).

Em órgãos internos são observadas principalmente as malformações cardiovasculares, que são de grande importância por representar a principal causa de óbito no EOAV (19), sendo os defeitos septais, conotrunciais e de grandes vasos os mais frequentes (2, 13).

Depois dos defeitos cardíacos, outras malformações em órgãos e sistemas comumente observadas, segundo estudos feitos nas populações europeia e brasileira, são os defeitos geniturinários (agenesia renal, anomalias de ureter, hidronefrose congênita, entre outros); do sistema digestivo (atresia traqueoesofágica, estenose/atresia anorretal, ânus imperfurado, etc) e do sistema nervoso (defeitos do tubo neural, hidrocefalia, ventriculomegalia, agenesia de corpo caloso etc) (2, 15).

Embora o sistema nervoso possa ser afetado, a maioria dos pacientes apresenta desenvolvimento intelectual normal (20). Alguns podem apresentar dificuldades de aprendizado, atraso na fala e atraso neuropsicomotor (15).

Essa grande heterogeneidade fenotípica do EOAV dificulta atingir um consenso sobre critérios diagnósticos, protocolos de acompanhamento e tratamento dos indivíduos com esta condição. Além disso, os estudos publicados na literatura são em sua maioria revisões de literatura e relatos de caso (10).

2.3 Etiologia e genética do EOAV

O EOAV é etiologicamente heterogêneo e para a maioria dos pacientes a causa permanece desconhecida. Desse modo, o estudo da história gestacional, clínica e familiar do paciente são importantes para a investigação da etiologia que pode ser de origem ambiental, genética ou possuir a contribuição de ambos os fatores (multifatorial) (2).

2.3.1 Fatores ambientais

As causas ambientais que podem dar origem ao EOAV são aquelas que interrompem o desenvolvimento normal dos primeiros arcos faríngeos pela insuficiência na migração das células da crista neural para a região lateral à faringe (21) ou pela ocorrência de uma lesão vascular, provocando o subdesenvolvimento das estruturas faciais (22).

Com base em estudos experimentais e observações clínicas, as causas ambientais mais descritas são a exposição materna a fatores de risco como: uso de drogas vasoativas, ácido retinóico, diabetes gestacional, sangramento vaginal e ingestão de bebidas alcoólicas entre o primeiro e segundo trimestre (23).

Fatores demográficos e reprodutivos como a baixa renda familiar, o reconhecimento tardio da gravidez, baixo índice de massa corporal (IMC) (24), gestações de mulheres provenientes de regiões de altitude elevada (25), gestações múltiplas e uso de técnicas de reprodução assistida (TRA) (26), presença de polihidrânio, oligohidrânio e/ou restrição de crescimento intrauterino também foram associadas ao aumento do risco para o EOAV (15).

2.3.2 Fatores genéticos

A suspeita de que o EOAV possa ser de causa genética é levantada de acordo com as evidências na história familiar, como recorrência entre irmãos e parentes próximos seguindo os padrões de herança conhecidos, autossômico dominante e autossômico recessivo, como também pelos casos esporádicos de pacientes com aberrações cromossômicas (27-30).

Rearranjos cromossômicos identificados por análise citogenética (cariótipo e hibridação *in situ* fluorescente - *FISH*) foram descritos em indivíduos com EOAV (31, 32). Tais alterações podem levar ao fenótipo pelo rompimento de sequências gênicas, efeito na dosagem gênica (deleções e duplicações) e pela alteração na expressão gênica por um efeito posicional (33). No entanto, muitos indivíduos com EOAV apresentam cariótipo normal, mas não é descartada a hipótese de que haja desequilíbrios genômicos, pois microduplicações e microdeleções não são identificados por meio de técnicas de baixa resolução (34).

Alguns autores sugerem que as aberrações cromossômicas não sejam a principal causa genética do EOAV (14) e que outros mecanismos, incluindo regiões de *imprinting* ou de herança epigenética, podem estar englobados na heterogeneidade genética presente nesta condição (35).

Recentemente, o gene *MYT1* (*myelin transcription factor 1*), localizado em 20q13.33, tornou-se o primeiro gene associado ao EOAV. Foram encontradas duas mutações patogênicas em dois indivíduos de 169 pacientes estudados (5).

Uma delas era uma mutação *de novo nonsense* c25C>T p.(Arg9) em um indivíduo do sexo feminino que apresentava apêndices pré-auriculares, orelhas dismórficas e dermóide epibulbar do lado direito, assimetria facial com microsomia hemifacial, hipoplasia mandibular moderada do lado direito, surdez condutiva moderada, estenose do canal auditivo externo, malformação dos ossículos (afetando o martelo e bigorna) e defeito de septo interventricular (5).

A outra era mutação encontrada foi do tipo *missense* c.314C>T p.(Ser105Leu), identificada em um indivíduo do sexo masculino que apresentava apêndices pré-auriculares e orelhas dismórficas, microsomia hemifacial, leve

hipoplasia mandibular do lado esquerdo, macrostomia e estenose de piloro. Essa variante foi herdada do pai com fenótipo normal, apresentando então penetrância incompleta (5).

Em outro estudo realizado por este mesmo grupo, foram investigados 57 pacientes brasileiros com EOAV que não possuíam *CNVs* patogênicas e foi encontrada uma nova mutação *missense de novo* no gene *MYT1*, c.323C>T p.(Ser108Leu), em paciente com anotia, apêndice pré-auricular, orifícios cervicais, estenose do meato auditivo externo direito, microtia grau III do lado direito e perda auditiva. Assim, a frequência dessa mutação em pacientes com EOAV foi de 3:226 casos estudados (36).

O gene *MYT1* (ou *NZF2*) codifica uma proteína pertencente a uma família de três genes (*NZF1*, *NZF2* e *NZF3*) que são expressos predominantemente no tecido neural de mamíferos (37). Na literatura, a perda de função deste gene por deleção subtelomérica pequena em 20q13.33 foi descrita em um paciente com deficiência intelectual grave e distúrbios moderados (38).

Em estudo funcional com *zebrafish knockdown myt1a* foram observadas alterações na cartilagem craniofacial. O *MYT1* está envolvido na via de sinalização do ácido retinóico (AR), que é conhecidamente um agente teratogênico e uma das causas ambientais do EOAV. Alguns genes que também fazem parte dessa via foram associados a anomalias craniofaciais e síndromes conhecidas. Em um estudo *in vitro* foi observado que o gene *MYT1* parece desempenhar um papel de regulação na via do AR, sendo que a alta expressão do *MYT1* provoca diminuição do receptor beta do ácido retinóico (RARβ) (5)

2.3.2.1 Diagnóstico diferencial do EOAV

Além do EOAV, duas outras importantes condições dos primeiros arcos faríngeos são a Síndrome de Treacher Collins (STC) e a Síndrome Aurículo-condilar, que compartilham com o EOAV principalmente alterações na maxila, mandíbula e orelhas, apresentando diferenças bem sutis (1).

São observadas algumas diferenças entre as síndromes dos primeiros arcos faríngeos, que podem ocorrer devido ao momento e idade embriológica em

que ocorreu a falha na migração das células da crista neural ou na sinalização celular pela combinação de fatores ambientais e genéticos (39).

Outras condições que também podem apresentar alguns sinais do EOAV dentro do seu espectro de manifestações fenotípicas estão descritas na Tabela 1. Algumas recebem o nome de acordo com as características clínicas que manifestam, como os acrônimos CHARGE e VATER, (40). E assim como a STC, algumas possuem causa genética conhecida (1, 4) (Tabela 1).

Tabela 1. Diagnósticos Diferenciais mais comuns do EOAV

Condição genética	Manifestações clínicas	Genes
Síndrome de Treacher Collins (41)	Microtia, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, orientação de fendas palpebrais para baixo.	<i>TCOF1, POLR1C, POLR1D</i>
Síndrome Aurículo-condilar(1)	Malformações nas orelhas, microstomia, fenda de palato, língua hipoplásica, defeito na junção temporomandibular e hipoplasia do côndilo mandibular.	<i>PLCB4 e GNAI3 (42)</i>
Síndrome CHARGE(4)	Coloboma de íris, atresia de coana, alterações na orelha externa e nos ossículos, criptorquidismo, cardiopatias, fendas orofaciais, fístula traqueoesofágica, disfunção do nervo craniano.	<i>CHD7</i>
Associação VATER (43)	Alterações vertebrais, cardíacas e renais.	-
Síndrome Townes–Brocks(1)	Orelhas malformadas, perda auditiva, apêndices pré-auriculares, ânus imperfurado, defeitos cardíacos e renais.	<i>SALL1</i>
Síndrome Miller(1)	Orelhas malformadas, hipoplasia malar, fendas orofaciais, micrognatia e outros.	-
Espetro Óculo-aurículo-frontonasal (1)	Microtia, hipertelorismo ocular, dermoide epibulbar, fendas orofaciais, cardiopatias congênitas, encefalocele, fusão de C3-C4.	-
Síndrome de Bixler (43)	Microtia, hipertelorismo ocular, fenda de lábio e palato, base nasal alargada.	-
Síndrome Branquio-oto-renal(41)	Microtia, surdez, apêndices pré-auriculares, assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, alterações renais.	<i>EYA1, SIX5, SIX1</i>
Miohiperplasia Hemifacial (41)	Assimetria facial, hiperplasia dos músculos da face sem hiperplasia óssea, paralisia facial	-
Disostose mandibulofacial Guion-Almeida (41)	Microtia, surdez, apêndices pré-auriculares, assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, cardíacas e vertebrais.	<i>EFTUD2</i>
Síndrome Nager (41)	Microtia, apêndices pré-auriculares, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, renais e cardíacas.	<i>SF3B4</i>
Síndrome Oculoauriculofrontonasal (43)	Apêndices pré-auriculares, microtia, coloboma palpebral, dermóide epibulbar, hipoplasia mandibular, assimetria facial.	-
Síndrome Parry Romberg (41)	Assimetria facial, hipoplasia muscular progressiva maxilar e/ou mandibular, paralisia facial.	-
Síndrome Cat-eye (41)	Apêndices pré-auriculares, surdez, coloboma ocular, assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, alterações renais, cardíacas e vertebrais.	Tretrassomia 22q11.2

2.3.2.2 Alterações cromossômicas e desequilíbrios genômicos

detectados por ACM no EOAV

Uma ampla variabilidade de alterações cromossômicas foi descrita em pacientes com EOAV, como deleções, duplicações, translocações, cromossomo marcador, aneuploidias envolvendo o cromossomo X ou aneuploidias de cromossomos autossomos em mosaico (4, 6, 35). As alterações mais frequentes se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Alterações cromossômicas descritas em pacientes com EOAV

Alteração cromossômica	Referência
Deleções	
1p22.2 –p 31.1	(44)
12p13.33	(45) (3)
14q31.1q31.3	(46)
15q24.1	(47)
18p	(48)
5p15	(49) (50) (51) (52) (53) (54) (31)
22q11.2	(55) (56) (57) (7) (58) (59) (60) (61) (62)
Duplicações	
10p14 –p15	(63)
14q23.1	(64) (27)
22q11.2	(65) (66)
Trissomias	
18	(67)
7 (mosaico)	(68)
9 (mosaico)	(69)
22 (mosaico)	(70) (69) (71)
Aneuploidias envolvendo o cromossomo X	(72) (73) (74)
Translocações	
t(9;18)(p23;q12.2)	(32)
t(5;8)(p15.31;p23.1)	(31)
Inversões	
inv9(p11;q13)	(75)
inv14(p11.2;q22.3)	(76)

A deleção 5p está associada à Síndrome de Cri du Chat, que foi descrita pela primeira vez em 1963 (77). Na literatura foram descritos indivíduos com diagnóstico de EOAV e deleção 5p ou rearranjos aparentemente balanceados envolvendo o braço curto do cromossomo 5 (31, 49-54). Os pontos de quebra encontrados nas deleções em 5p, tanto terminais quanto intersticiais desses pacientes, são variados (78).

A duplicação na região 14q23.1 foi observada em pacientes com EOAV com história familiar sugestiva de herança autossômica dominante (27). Nessa região está localizado o gene *OTX2* envolvido no desenvolvimento de estruturas craniofaciais, sendo um forte candidato para o EOAV. Em outro estudo foi descrita uma família com sinais clínicos da Síndrome Branquio-oto-renal e de EOAV com duplicação da região 14q22.3-q23.3 englobando os genes *SIX1*, *SIX6*, e *OTX2* (64).

Utilizando a técnica de *array*-CGH (Hibridação genômica comparativa), Rooryck e colaboradores (2010) investigaram desequilíbrios genômicos em 86 pacientes com EOAV e encontraram alterações em 11, sendo a maioria delas herdadas de genitor não afetado, com significado clínico incerto. Os autores sugerem que esta porcentagem de alterações encontradas possa ser devido ao critério de seleção dos pacientes. Do total de indivíduos investigados, 25 apresentavam apenas microtia unilateral e microsomia hemifacial (sem alterações em órgãos internos) e apenas 10,5% apresentavam o espectro completo (microtia, dermóide epibulbar, microsomia hemifacial e anomalias vertebrais).

Em um estudo realizado por Beleza-Meireles (2015) as *CNVs* encontradas com maior frequência no EOAV foram as deleções e duplicações em 22q11.2. O cromossomo 22 possui oito repetições com baixo número de cópias (*Low copy repeats - LCRs*), também chamadas de duplicações segmentares (DS) nomeadas de A à H que são sequências repetitivas de alta homologia que levam à instabilidade genômica (79). Dessa forma, devido à sua estrutura e composição, o cromossomo 22 apresenta grande susceptibilidade à formação de *CNVs* pelo mecanismo de origem *non-allelic homologous recombination (NAHR)* que pode ocorrer não somente entre cromossomos homólogos, mas entre cromátides irmãs e intra-cromátide. As duplicações e deleções são as consequências mais observadas desse mecanismo, porém *LCRs* com orientações opostas podem servir como “substratos” para a ocorrência de inversões (80).

As duplicações ou deleções encontradas nesta região são recorrentes, possuem tamanhos semelhantes e são classificadas de acordo com as *LCRs* que as flanqueiam. A deleção associada à Síndrome de DiGeorge/SVCF varia de aproximadamente 3 Mb e engloba as *LCRs* proximais A e D, a aproximadamente

1,5 Mb entre as *LCRs* A e B, também chamadas de deleções proximais ou típicas (81).

Na literatura, em pacientes com diagnóstico clínico de EOAV foram observadas deleções na região 22q11.2 proximal (55-57), na região central (7) e na região distal, também chamadas de deleções atípicas envolvendo as *LCRs* de D a G (58-61) e uma deleção terminal (62) (Figura 4).

Duplicações em 22q11.2 (65, 66) e trissomia do 22 também foram relatadas na literatura em pacientes com EOAV (69-71).

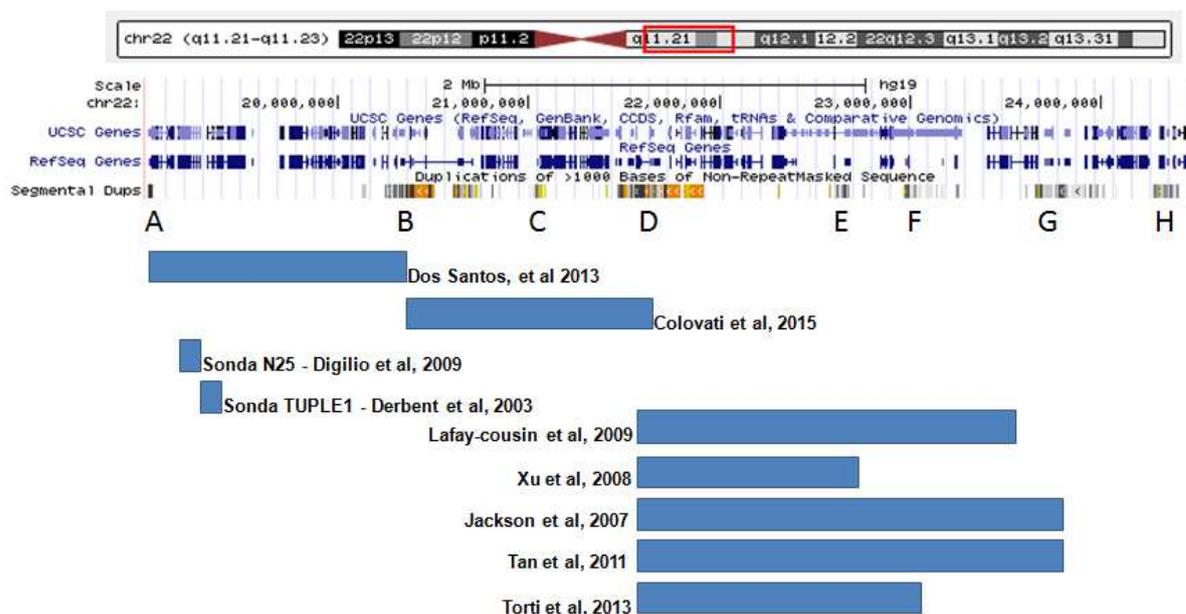


Figura 4. Região 22q11.2 mostrando as *LCRs* de A a H. Em azul estão esquematizadas as deleções encontradas em indivíduos diagnosticados com EOAV em trabalhos da literatura. Nesta região as deleções possuem tamanhos similares flanqueadas pelas *LCRs* pressupondo o mesmo mecanismo de origem NAHR.

Nota-se através da revisão da literatura que alterações em 22q11.2 correspondem às mais recorrentes em pacientes diagnosticados com EOAV, sendo esta região candidata para genes associados ao EOAV. Esta região é conhecidamente forte candidata para estudos de genes associados às anomalias craniofaciais e novos estudos são necessários para a confirmação da associação de desequilíbrios genômicos nesta ou em outras regiões cromossômicas, com o EOAV.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar desequilíbrios genômicos em indivíduos com fenótipo sugestivo de Espectro óculo-aurículo-vertebral

3.2 Objetivos específicos

- Investigar desequilíbrios genômicos na região 22q11.2 em pacientes com diagnóstico clínico de EOAV, pela técnica de MLPA;
- Investigar desequilíbrios genômicos, por Análise Cromossômica em *microarrays* (ACM), nos casos com outras anomalias *major*, além daquelas consideradas como critérios mínimos do EOAV;
- Realizar correlação genótipo-fenótipo nos pacientes com desequilíbrios genômicos;

4. Casuística e métodos

4.1 Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e pesquisa da Unicamp (CAAE: 56915816.6.0000.5404; Parecer: 1.649.207).

Foram incluídos neste estudo 30 pacientes com hipótese diagnóstica de EOAV, avaliados por médicos geneticistas com ficha padronizada de coleta de dados e investigados de acordo com a rotina dismorfológica padrão.

As amostras foram encaminhadas de seis serviços de genética diferentes, incluindo o da UNICAMP e cinco outros centros colaboradores do Projeto Crânio-Face Brasil (<https://www.fcm.unicamp.br/fcm/cranio-face-brasil/projeto-cranio-face-brasil>):

- Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Campinas – SP);
- Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA (Porto Alegre – RS);
- Serviço de Genética da Universidade Federal de Alagoas (Maceió – AL);
- Serviço de Genética do Hospital Infantil Albert Sabin – HIAS (Fortaleza – CE);
- Centrinho Prefeito Luiz Gomes (Joinville – SC);
- Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Labiopalatal - CAIF (Curitiba – PR);

4.2 Métodos

4.2.1 Critério de inclusão

Neste trabalho foram incluídos todos os casos com suspeita clínica de EOAV atendidos por médico geneticista e critérios mínimos de seleção foram estabelecidos apenas para a investigação genômica por ACM.

Os casos selecionados para a ACM foram aqueles que apresentavam anomalias *major*, além daquelas consideradas como critérios mínimos do EOAV (microtia e/ou apêndices pré-auriculares associados à microssomia hemifacial ou hipoplasia mandibular).

4.2.2 Coleta das amostras

Após a avaliação clínica dos pacientes, foram coletados, após assepsia local com álcool 70%, 4 a 8 ml de sangue periférico em tubos de coleta a vácuo, contendo EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico 2H₂O) a 10% e pH 8,0 como anti-coagulante para a extração de DNA genômico. Foram coletados de 2 a 5 ml de sangue por meio de punção venosa em tubos de coleta a vácuo contendo heparina sódica para a cultura de linfócitos. Os tubos coletados foram encaminhados ao Departamento de Genética Médica da FCM/Unicamp.

4.2.3 Cultura de linfócitos

Essa técnica foi realizada para obtenção de preparações cromossômicas para análise do cariótipo em casos nos quais este não foi realizado previamente, e para realização da técnica de FISH, quando necessária.

Foi utilizada a cultura de linfócitos obtida pela técnica descrita por Moorhead e colaboradores (1960) (82), com pequenas modificações.

Cultura de linfócitos: foram adicionados de 0,5 ml a 01 ml de sangue total heparinizado a frascos de cultura contendo 5 ml do meio completo contendo 80% de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen®) e 20% de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen®) e 0,1 a 0,2 ml de fito-hemaglutinina (Gibco/Invitrogen®). Os frascos de cultura foram incubados a 37°C por 72 horas. Duas horas antes do fim desse período, acrescentou-se 50 µl de CRA (*Chromosome Resolution Additive*) (Citogem®) e 50 minutos antes do término acrescentou-se 50 µl de colchicina 4x10E-5M (Sigma®) à cultura de linfócitos. Ao final desse período de incubação o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos cônicos de centrifuga, ao qual foram adicionados aproximadamente 05 ml de solução hipotônica de KCl 0,075M (Merck®) a 37°C e esses foram mantidos

em estufa por 1h a 37°C. Após a hipotonia foi realizada a fixação com fixador Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético).

Preparação das lâminas: lâminas para microscopia foram deixadas em etanol por cinco minutos. Após secas e limpas, foram mergulhadas em água deionizada gelada e pingadas, com pipetas Pasteur, de três a quatro gotas do material sobre as lâminas. As lâminas foram colocadas em uma estufa na temperatura de aproximadamente 55°C durante dez minutos e foram observadas em microscópio de contraste de fase.

Obtenção de bandamento G: esse bandamento foi realizado de acordo com a técnica descrita por Sanchez e colaboradores (1973) (83), com pequenas modificações. As lâminas foram deixadas em uma estufa com temperatura de aproximadamente 55°C por 24 horas e em seguida foram incubadas em tampão fosfato de Sorensen 0,06M pH 6,8 em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram coradas com eosina azul de metileno segundo Wright (Merck®) diluído em tampão fosfato de Sorensen na proporção de 1:3 por três a quatro minutos.

Análise Cromossômica: foram analisadas ao microscópio óptico comum 20 metáfases de cada indivíduo por dois analisadores diferentes, sendo que cada um analisou dez metáfases. A resolução obtida foi de aproximadamente 400 a 550 bandas por conjunto haploide. Pelo menos duas metáfases de cada indivíduo foram capturadas e cariotipadas utilizando o sistema de cariotipagem BANDView da Applied Spectral Imaging®.

4.2.4 Extração de DNA genômico

Para obtenção das amostras de DNA genômico foi utilizado o ensaio de extração NucleoSpin® Blood L/XL (Macherey-Nagel) de acordo com as instruções do fabricante, ou método de extração fenol-clorofórmio:

Das amostras de sangue periférico coletadas com anticoagulante EDTA, 1 a 2 ml do sangue total foi transferido para um tubo cônico de 15 ml. Em seguida, foram adicionados, com pipeta Pasteur, 8 ml de solução de lise (composta por 10,95 g de Sacarose 0,32 M; 1 ml de Tris-HCl 1M pH 7,4; 0,5 ml de

MgCl₂ 1 M; 1 ml de TritonX100 1%, completada para 100 ml com água Mili-Q previamente autoclavada) ao tubo, que foi invertido por 50 vezes.

O tubo foi centrifugado por 40 minutos a 3.000 rpm para precipitar os núcleos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado gentilmente em frasco contendo hipoclorito de sódio.

O precipitado foi ressuspenso em 950 µl da solução 2 autoclavada (composta por 2,19 g de NaCl 0,075 M; 20 ml de EDTA 0,02 M pH 8,0 completada para 500 ml com água Mili-Q). Em seguida, utilizando uma micropipeta, foram adicionados 50 µl de SDS 10% e 30 µl de proteinase K (10 mg/ml). O tubo foi homogeneizado e deixado em estufa a 37°C por uma noite.

Logo após ser retirado da estufa, utilizando uma pipeta graduada, foi adicionado ao tubo 01 ml de fenol ultrapuro (Sigma®) com tampão e homogeneizado por 10 minutos, invertendo o tubo.

Em seguida, o tubo foi centrifugado por 20 minutos em centrífuga a 3.000 rpm. A fase superior foi removida, utilizando uma micropipeta (P1000) evitando tocar a interface onde ficam as proteínas coaguladas, e transferida para um novo tubo cônico de 15 ml limpo.

Ao novo tubo com a fase superior foi adicionado 01 ml de solução clorofórmio (Synth): álcool isoamílico (Sinergia) 24:1, utilizando uma pipeta graduada. Em seguida, o tubo foi homogeneizado gentilmente e centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. A fase superior foi transferida com micropipeta (P1000) para um novo tubo cônico de 15 ml limpo. Novamente, 01 ml de solução clorofórmio: álcool isoamílico 24:1 foi adicionado, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm.

A fase superior foi transferida para um tubo cônico de 15 ml contendo 100 µl de KCL 2 M mantido em gelo. Foram adicionados 03 ml de álcool etílico 100% gelado e homogeneizou-se por inversão até ser possível visualizar o DNA precipitado em fios brancos.

O DNA precipitado foi transferido com micropipeta (P1000), deixando escorrer o excesso de álcool, para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml

contendo 200 µl de etanol 70% gelado. O tubo foi centrifugado em microcentrífuga refrigerada a 4°C por 10 min a 1.500 rpm.

Em seguida o sobrenadante foi desprezado, invertendo o tubo. O tubo de microcentrífuga foi deixado em temperatura ambiente para secar todo o álcool. Após seco, foram adicionados 100 µl do diluente BE (Elution Buffer 5mM Tris/HCl, pH 8.5 Macherey-Nagel).

O tubo foi mantido por 30 minutos em banho-maria a 65°C. Depois foi mantido em temperatura ambiente por uma noite e, por fim, o DNA eluído foi quantificado e guardado no biorrepositório do Projeto Crânio-Face Brasil.

4.2.5 MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*)

As técnicas de MLPA utilizando os ensaios P250-B2 e, para um caso específico o P324-A1, foram realizadas segundo as recomendações do fabricante descritas no protocolo geral de *MLPA*® com pequenas modificações.

As amostras de DNA foram diluídas (para obter-se uma concentração de 250 ng de DNA) em BE (Elution Buffer 5mM Tris/HCl, pH 8.5 Macherey-Nagel).

4.2.5.1 Ensaio P250 - B2

Foi utilizado o ensaio P250 (versão B2- MRC- Holland®), que contém 48 sondas, das quais 29 são para o cromossomo 22 (localizadas tanto na região mais comumente deletada, como também em outras regiões de deleções atípicas) e 19 sondas para outros *loci* em diferentes cromossomos, utilizadas como controle, ou nos quais deleções também foram relatadas em pacientes com características clínicas da Síndrome de deleção 22q11.2.

As seguintes etapas foram realizadas:

Desnaturação do DNA e hibridação das sondas: as amostras diluídas foram submetidas a uma temperatura de 98°C por cinco minutos, e em seguida mantidas a 25°C para adicionar o solução contendo 1,5 µl do SALSA Probemix e 1,5 µl do MLPA buffer para cada tubo. A solução foi incubada a 95°C por um minuto e em seguida mantida a 60°C por 18 horas.

Reação de ligação: no termociclador, em uma temperatura de 54°C, foi adicionado uma solução contendo 25 µl de água deionizada (dH₂O), 03 µl de Ligase Buffer A, 03 µl de Ligase Buffer B e 01 µl de enzima Ligase-65 para cada reação. As amostras foram incubadas a 54°C por quinze minutos e em seguida a 98°C por cinco minutos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): o termociclador foi pausado e mantido em temperatura de 20°C para adicionar uma solução contendo 7,5 µl de dH₂O, 02 µl de SALSA PCR *primer mix* e 0,5 µl de SALSA *Polymerase*. Após adição da solução, iniciou-se a reação de PCR nas seguintes condições: 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C. Ao final dos 35 ciclos, as reações de PCR foram incubadas por 20 minutos a 72°C e mantidas a 15°C.

4.2.5.2 Ensaio P324 - A1

Foi utilizado o ensaio P324 (versão A1- MRC- Holland®), que contém 34 sondas para a região 22q11.2, dentre as quais 12 são para o gene *TBX1*. Dez sondas adicionais de referência estão presentes no ensaio e são para outras regiões de cromossomos autossomos.

Para a realização desta técnica as seguintes etapas foram realizadas:

Desnaturação do DNA e hibridação das sondas: as amostras diluídas foram submetidas a uma temperatura de 98°C por cinco minutos, e em seguida mantidas a 25°C para adicionar a solução contendo 1,5 µl do SALSA Probemix e 1,5 µl do MLPA buffer para cada tubo. A solução foi incubada a 95°C por um minuto e em seguida mantida a 60°C por 18 horas.

Reação de ligação: no termociclador, em uma temperatura de 54°C, foi adicionada uma solução contendo 25 µl de água deionizada (dH₂O), 03 µl de Ligase Buffer A, 03 µl de Ligase Buffer B e 01 µl de enzima Ligase-65 para cada reação. As amostras foram incubadas a 54°C por quinze minutos e em seguida a 98°C por cinco minutos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): a um novo tubo foram adicionados 04 µl de SALSA PCR *buffer*, 26 µl de água estéril e 10 µl do produto

da reação de ligação. A uma temperatura de 60°C, foram adicionados 10 µl da solução da polimerase (02 µl primers, 02 µl de SALSA *buffer*, 5,5 µl de dH₂O e 0,5 µl da enzima Polimerase). Imediatamente se iniciou a reação da PCR nas seguintes condições: 35 ciclos → 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C. Ao final dos ciclos → 20 minutos a 72°C.

4.2.5.3 Separação dos Produtos Amplificados:

Em uma placa de sequenciamento foram adicionados 0,7 µl do produto da reação e a *solução* contendo 0,2 µl de GeneScan 500™ LIZ® Size Standard e 09 µl de fomamida (Hi-di Fomarmide®) para cada produto.

A leitura dos produtos amplificados foi realizada no sequenciador automático de eletroforese capilar ABI 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®).

4.2.5.4 Análise dos resultados de MLPA

A visualização e análise dos resultados foram realizadas primeiramente com o software GeneMapper® da Applied, Biosystems™, onde pode ser feita a confirmação do sexo dos pacientes pela visualização dos picos correspondentes aos cromossomos X e Y.

Depois, seguiu-se a análise em planilha de Excel (Microsoft®): para a análise dos resultados obtidos pelo ensaio P250-B2 foi utilizada a planilha elaborada especificamente para esse ensaio pelo grupo do *National Genetics Reference Laboratory – Manchester*; para a análise dos resultados obtidos pelo ensaio P324-A1 foi utilizada a planilha genérica de MLPA e elaborada de acordo com as instruções para seu uso.

A planilha de análise específica do ensaio P250-B2 e a planilha genérica e seu manual de instrução se encontram disponíveis gratuitamente no site: <http://www.ngrl.org.uk/Manchester/projects/informatics/mlpa>.

Os dados foram normalizados, dividindo os valores de altura do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas na amostra obtida a partir do DNA controle. Dessa forma, na análise, quando os picos do gráfico ficaram entre 0,75 - 1,25, os resultados foram considerados normais.

4.2.6 Análise Cromossômica por *microarray* (ACM)

A técnica de ACM foi realizada para a investigação de desequilíbrios genômicos no DNA utilizando o *chip CytoScan 750K Array (Affymetrix®)* e o ensaio de reagentes compatíveis - *Reagent Kit Bundle (Affymetrix®)*.

O *chip CytoScan 750K Array (Affymetrix®)* contém aproximadamente 750.000 sondas de oligonucleotídeos com poder para detecção de alterações estruturais com ampla cobertura do genoma com capacidade para identificar CNVs, por possuir aproximadamente 550.000 marcadores não polimórficos e aproximadamente 200.000 sondas de *SNPs (Single nucleotide polymorphisms)* que garantem a detecção de perda de heterozigose (*Loss of heterozygosity – LOH*).

Essa técnica foi desenvolvida de acordo com as recomendações do fabricante com algumas modificações, seguindo as seguintes etapas:

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade dos DNAs dos pacientes e controles. Em seguida, utilizando o espectrofotômetro Epoch (BioTek®) foram verificadas a concentração e a pureza dos DNAs pelos parâmetros e razões de absorbância que deveriam estar dentro dos seguintes padrões: A260/A280: 1,7 - 2,0; A260/A230: >1,1 e A320: 0,01-0,1.

Diluição das amostras de DNA: as amostras foram diluídas em BE (Elution Buffer 5mM Tris/HCl, pH 8.5 Macherey-Nagel) para a concentração de 50 ng/μl e novamente quantificadas no espectrofotômetro para confirmação.

Digestão do DNA: foram adicionados 05 μl dos DNAs e controles a 50 ng/μl (250 ng) em sete poços de uma placa de 96 poços. Como controle positivo foram utilizados 05 μl do DNA fornecido no ensaio e como controle negativo, 05 μl de tampão Tris-EDTA (TE). Em seguida, foi preparado a solução de digestão em um tubo de 1,5 ml contendo 11,55 μl de água livre de nuclease (Chilled

Affymetrix® Nuclease-Free Water), 0,2 µl de BSA 100X, 2,0 µl de tampão da *NspI* 10X e 1,0 µl enzima *NspI* para cada reação. A solução foi colocada no vórtex três vezes. Em seguida, utilizando uma micropipeta foram adicionados 14,75 µl da solução em cada amostra, nos poços correspondentes da placa. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes em alta velocidade e centrifugada a 2.000 rpm durante um minuto. Em seguida, a reação foi incubada em um termociclador nas seguintes condições: 37°C por 2 horas, 65°C por 20 minutos e mantida a 4°C.

Ligação dos adaptadores: os fragmentos de DNA anteriormente digeridos pela enzima *NspI* apresentam, independentemente do tamanho, extremidades livres de 4 pb de comprimento. Nesta etapa, adaptadores específicos são ligados a essas extremidades. Para que esta reação ocorra, foi feito a solução de ligação em um tubo de 1,5 ml contendo os reagentes: 0,75 µl de adaptador *NspI* 50 µM, 2,5 µl tampão da *DNA Ligase T4* 10X e 2,0 µl da enzima *DNA Ligase T4*. Em seguida, a solução foi colocada no vórtex três vezes em alta velocidade, e distribuídos, com micropipeta, 5,25 µl em cada poço da placa. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes em alta velocidade, e centrifugada a 2.000 rpm durante 1 minuto. A este passo seguiu-se a incubação da reação em um termociclador nas seguintes condições: 16°C por 3 horas, 70°C por 20 minutos e mantida a 4°C.

Amplificação dos fragmentos por PCR: a placa contendo as amostras foi centrifugada a 2.000 rpm durante um minuto. As amostras foram diluídas em 75 µl de água livre de nuclease (Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water). A placa foi devidamente selada e colocada no vórtex três vezes e centrifugada novamente nas condições similares às citadas anteriormente. Quatro alíquotas de 10 µl de cada amostra foram transferidas para outra placa de PCR. Em seguida, a solução de ligação foi preparado em um tubo de 50 mL contendo os seguintes reagentes: 39,5 µl de água livre de nuclease, 20,0 µl de reagente GC-Melt, 14,0 µl de dNTP, 4,5 µl de iniciador (PCR Primer 002), 10,0 µl tampão da *Taq* TITANIUM™ 10X, 2,0 µl da enzima *Taq DNA Polimerase* TITANIUM™ 50X. A solução foi colocada no vórtex três vezes em alta velocidade com uma micropipeta, 90 µl foram adicionados aos poços correspondentes da placa. A placa foi então selada, colocada no vórtex três vezes em alta velocidade e centrifugada a 2.000 rpm durante um minuto. A este passo seguiu-se a incubação

da reação em um termociclador, nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos, 68°C por 15 segundos e por fim, 68°C por 7 minutos e mantida a 4°C.

1º ponto de verificação: foi feita eletroforese em gel de agarose a 2% do produto da PCR para checar se as etapas de digestão, ligação e amplificação do material ocorreram de forma correta. Como as condições da PCR foram otimizadas para amplificar fragmentos entre 150 e 2.000 pb, o padrão de bandas visualizado no gel deveria corresponder ao intervalo de 150 pb a 2000 pb (Figura 5).

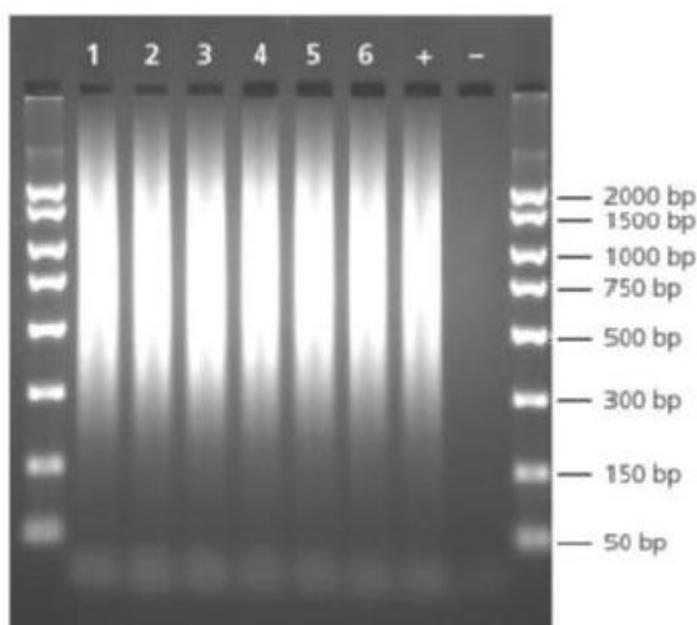


Figura 5. Gel de agarose 2% com o padrão de bandas dos produtos amplificados da PCR. A maioria dos fragmentos devem estar entre 150 a 2.000 pb. **Fonte:** Cytoscan™ Assay Protocol.

Purificação dos produtos da PCR: os quatro produtos da PCR de cada amostra foram juntados e transferidos para tubos de 1,5 ml correspondentes. Foram adicionados 720 µl do reagente *Purification Beads* em cada amostra. Cada tubo foi tampado, misturado por inversão e incubado a temperatura ambiente durante dez minutos. Os tubos foram centrifugados a 16.100 rcf durante três minutos e transferidos para um suporte magnético (MagnaRack™). Com os tubos no suporte, o sobrenadante foi retirado e descartado com o auxílio de uma micropipeta (P1000), sem que o precipitado fosse tocado. Em seguida, foi

adicionado 1,0 ml do tampão de lavagem (*Purification Wash Buffer*) a cada amostra. Os tubos foram tampados e levados ao vórtex na velocidade máxima durante dois minutos. Centrifugou-se a 16.100 rcf durante três minutos. Em seguida, os tubos foram levados de volta ao suporte magnético. Novamente o sobrenadante foi retirado e descartado, com auxílio de uma micropipeta (P1000) sem que o precipitado fosse tocado. Centrifugou-se a 16.100 rcf durante 30 segundos e removeu-se do fundo do tubo qualquer resíduo do tampão de lavagem, com o auxílio de uma micropipeta. Os tubos foram retirados do suporte magnético e deixados destampados durante dez minutos em temperatura ambiente para assegurar que qualquer resíduo restante evaporasse. Adicionou-se 52 µl do tampão de eluição às amostras. Os tubos foram tampados, colocados dentro de um adaptador de espuma e levados ao vórtex na velocidade máxima durante dez minutos para ressuspender o material aderido às *beads* magnéticas. Centrifugou-se a 16.100 rcf durante três minutos. Os tubos foram colocados no suporte magnético por dez minutos, até que todas as *beads* magnéticas aderissem à parede do tubo. O volume de 47 µl da amostra eluída foi transferido para os sete poços correspondentes de uma placa de 96 poços. A placa foi devidamente selada, levada ao vórtex três vezes em alta velocidade e centrifugada a 2.000 rpm durante um minuto.

2º ponto de verificação: para o prosseguimento dos experimentos os produtos da PCR foram quantificados no espectrofotômetro Epoch (BioTeK®) para verificar os padrões: concentração: ≥ 3.000 ng/µl; pureza: razão A260/A280: 1,8-2,0; medição A320: $< 0,1$.

Fragmentação: inicialmente, a placa contendo o produto purificado foi levada ao vórtex três vezes em alta velocidade e colocada sobre o bloco de refrigeração em gelo, onde permaneceu durante essa etapa. Em seguida, a solução da fragmentação foi preparado em um tubo de 1,5 ml contendo os reagentes: 122,4 µl de água livre de nuclease (Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water); 7,2 µl de reagente de fragmentação (2.5 U/µl); 158,4 µl de tampão de fragmentação. A solução foi colocada no vórtex três vezes em alta velocidade e, com micropipeta, adicionou-se 10,0 µl aos poços correspondentes da placa. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes em alta velocidade e depois em uma centrífuga pré-refrigerada (4°C) a 2.000 rpm durante um minuto. A este

passo seguiu-se a incubação da reação em um termociclador nas seguintes condições: 37°C por 35 minutos, 95°C por 15 minutos e mantido a 4°C.

3º ponto verificação: foi feita eletroforese em gel de agarose 4% do produto fragmentado para checar se a fragmentação ocorreu de forma esperada. O padrão de bandas visualizado no gel deveria corresponder ao intervalo de 25 a 125 pb (Figura).

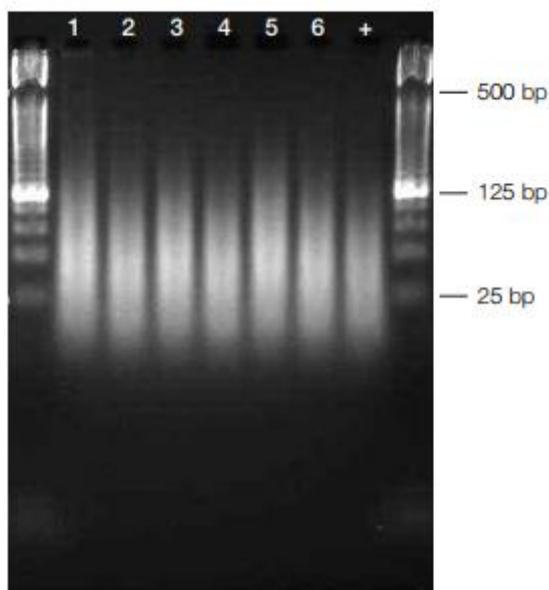


Figura 6. Gel de agarose 4% com o padrão de bandas dos produtos da reação da fragmentação. A maioria dos fragmentos deve estar entre 25 e 125 pb. **Fonte:** Cytoscan™ Assay Protocol.

Pré-marcação: a placa contendo o produto purificado foi levada ao vórtex três vezes em alta velocidade, e colocada sobre o bloco de refrigeração em gelo, onde permaneceu durante essa etapa. Em seguida, a solução da pré-marcação foi preparada em um tubo de 1,5 ml contendo os reagentes: 2,0 µl de reagente de marcação do DNA (30 mM DNA Labeling Reagent), 14,0 µl de tampão da *TdT 5X* e 3,5 µl de enzima *TdT*. A solução foi colocada no vórtex três vezes em alta velocidade, e com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados 19,5 µl aos poços correspondentes da placa. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes em alta velocidade e depois em uma centrífuga pré-refrigerada (4°C) a 2.000 rpm durante um minuto. A este passo, seguiu-se a incubação da reação em um termociclador nas seguintes condições: 37°C por 4 horas, 95°C por 15 minutos e mantido a 4°C.

Hibridação: nesta etapa, cada amostra foi hibridada em um *Chip CytoScan 750K Array (Affymetrix®)*. Inicialmente, a solução da hibridação foi preparado em um tubo de 1,5 ml contendo os reagentes: 165,0 µl de tampão de hibridação I, 15,0 µl tampão de hibridação II, 7,0 µl de tampão de hibridação III, 1,0 µl de tampão de hibridação IV e 2,0 µl do reagente *Oligo Control 0100*. A solução foi colocada no vórtex três vezes em alta velocidade. Com uma micropipeta foram adicionados 190 µl aos poços correspondentes das amostras. A placa foi selada, colocada no vórtex três vezes em alta velocidade, e centrifugada a 2.000 rpm durante um minuto. A este passo seguiu-se a incubação da reação em um termociclador nas seguintes condições: 95°C por 10 minutos e mantidas a 49°C. Após 1 minuto a 49°C, sem retirar a placa do termociclador, utilizando uma micropipeta de 200 µl, foram transferidos 200 µl da amostra e inseridos nos *chips* de cada amostra.

Foram utilizados adesivos para vedar os septos dos *chips*. Em seguida, foram levados ao forno de hibridação (GeneChip® Hybridization Oven 640; Affymetrix Inc.) a 50°C por 18 horas a 60 rpm.

Lavagem e marcação: o conteúdo do *chip* foi removido e substituído por 200 µl de tampão do *array (Array Holding Buffer)*. Em seguida, quatro *chips* de cada vez foram inseridos na estação de lavagem (GeneChip® Fluidics Station 450; Affymetrix Inc).

Na estação de lavagem foram executados os seguintes passos:

Remoção do excesso de marcador: dois recipientes contendo os tampões de lavagem A (*Wash A*) e B (*Wash B*) e outro recipiente contendo água estéril foram posicionados na parte lateral do equipamento.

Coloração: para cada *chip*, foram posicionados na parte frontal da estação 03 tubos de microcentrífuga de 1,5 ml contendo 500 µl dos tampões de coloração 1 (*Stain buffer 1*) e 2 (*Stain buffer 2*) e 500 µl do tampão do *array (Array holding buffer)*.

Escaneamento: para gerar os resultados da varredura completa do genoma, foi utilizado o equipamento GeneChip® Scanner 3.000 7G. A imagem

dessa leitura foi observada com o programa de visualização GeneChip® Operating software (GCOS) (Affymetrix®).

4.2.6.1 Análise e interpretação dos resultados da ACM

As alterações foram processadas pelo programa de computador *Chromosome Analysis Suite* (ChAS versão 3.1.0.1.5 (r9069) - Affymetrix®), que compara a intensidade de hibridação de cada sonda da amostra teste com 380 controles do HapMap. Para a interpretação dos resultados, as alterações encontradas na amostra teste foram comparadas com 117 controles compostos por indivíduos da população geral brasileira e 2.421 controles da base de dados interna da Affymetrix (aDGV - Affymetrix Database of Genomic Variants) disponível no ChAS. Em seguida, as alterações foram comparadas com as alterações depositadas no DGV (Database of Genomic Variants).

A análise e interpretação dos resultados da ACM foram realizadas seguindo as seguintes etapas:

Etapa 01: verificação da qualidade dos experimentos pelo programa *Chromosome Analysis Suite* (ChAS versão 3.1.0.1.5 (r9069) - Affymetrix®) analisando três parâmetros recomendados pelo fabricante que indicam se os dados obtidos foram úteis para a análise do número de cópias (CN): *SNPQC* (*Single Nucleotide Polymorphism Quality Control*): ≥ 12 ; *MAPD* (*Median Absolute Pairwise Difference*): $\leq 0,25$ e *WavinessSD* (*Waviness Standard Deviation*): $\leq 0,12$.

Etapa 02: na detecção de *CNVs* pelo programa ChAS o número de sondas necessárias para definir as variantes foi limitado no mínimo de 25, no caso de deleção, e de 50, no caso de duplicação. Os limiares foram determinados de acordo com o que foi recomendado pela Affymetrix®, como seguros na detecção de *CNVs* com pouco risco de resultados falso-positivos.

Etapa 03: verificou-se a presença de alterações maiores de 500 kb em regiões de desequilíbrios genômicos recorrentes (Síndromes de deleções/duplicações). Os dados clínicos dos indivíduos foram comparados com os descritos na literatura (GeneReview® - NCBI Bookshelf e artigos de revisão). Por outro lado, se não havia, seguiu-se para as próximas etapas.

Etapa 04: para cada desequilíbrio genômico encontrado, verificou-se a “confiabilidade” da alteração identificada pelo programa, principalmente para as alterações muito pequenas. Para isso, verificou-se a possibilidade da alteração ser artefato analisando o número de marcadores dentro da região do desequilíbrio (se a cobertura e distribuição eram boas ou não); gráficos de *Log2 Ratio* e se a alteração foi confirmada pelos oligonucleotídeos de *SNPs*.

As alterações com pouco indício de confiabilidade não foram consideradas como patogênicas. Verificou-se a presença da alteração no grupo controle. Se sim, foram consideradas como variações polimórficas as alterações encontradas em mais de 1% dos indivíduos nessas bases. Alterações que também são comuns nesses grupos controle foram classificadas como benignas.

Foi observada a sobreposição da região alterada com os controles. Quando não houve 100% de sobreposição, verificou-se se haviam genes na região sem sobreposição. Se sim, esta alteração não pode ser considerada semelhante à dos controles. Se a alteração teve frequência $\leq 1\%$ nos controles, seguiu-se para as próximas etapas (Figura 7).

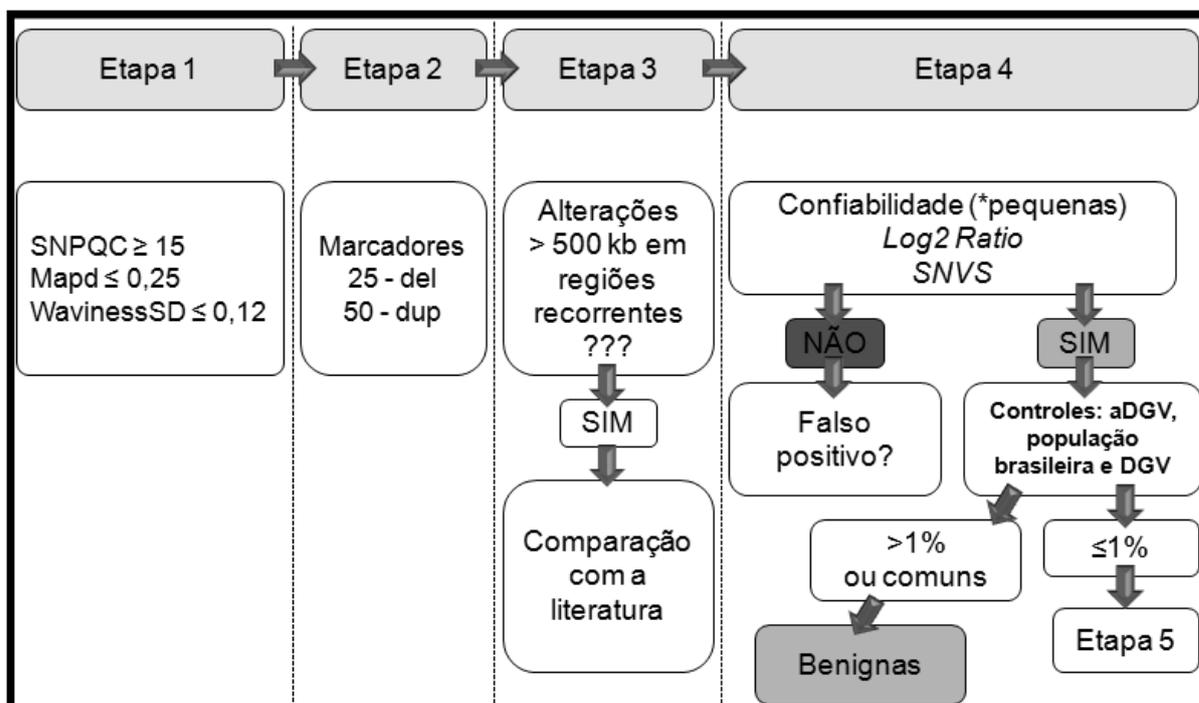


Figura 7. Desenho esquemático da análise e interpretação dos resultados da ACM nas etapas 1 a 4.

Etapa 05: para todos os casos, independentemente se foram ou não encontradas alterações nas etapas anteriores, foi verificado se havia regiões grandes com perda de heterozigose: para o chip *Cytoscan* 750 K seriam documentadas as regiões de perda de heterozigose (*LOH*) maiores que 5 Mb.

Etapa 06: foi verificado se havia alterações em mosaico. Se houvesse seriam selecionadas e documentadas apenas alterações maiores que 01 Mb.

Etapa 07: após essa análise inicial, foram selecionadas as alterações que ainda não foram classificadas como patogênicas e nem benignas, copiadas as coordenadas genômicas e pesquisadas no UCSC *Genome Browser*: <https://genome.ucsc.edu/> que foi configurado da seguinte maneira:

Foi selecionada a versão do genoma (*Human assembly*) hg19, de acordo com a versão do *chip* utilizado *Cytoscan* 750 K, e consultadas as seguintes bases de dados:

Phenotype and Literature: ClinGen CNVs, GeneReviews, OMIM Genes, OMIM Pheno Loci, DECIPHER (Database of chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources);

Variation: DGV Struct Var (Figura 8).

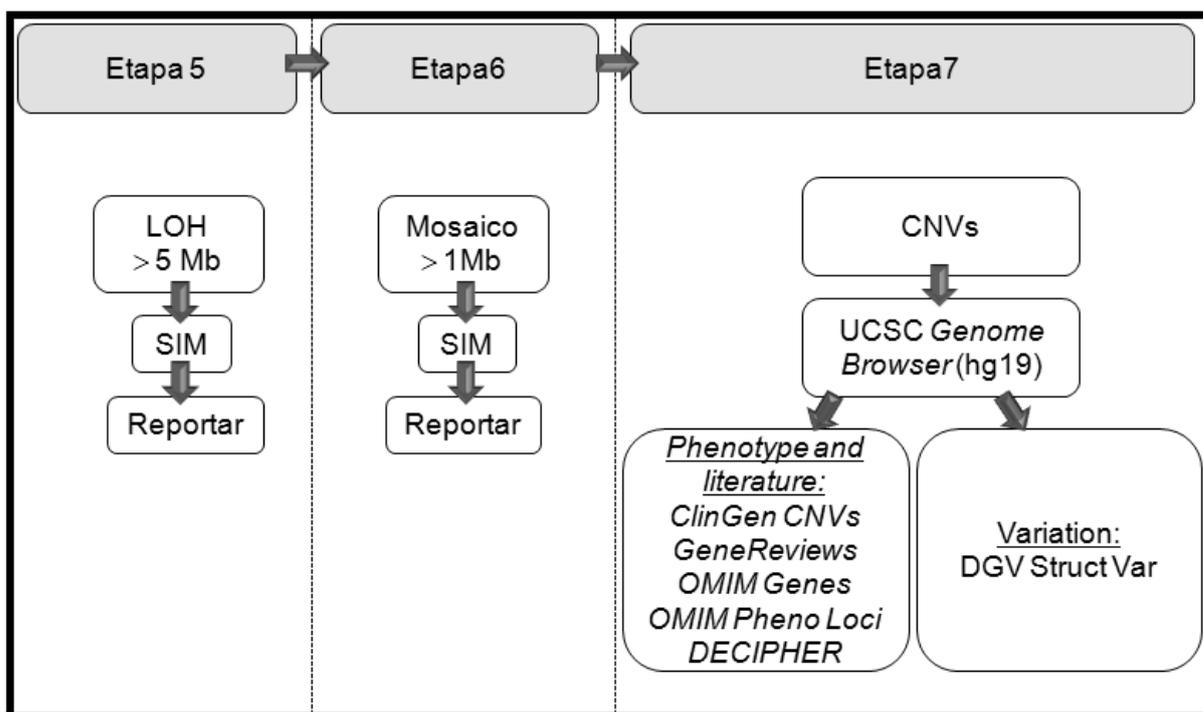


Figura 8. Desenho esquemático da análise e interpretação dos resultados da ACM nas etapas 5 a 7.

Foi observado se a alteração foi descrita no *DGV*. Se sim, foi pesquisado se era uma alteração frequente ou rara. Foram consideradas comuns as alterações descritas em pelo menos dois indivíduos em dois estudos diferentes depositados no *DGV* (84).

Foi considerada a sobreposição da região alterada com os controles. Quando não havia 100% de sobreposição, verificou-se se havia genes na região sem sobreposição. Se positivo, a alteração não pode ser considerada como semelhante. Além disso, também foi verificada a plataforma utilizada nos casos descritos no *DGV*. As alterações descritas no *DGV* que foram encontradas apenas em *arrays* de *BAC* (*Bacterial Artificial Chromosome*) de baixa resolução não puderam ser consideradas.

Foi observado se a alteração foi descrita em bases de dados clínicos (*DECIPHER* e *ClinGen*). Se sim, foi verificado se no paciente da base de dados foram encontradas outras alterações e como foram classificadas (se patogênicas ou não). Quando possível, o fenótipo foi comparado, preferencialmente com as alterações de tamanho igual ou menor. Se não havia, foram comparadas de acordo com a correlação genótipo-fenótipo e com os genes presentes na região de sobreposição.

A presença de genes *OMIM* dentro da região foi verificada, como também se a alteração incluía éxons. A investigação foi iniciada pelos genes comprovadamente relacionados com doença. Se havia a presença desses genes, foi verificado o padrão de herança da doença e o mecanismo patogênico da mutação (ganho ou perda de função) para correlacionar com o tipo de alteração encontrada (duplicação ou deleção) para certificar se os sinais clínicos eram compatíveis.

Após essa análise, as alterações que não foram encontradas nos controles do *aDGV* e *DGV* e que não foram encontradas anteriormente em outros pacientes com quadro clínico semelhante foram classificadas como: variante de significado incerto (Figura 9).

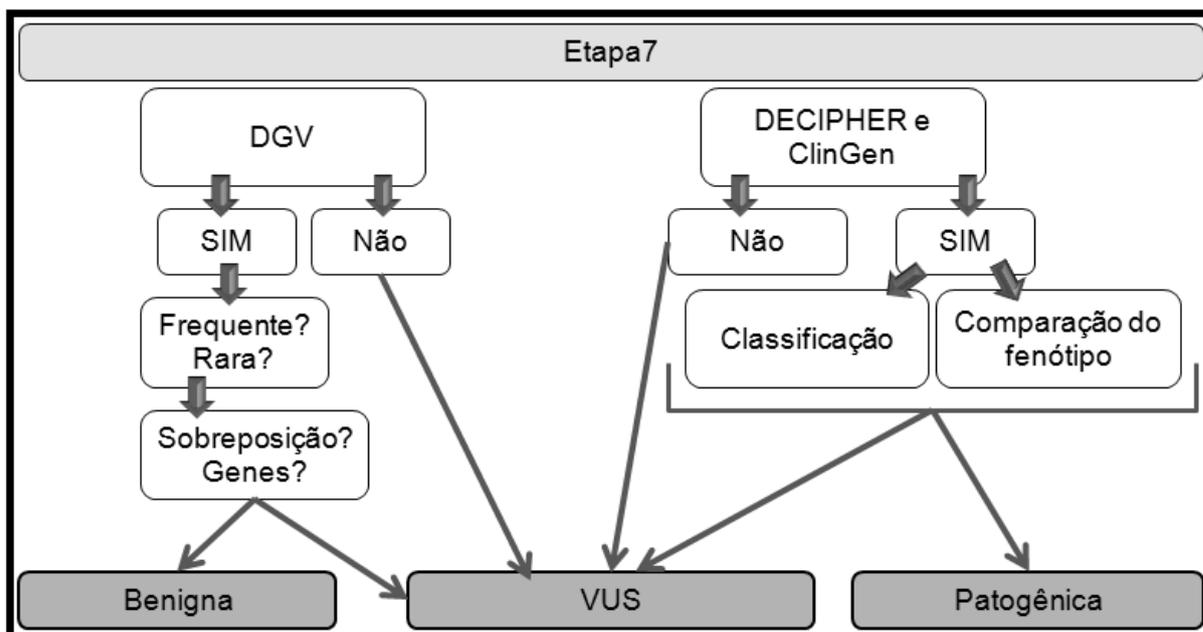


Figura 9. Desenho esquemático da análise e interpretação dos resultados da ACM da etapa 7.

Como os Chips da Affymetrix® são mistos, possuindo sondas para detecção de *CNVs* e *SNPs*, a análise do resultado é feita separadamente pelo *software*, não sendo necessária a confirmação por outra técnica (34).

4.2.7 Investigação complementar por FISH (hibridação fluorescente *in situ*)

Esta técnica foi utilizada para investigar se a deleção 5p15.33 e duplicação 13q34 do indivíduo 5 era *de novo* ou herdada de um genitor com rearranjo equilibrado. Desta forma, para a região 5p terminal foi utilizada a sonda comercial 5pter Subtelomere Specific Probe – Aquarius® (Cytocell Ltd).

Preparação e pré-tratamento das lâminas: pingou-se o material em lâminas limpas em álcool 70% e estas permaneceram por uma noite em estufa a 37°C. As lâminas foram observadas ao microscópio de contraste de fase para marcar a área onde seria aplicada a sonda, incubadas em uma solução de 2x SSC (pH 7,0)/0,5%Tween 20 a 37°C (±1°C) durante 20 minutos. Logo após, foram incubadas por 40 minutos em solução de pepsina a 37°C (±1°C) e lavadas por três minutos em PBS 1X, em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em uma solução de formaldeído 1%/PBS 1X por 10 minutos e lavadas por três minutos em outro PBS 1X, em temperatura ambiente. Depois, as lâminas

foram desidratadas em uma série etífica 70%, 85% e 100% por 2 minutos cada e foram secadas naturalmente.

Desnaturação das lâminas: as lâminas foram colocadas por 2 minutos na solução de desnaturação contendo 70% de formamida ultra pura/2xSSC a 70^o-75^oC. Em seguida foram mergulhadas em 2xSSC gelado e deixadas por três minutos em etanol 70%, 85% e 100% gelados. Logo após, foram secadas rapidamente.

Hibridação: A sonda foi deixada em temperatura ambiente por alguns minutos. Após, 2,0 µl da sonda (5pter) diluídos em 6 µl de tampão de hibridação foram desnaturados em banho seco aquecido a 100^oC e aplicados sobre a área de hibridação, coberta com lamínula de vidro e vedada com cola. Logo após, as lâminas foram incubadas com a sonda na câmara de hibridação (com algodão molhado com solução de 50% de formamida/2xSSC) a 37^oC por 48h.

Lavagem pós-hibridação: as lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas em solução formamida 50%/2xSSC a 37^oC por um minuto. Em seguida as lâminas foram colocadas em uma solução de 2xSSC a 37^oC por 01 minuto e 2xSSC/0,1%Tween 20 em temperatura ambiente por 02 minutos. Em seguida, aplicou-se DAPI sobre a área de hibridação que foi coberta com lamínula. Por fim, foi mantida em geladeira dentro de uma caixa escura.

Análise: foram analisadas 20 metáfases em microscópio de fluorescência da Olympus® com filtros de fluorescência adequados e as imagens foram capturadas utilizando o *software FISHView* da Applied Spectral Imaging®.

5. Resultados e discussão

5.1 Caracterização clínica da casuística

Dos 30 indivíduos estudados, 12 (40%) eram do sexo feminino e 18 (60%) do sexo masculino. No trabalho realizado por Rooryck e colaboradores (2010) e Beleza-Meireles e colaboradores (2015) a prevalência foi maior no sexo feminino, no entanto, segundo Gorlin e colaboradores (2001) a proporção masculino:feminino é de 3:2 (85).

As idades dos indivíduos ao diagnóstico foram de 1 a 20 anos, com média de 7,1 anos. Os indivíduos 20 (irmã) e 27 (irmão gêmeo) tinham recorrência de EOAV em parente de primeiro grau. Dois (19 e 29) tinham pais consanguíneos e dois (8 e 22) tinham irmão gêmeo não afetado (Figuras 10-14). Nesta casuística, três de 30 indivíduos (10%) tinham irmão gêmeo (de zigosidade não confirmada), sendo um par de gêmeos concordante para o fenótipo de EOAV e dois pares de gêmeos discordantes para esse fenótipo. A gemelaridade foi apontada anteriormente como um fator de risco para EOAV (26).

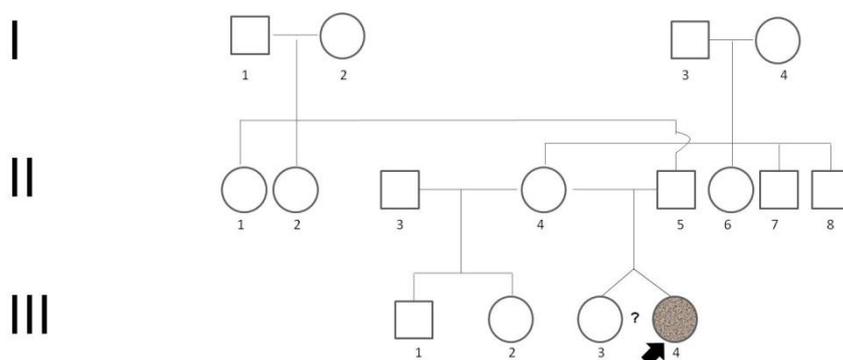


Figura 10. Heredograma do indivíduo 8.

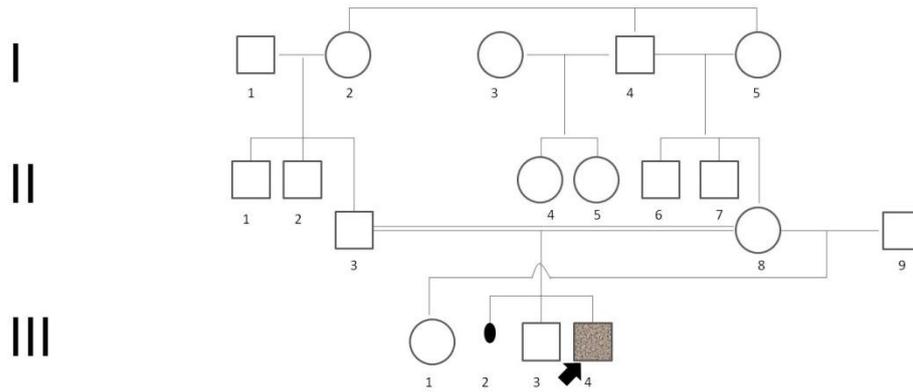


Figura 11. Heredograma do indivíduo 19.

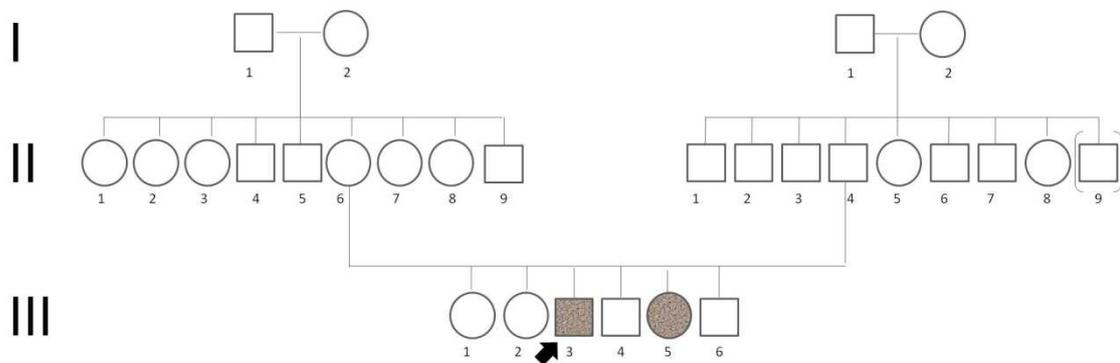


Figura 12. Heredograma do indivíduo 20.

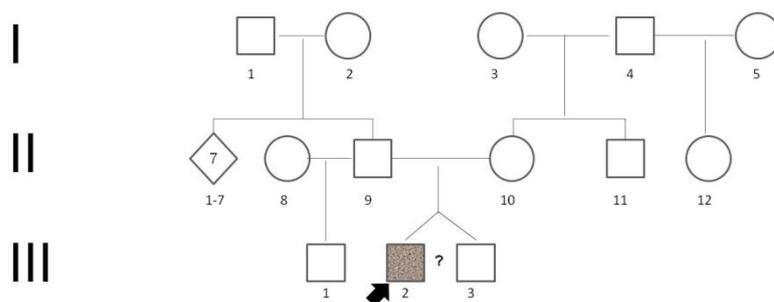


Figura 13. Heredograma do indivíduo 22.

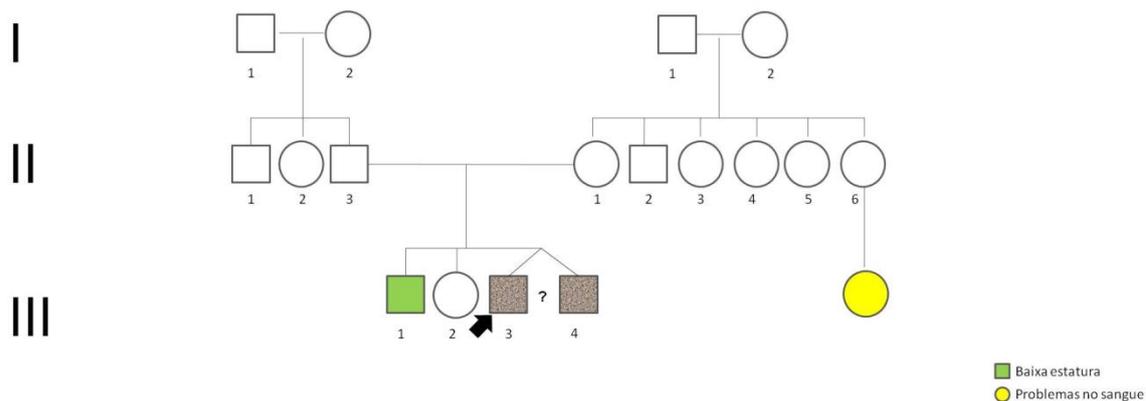


Figura 14. Heredograma do indivíduo 27.

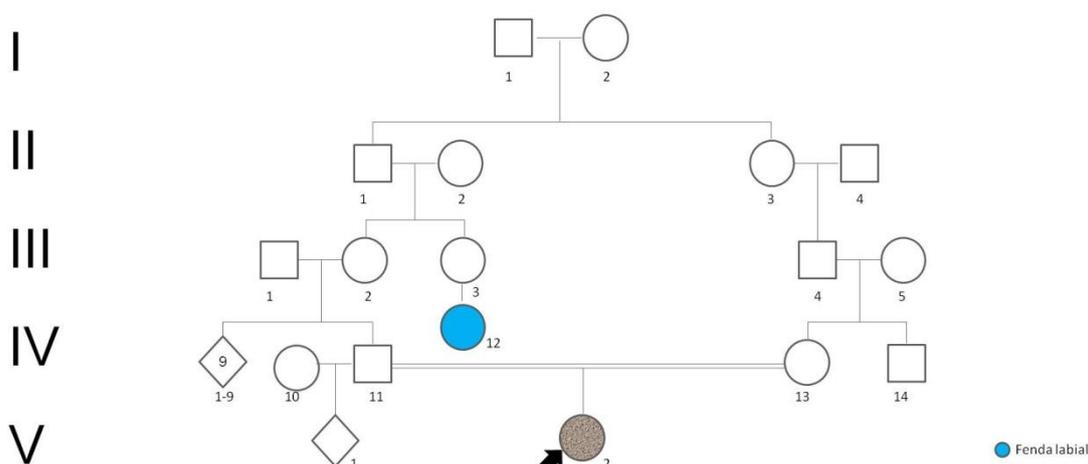


Figura 15. Heredograma do indivíduo 29.

Considerando que o desenvolvimento dos arcos faríngeos se inicia na quarta semana do desenvolvimento embrionário, os fatores externos que podem interferir neste processo são principalmente os que ocorrem entre o primeiro e o segundo trimestre do período gestacional (23). Alguns indivíduos tinham história gestacional positiva para fatores associados: a mãe do indivíduo 10 apresentou sangramento vaginal aos três meses de gestação; a mãe do indivíduo 16 engravidou usando DIU que foi retirado entre sete e oito semanas de gestação; a mãe do indivíduo 30 fez uso de Fenobarbital e Hidantoína durante todo o período gestacional e relatou sangramento vaginal no início da gravidez.

As principais características clínicas dos 30 indivíduos e resultado do cariótipo de 26 indivíduos estão descritos na Tabela 3.

As principais alterações auriculares encontradas foram: microtia (17/30), apêndices pré-auriculares (15/30), estenose de conduto auditivo (14/30), orifícios pré-auriculares (2/30), orelhas dismórficas (2/30). Entre as alterações oculares encontrou-se dermóide epibulbar em 7/30 indivíduos e coloboma em 1/30. Encontrou-se assimetria facial em 23/30 indivíduos, hipoplasia mandibular em 22/30 e hipoplasia de hemiface em 10/30. Entre as demais alterações craniofaciais, as principais foram: hipoplasia malar (7/30), fenda oral (6/30), macrostomia (6/30), micrognatia (4/30) e retrognatia (1/30). Entre as alterações vertebrais, 6/30 indivíduos apresentaram vértebras fundidas, 6/30 hemivértebras e 2/30 apresentaram escoliose. Defeitos cardíacos congênitos foram encontrados em 7/30 indivíduos, incluindo comunicação interventricular (CIV), comunicação interatrial (CIA), persistência do canal arterial (PCA) e Tretalogia de Fallot. Anomalias renais foram encontradas em 2/30 indivíduos, incluindo hidronefrose e agenesia renal. Apresentavam deficiência intelectual e (ou) atraso no desenvolvimento 7/30 dos indivíduos e 2/30 indivíduos apresentavam microcefalia (Figuras 16 e 17).

Os indivíduos foram investigados previamente pela análise do cariótipo por bandamento G (resultados descritos na tabela 3). Na análise de cariótipo duas alterações foram observadas: no indivíduo 7, uma inversão pericêntrica do cromossomo 9, inv(9)(p12q13) que, embora tenha sido relatada na literatura em indivíduo com EOAV (75), é considerada uma variante benigna, não tendo relação com o fenótipo (86); no indivíduo 19, o cariótipo 47,XXY correspondente a Síndrome de Klinefelter que também foi relatada na literatura em EOAV (72, 73). No entanto, neste último caso, as características clínicas que levaram ao diagnóstico de EOAV e a deficiência intelectual (DI) não são explicadas por esta alteração cromossômica. Em um estudo realizado em sete pacientes com aneuploidia de cromossomos sexuais, foi observado que as CNVs presentes nesses pacientes podem ser consideradas um fator independente para a DI e o atraso de desenvolvimento (87).

Tabela 3. Achados clínicos e resultado da análise de cariótipo dos 30 indivíduos.

			Manifestações clínicas																									
Indivíduo	Recorrência Familiar	Sexo	Cariótipo	Auriculares				Oculares	Craniofaciais						Vertebrais			Outras										
				Orelhas dismórficas	Microtia	Apêndices pré-auriculares	Orifícios pré-auriculares	Estenose de conduto	Dermóide Epibulbar	Coloboma	Assimetria facial	Hipoplasia de hemiface	Hipoplasia malar	Hipoplasia mandibular	Retrognatia	Micrognatia	Fenda oral	Macrostomia	Fundidas	Hemivértebras	Escoliose	Anomalias cardíacas	Anomalias renais	Atraso intelectual	Atraso desenvolvimento	Microcefalia		
1*		F	46,XX	-	-	B	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
2		F			E	-			-	-	+		-	E	-	+	-	-						-		-		-
3		M	46,XY		D			+	-	-	+		-	D	-	-	-	-		+	+			-		-	-	-
4		M	46,XY		D					-			-	D					-	-	-							
5*		M	46,XY	-	-	D	-		-	-	-		-	-	+	-	-	-					+		+	+	+	+
6*		F	46,XX			B			-	+	+					+	-	D						-				-
7		M	46,XY, inv(9)(p12q13)		E	-			-	-	+		-	E														
8*		F	46,XX		E	-		+	-	-	+		-	E	-	-	+	-						-		-	-	-
9*		F		-		B	+	+	E		+	+	+	E		+	-	-								+	+	
10		M	46,XY		E	E	-	+	-	-	+	+	+	E			-	-	-	+	+			-				-
11*		F	46,XX	+		E	+	+	-	-	+	E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
12*		F	46,XX	+	D		-	D	-		+	D	+	+	-	-	+		+	+			+		+	+	+	
13*		M	46,XY		B				-		+	E	-	E	-	-	+	-						-		+	+	
14		M	46,XY		E	D			D		+			E	-	+	-	-						-	-		-	-
15		F	46,XX		D			+	-		+			D			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
16		F	46,XX			D		+	-		+		-	D	-	-	-	-						+				-
17		M	46,XY		D				-		-	-	-	-	-	-	-	-						-		-	-	-
18		M	46,XY	-	-	B		+	E		+	+	+	D			-	-	+					-		-	-	-
19*		M	47,XXY		-	B			E		-	-	-	-	-	-	-	-						-		+	+	-
20*	+	M	46,XY						-		+			D													+	+
21		F	46,XX		E						+			E			-	-	-	-	-	-						
22		M	46,XY		E	-	-	+	-	-	-	-	-	E					+	+								
23*		M	46,XY		E	D		+	D		+		-	+	-	-	-	-	+	+			-	+	-	-	-	-
24*		M	46,XY		-	+			-		+	D	+	D	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
25*		M	46,XY		D	-			-		+	D	+	D	-	-	-	-	-	+	-			-	-	-	-	-
26*		M	46,XY		-	D		+	B		+	D	-	D	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
27*	+	M	46,XY		E			+			+			-					+						+			
28*		M				E			E		+			E			+	+	-	-	-							
29*		F	46,XX			+										+	+						+					
30		F			E						+	E	+	E														

*Indivíduos selecionados para ACM; B: bilateral; D: direito; E: esquerdo; +:apresenta o sinal clínico; -:não apresenta o sinal clínico.

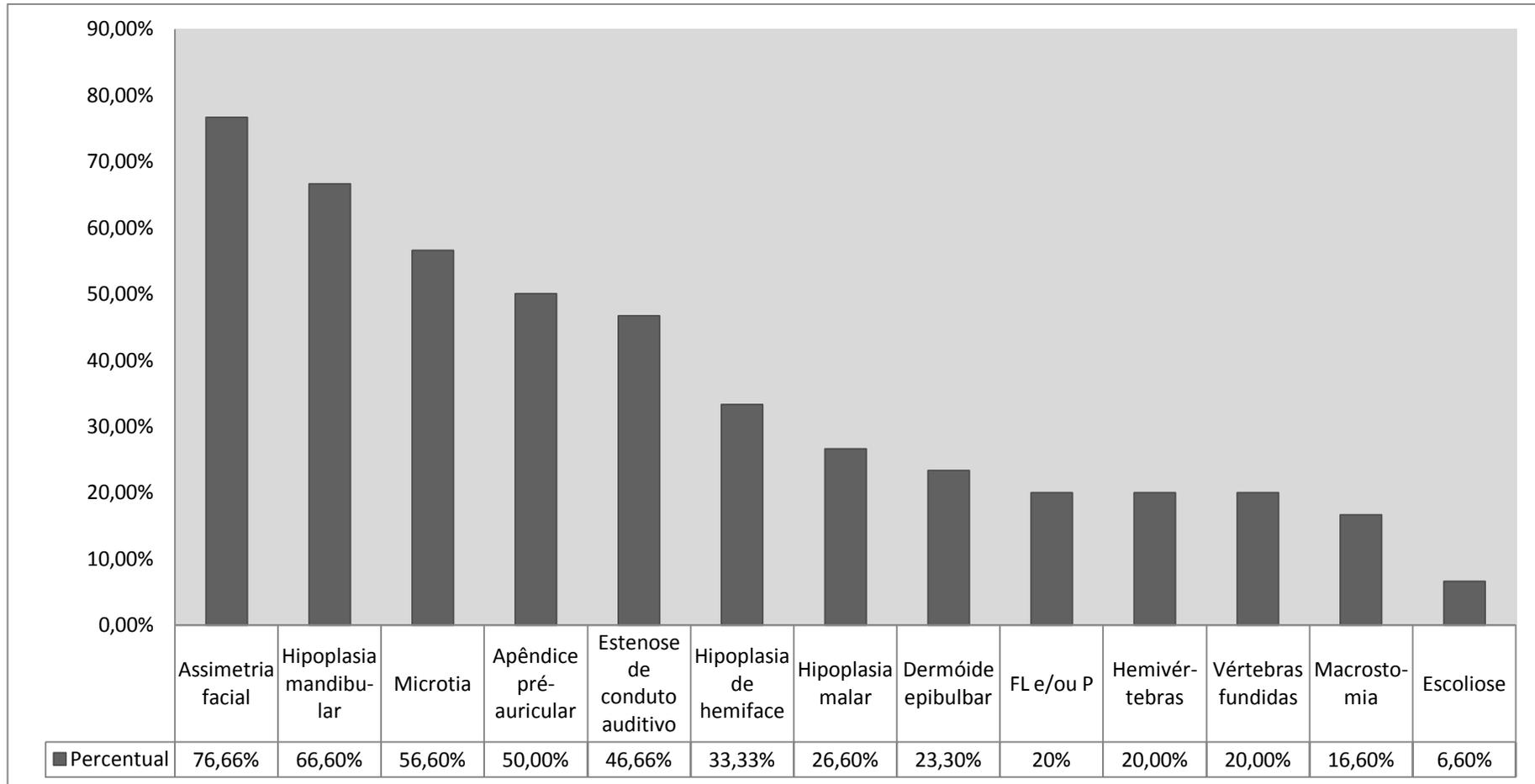


Figura 16. Principais características fenotípicas observadas nos indivíduos com EOAV.

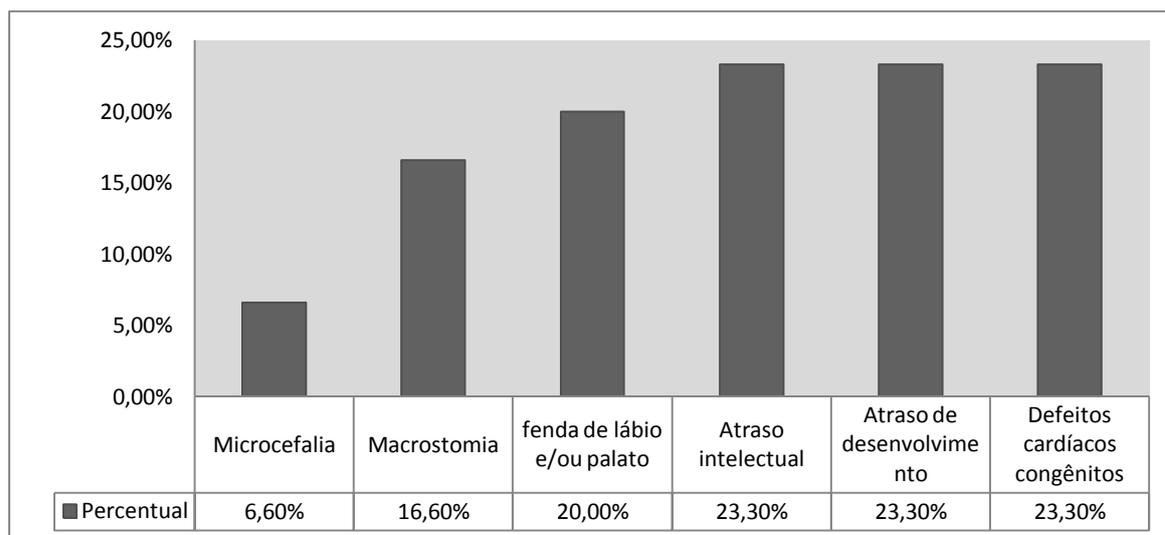


Figura 17. Principais características fenotípicas adicionais encontradas nos indivíduos com EOAV e que foram selecionados para a investigação por ACM.

A heterogeneidade clínica presente no EOAV desafia os geneticistas clínicos do Brasil e do mundo por seu diagnóstico ser ainda feito exclusivamente pela apresentação clínica do indivíduo. Na literatura alguns trabalhos propõem critérios mínimos para o diagnóstico de EOAV baseados nas características fenotípicas mais frequentes presentes nesta condição, como a microtia e os apêndices pré-auriculares (29, 85). Neste trabalho, foram incluídos todos os casos com suspeita clínica de EOAV, feita por médico geneticista, e foram estabelecidos critérios clínicos mínimos de seleção somente para a investigação genômica por ACM.

De acordo com os objetivos deste trabalho, os indivíduos selecionados para a ACM foram aqueles que apresentaram anomalias *major* adicionais, além daquelas consideradas como critérios mínimos do EOAV, e os que apresentaram MLPA alterado. Nas tabelas 4 e 5, pode-se observar que as alterações adicionais encontradas com maior frequência foram: defeitos cardíacos congênitos (23,3%) deficiência intelectual e (ou) atraso no desenvolvimento (23,3%) fenda de lábio e (ou) palato (20,0%) macrostomia (16,6%), alterações urogenitais (6,6%) e microcefalia (6,6 %) (Figura 17). Dos 17 indivíduos selecionados para a ACM, foi possível a realização da técnica somente para 15, devido à qualidade das amostras.

Das 15 ACM realizadas, a análise dos resultados pode ser executada somente para 13, as quais passaram nos parâmetros de qualidade do experimento (Tabela 5).

A heterogeneidade clínica observada (Tabela 3) nos indivíduos que foram atendidos e diagnosticados com EOAV em diferentes centros colaboradores evidencia a dificuldade no diagnóstico clínico. A Tabela 4 mostra a porcentagem dos casos que apresenta cada sinal clínico específico e a comparação com diferentes trabalhos da literatura. Nessa tabela fica clara a heterogeneidade clínica desta condição, no entanto é importante considerar que os trabalhos utilizaram diferentes protocolos para a investigação clínica e diferentes critérios mínimos de inclusão (86).

Tabela 4. Comparação da casuística do presente trabalho com outros da literatura.

	Presente trabalho (n=30)	Tasse et al, 2005 (n=53)	Rooryck et al, 2010 (n=95)	Beleza-Meireles et al, 2015 (n=51)	Pegler et al, 2016 (n=41)	Cohen et al, 2017 (n=95)	Bragagnolo, et al, 2018 (n=72)
Manifestações Clínicas							
Auriculares	96,6%	100%		92%	97,5%		
Microtia	56,6%	100%	70%		73%		100%
Apêndices pré-auriculares	50,0%	100%	67%	53%	51,2%	62%	44%
Orifícios pré-auriculares	6,6%						3%
Faciais	93,33%				90,2%		
Hipoplasia malar	26,6%		76%				
Hipoplasia mandibular	66,6%		76%				94%
Micro/Retrognatia	16,6%		22%				
Fendas de lábio e/ou palato	20,0%	40%	18%		7,3%	13%	19%
Macrostomia	16,6%		13%			46%	43%
Oculares	26,6%	98,11%	43,0%	29,0%	53,7%		
Dermoide epibulbar	23,3%	18,86%	31,0%	16,0%	24,39%		15%
Coloboma na pálpebra superior		7,54%	11,0%	4,0%			
Vertebrais	30,0%	19,0%	35,0%	20,0%	65,9%	47,0%	83%
Hemivértebras	20,0%			6%	24,4%		
Vértebras fundidas	20,0%			9,8%	21,95%		
Escoliose	6,6%			9,8%	31,7%		
Cardíacas	23,3%	15,09%	27%	16%	36,6%	30%	39%
CIA	10,0%	1,88%		2,96%	14,6%		
CIV	13,3%	7,54%		7,84%	12,2%		
PCA	3,3%						
Estenose da Aorta		1,88%					
Tretalogia de Fallot	3,3%				4,9%		
Urogenital	6,6%	18,86%	7%	10%	29,3%	29%	14%
Dilatação pielocalicial	3,3%						
Rim pélvico					19,0%		
Agnesia Renal	3,3%	3,77%					
Ectasia pielocalicial							
Duplicação pielouretal							
Refluxo vesicouretal							
Hipospadia		3,77%					
Sistema Nervoso	13,3%	15,09%	2%	10%	17%	16,84%	22%
Micro/Macrocefalia	6,6%	5,66%		3,92%			
Hidrocefalia	3,3%						
Ventrículos assimétricos	3,3%	1,88%					
Expansão dos ventrículos			2%		7,31%		
Disgenesia do corpo caloso					4,87%		
Lipoma		5,66%					
Atraso de desenvolvimento	23,3%	5,55%	14%	18%			21%
Deficiência intelectual Associado a outras síndromes	23,3%					5%	
	10%					4%	

CIA: Comunicação interatrial; CIV: comunicação interventricular; PCA: persistência do canal arterial;

Tabela 5. Fenótipo dos indivíduos selecionados para ACM

Indivíduo	Fenótipo
1	Orelhas de baixa implantação, apêndices pré-auriculares B, meato auditivo externo estreito, hipoplasia de arco zigomático, fenda de lábio e palato, cardiopatia congênita (CIA e CIV), pâncreas anular, atresia intestinal, hidronefrose e atraso de desenvolvimento.
5	Microcefalia, implantação baixa dos cabelos na nuca, dois apêndices pré-auriculares à direita, epicanto, sinofre, hipoplasia malar, micrognatia, clinodactilia em 5º dedo das mãos, mancha café-com-leite em face lateral direita do tórax, cardiopatia congênita (PCA, CIA e coarctação de aorta), marcha com base alargada, deficiência auditiva*, déficit intelectual.
6	Occipital plano, implantação baixa de cabelos na nuca, apêndices pré-auriculares, sinofre, coloboma, epicanto, estrabismo, assimetria facial, filtro longo, macrostomia, micrognatia, pescoço curto, hérnia inguinal, clinodactilia do 2º dedo do pé.
8	Hemangioma plano da região da nuca, anotia E, atresia de meato auditivo D, fenda palpebral oblíqua, ponte nasal baixa, assimetria facial, hipoplasia de hemiface, hipoplasia da musculatura facial, hipoplasia malar, hipoplasia maxilar, hipoplasia mandibular, micrognatia, fenda de lábio e palato.
9	Apêndices pré-auriculares, orifícios pré-auriculares, atresia de meato auditivo B, dermoide epibulbar esquerdo, assimetria facial, hipoplasia de hemiface, hipoplasia da musculatura facial, hipoplasia malar, hipoplasia maxilar, hipoplasia mandibular, micrognatia e atraso neuropsicomotor.
11 α	Apêndices pré-auriculares, orifícios pré-auriculares, orelhas dismórficas e de baixa implantação, estenose de meato auditivo B, sinofre, epicanto, fenda palatina, pescoço curto, torcicolo congênito, alterações nas vértebras torácicas T1-T2.
12	Occipital proeminente, frontal abaulado, assimetria facial, orelha com formato rudimentar e implantação baixa, fenda palpebral oblíqua, epicanto, ponte nasal baixa, CIA, deformidades na coluna vertebral, hipoplasia de glúteos, desalinhamento de dedos e atraso neuropsicomotor.
13	Orelha de formato rudimentar e de implantação baixa, fenda de palato, atraso motor e de linguagem; quadro sugestivo de déficit intelectual.
19 \clubsuit	Apêndices pré-auriculares; dermóides epibulbares E; micrognatia e geno valgo; Atelectasias pulmonares parciais em lobos superiores direito e esquerdo.
20	Microcefalia, orelhas proeminentes e dismórficas assimetria facial, aumento da distância intermamilar discretamente, clinodactilia de 5º dedos e atraso de desenvolvimento.
23	Apêndice pré-auricular D; microtia E grau I; atresia de meato auditivo leve E; estrabismo, dermoide epibulbares D, assimetria facial leve; hipoplasia maxilar leve; hipoplasia mandibular leve, hemivértebras T3-T4-T5-E L2-L3, fusão vertebral e CIV.
24	Apêndices pré-auriculares, epicanto, assimetria facial; hipoplasia de hemiface direita; hipoplasia da musculatura facial; hipoplasia malar; hipoplasia mandibular; macrostomia e atraso Intelectual.
25 Δ	Microtia D grau II; malformação de ossículos, assimetria facial; hipoplasia de hemiface D; hipoplasia da musculatura facial; hipoplasia malar; hipoplasia mandibular; hipoplasia vertebral e hemivértebras.
26	Apêndices pré-auriculares D; atresia do meato auditivo E; dermoide epibular B; assimetria facial; hipoplasia de hemiface; hipoplasia da musculatura facial; hipoplasia mandibular; macrostomia e tetralogia de fallot.
27	Microtia E, atresia de meato auditivo (mais acentuado o lado D); assimetria facial, epicanto, agenesia renal, lordose cervical, fusão dos corpos vertebrais C2-C3 e espinha bífida em C3-C4.
28 \clubsuit	Apêndices pré-auriculares E, dermóides epibulbares E, assimetria facial, hipoplasia mandibular E; macrostomia (fenda número 7) E, fôvea coccígea.
29 \clubsuit	Apêndices pré-auriculares; hidrocefalia; fenda completa de palato e fenda de lábio; assimetria facial*, fenda palpebral oblíqua, ponte nasal baixa; macrostomia, anquiloglossia; CIA e CIV;

CIA: Comunicação interatrial; CIV: comunicação interventricular; PCA: persistência do canal arterial; D: direito; E: esquerdo; B: bilateral; *secundária; Δ : Possui MLPA alterado; \clubsuit amostras de DNA genômico não estavam dentro dos parâmetros de qualidade; \square ACM não passou nos parâmetros de qualidade;

5.2 Desequilíbrios genômicos encontrados por MLPA e ACM

A triagem de microdeleções em 22q11.2 por MLPA foi realizada para os 30 indivíduos e revelou desequilíbrios genômicos em três indivíduos: uma deleção distal entre as LCRs D-E no indivíduo 1; uma duplicação da sonda do gene *TOP3B* no indivíduo 13; e uma deleção de ambas as sondas dos genes *TBX1* e *SHANK3* no indivíduo 25 (Tabela 6). Devido às alterações encontradas por MLPA, todos esses indivíduos foram investigados pela técnica de ACM.

A análise da ACM foi realizada para 13 indivíduos e revelou alterações em cinco deles: uma deleção distal em 22q11.2 no indivíduo 1 (previamente detectada por MLPA); uma deleção terminal em 5p e uma duplicação terminal em 13q no indivíduo 5; uma duplicação em 9p22.1 no indivíduo 6; uma duplicação em 22q11.22 (previamente detectada por MLPA) e uma duplicação em 5q22.1 no indivíduo 13; e uma perda de heterozigose de 8 Mb em 17p12 no indivíduo 25. As interpretações dos resultados da ACM estão descritas na Tabela 6 e discutidas, caso a caso, a seguir.

Tabela 6. Desequilíbrios genômicos encontrados por MLPA e ACM.

Indivíduo	Resultado de <i>MLPA</i> (EnsaioP250-B2)	Resultado de ACM (Affymetrix 750K)	Interpretação da ACM
1	rsa 22q11.2(HIC2,PPIL2, TOP3B)×1	arr[GRCh37] 22q11.21q11.22(21464763_22962962)×1	del 22q11 – 1.048 kb Patogênica
5	rsa 22q11.2(P250B2)×2	arr[GRCh37] 5p15.33p15.2(113576_10885441)×1, 13q34(113107756_115107733)×3	del 5p15 –10.772 kb; dup 13q34 – 2.000 kb - Ambas patogênicas
6	rsa 22q11.2(P250B2)×2	arr[GRCh37] 9p22.1(19037935_19463385)×3	dup 9p22.1 - 425 kb VUS
13	rsa 22q11.2(TOP3B)×3	arr[GRCh37] 22q11.22(22311348_22572480)×3, 5q22.1(110237190_110772699)×3	dup 22q11.22 - 261 kb ; dup 5q22.1- 526 kb Benigna; VUS
25	rsa 22q11.2(TBX1,SHANK3)×1	arr[GRCh37] 17p12p11.2(13678238_22170994) hmz,	LOH 17p12 - 8000kb VUS

rsa: *region specific assay*; del: deleção; arr: *array*; NL: normal; dup: duplicação; hmz: região de homozigose; VUS: *variants of unknown significance* (variante de significado incerto).

5.2.1 Variantes patogênicas

Das sete variantes genéticas encontradas, três, em dois indivíduos, foram consideradas patogênicas: a deleção distal em 22q11.2 encontrada no indivíduo 1 (Figura 18); a deleção em 5p15 e a duplicação em 13q34 encontradas no indivíduo 5 (Figura 19).

5.2.1.1 Deleção distal em 22q11.2

O indivíduo 1 apresentou uma deleção de 1.048 Mb em 22q11.2. As principais características clínicas apresentadas foram: orelhas de baixa implantação, apêndices pré-auriculares bilaterais, meato auditivo externo estreito, hipoplasia de zigomático, fenda de lábio e palato, cardiopatia congênita (CIA e CIV), pâncreas anular, atresia intestinal e hidronefrose.

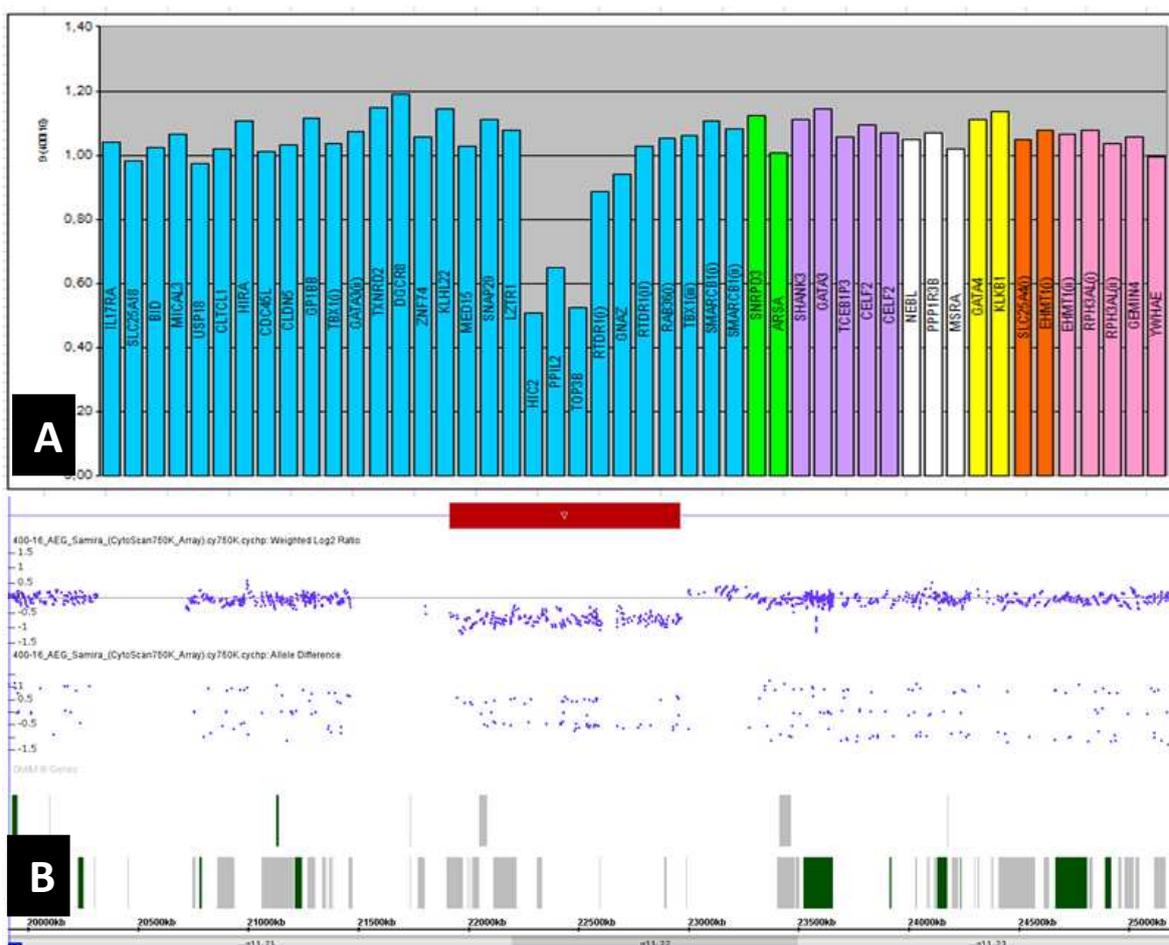


Figura 18. A: resultados de *MLPA* do **indivíduo 1** mostrando uma deleção das sondas HIC2, PPIL2 e TOP3B; **B:** Perfil de hibridação parcial do cromossomo 22 mostrando uma deleção de 1.048 kb na região 22q11.2 arr[GRCh37]22q11.21q11.22(21464763_22962962)*1, classificada como patogênica.

Na literatura 11 casos de EOAV com deleções na região 22q11.2 foram descritos (55-61, 87). Os indivíduos descritos na literatura e o indivíduo deste trabalho compartilham algumas características como apêndices pré-auriculares, hipoplasia malar e fenda de lábio e palato. A deleção em 22q11.2 encontrada no indivíduo 1 localiza-se na região distal entre as *LCRs* D e E, como a observada por Xu e colaboradores (2008) (59), classificada como deleção distal do tipo I (81).

No *DECIPHER* os pacientes 250906, 248709, 275765, 4625 possuem deleção 22q11.2 distal e apresentam algumas características fenotípicas que sobrepõem ao EOAV como: microtia, apêndices pré-auriculares, deficiência auditiva, hipoplasia malar, fendas orofaciais e micrognatia.

Na região deletada em 22q11.2 há 17 genes, dos quais nove estão catalogados na base de dados do *OMIM*. Desses genes, três são candidatos para alterações craniofaciais e cardiopatias congênitas: *YPEL1*, *ERK2* e *HIC2* (88-90).

O *YPEL1* demonstrou papel no desenvolvimento de estruturas derivadas dos arcos faríngeos em *Zebrafish Ypel1 knockdown*, que apresentou defeitos no desenvolvimento de estruturas craniofaciais e na mandíbula (88).

A haploinsuficiência do *ERK2* tem sido citada como uma das possíveis causas de cardiopatias congênitas e anomalias craniofaciais em pacientes com deleção 22q11.2, pela falha do desenvolvimento das células da crista neural. Em um estudo foi demonstrado que a eliminação do *ERK2* levou a defeitos cardíacos e alterações craniofaciais em camundongos (89).

Outro gene candidato para os defeitos cardíacos é o *HIC2*, tendo demonstrado papel em alguns estágios do desenvolvimento cardíaco (90).

Este relato de caso foi aceito no *European Journal of Medical Genetics* e sua versão *on line* esta acessível (Anexo 4).

5.2.1.2 Deleção em 5p15 associada à duplicação em 13q34

O indivíduo 5 apresentou uma deleção em 5p15 de 10.772 kb (ou 10,7 Mb) e uma duplicação em 13q34 de 2.000 kb (ou 2,0 Mb). Ambas as alterações são de regiões terminais, o que sugere um rearranjo cromossômico desequilibrado.

Foram analisados os cariótipos de ambos os genitores, que tiveram resultado normal. Ainda, foi realizada a análise por FISH com sonda subtelomérica do braço curto do cromossomo 5, que revelou hibridação desta em ambos os cromossomos 5 da mãe (Figura 19 C). Portanto, trata-se de um rearranjo cromossômico *de novo*. As principais características clínicas apresentadas foram: microcefalia, implantação baixa dos cabelos na nuca, dois apêndices pré-auriculares à direita, epicanto, sinofre, hipoplasia malar, micrognatia, clinodactilia em 5º dedo da mão (bilateralmente), mancha café-com-leite em face lateral direita do tórax, cardiopatia congênita, marcha com base alargada e déficit intelectual.

A deleção em 5p é associada à Síndrome de Cri du chat, descrita em 1963 por Lejeune e colaboradores. O fenótipo clássico predominante dessa síndrome é composto por choro típico, características dismórficas, atraso de crescimento e desenvolvimento. A variabilidade fenotípica observada nos pacientes com essa síndrome se deve aos diferentes pontos de quebra e dos seus genótipos. Embora os pontos de quebra sejam similares, não há um recorrente (78).

Como os estudos na literatura reforçam, a variabilidade na apresentação fenotípica dos pacientes com a Síndrome de Cri du Chat pode ocorrer devido a diferenças presentes em seus genótipos, além disso, a interação dos genes presentes nessas duas regiões 5p15 e 13q34 podem contribuir para tais diferenças (53).

As deleções 5p estão entre as alterações cromossômicas mais recorrentes no EOAV (31, 49-54). Dessa forma, a possibilidade de haver genes dentro da região associada ao fenótipo da Síndrome de Cri du Chat que estão implicados no fenótipo do EOAV foi sugerida por Choong e colaboradores (2003).

Na literatura, os casos descritos de EOAV com deleção 5p compartilham algumas características, principalmente os apêndices pré-auriculares (Tabela 7).

O braço longo do cromossomo 13 é uma região rica em genes. A duplicação 13q34 foi encontrada em paciente que apresentava dimorfismos faciais, deficiência intelectual, distonia e câncer de mama. Os autores sugeriram que o gene *TFDP1* pode ser a causa de um ou mais dos sinais apresentados pela paciente do

sexo feminino. No entanto, seu pai que também possuía essa alteração não apresentou deficiência intelectual (91).

Outro indivíduo com trissomia 13q34 devido a uma translocação 13q;21p, na qual houve conservação da maior parte da região codificante telomérica do cromossomo 21 derivado, foi descrito com atraso intelectual grave e distúrbios faciais: fronte pequena e protuberante, hipertelorismo ocular, ponte nasal baixa, filtro labial apagado, palato alto e arqueado e mãos pequenas (92).

No *DECIPHER* o paciente 288802 que possui duplicação de 1,33 Mb em 13q34, classificada como patogênica, apresentou disartria, deficiência intelectual e tiques.

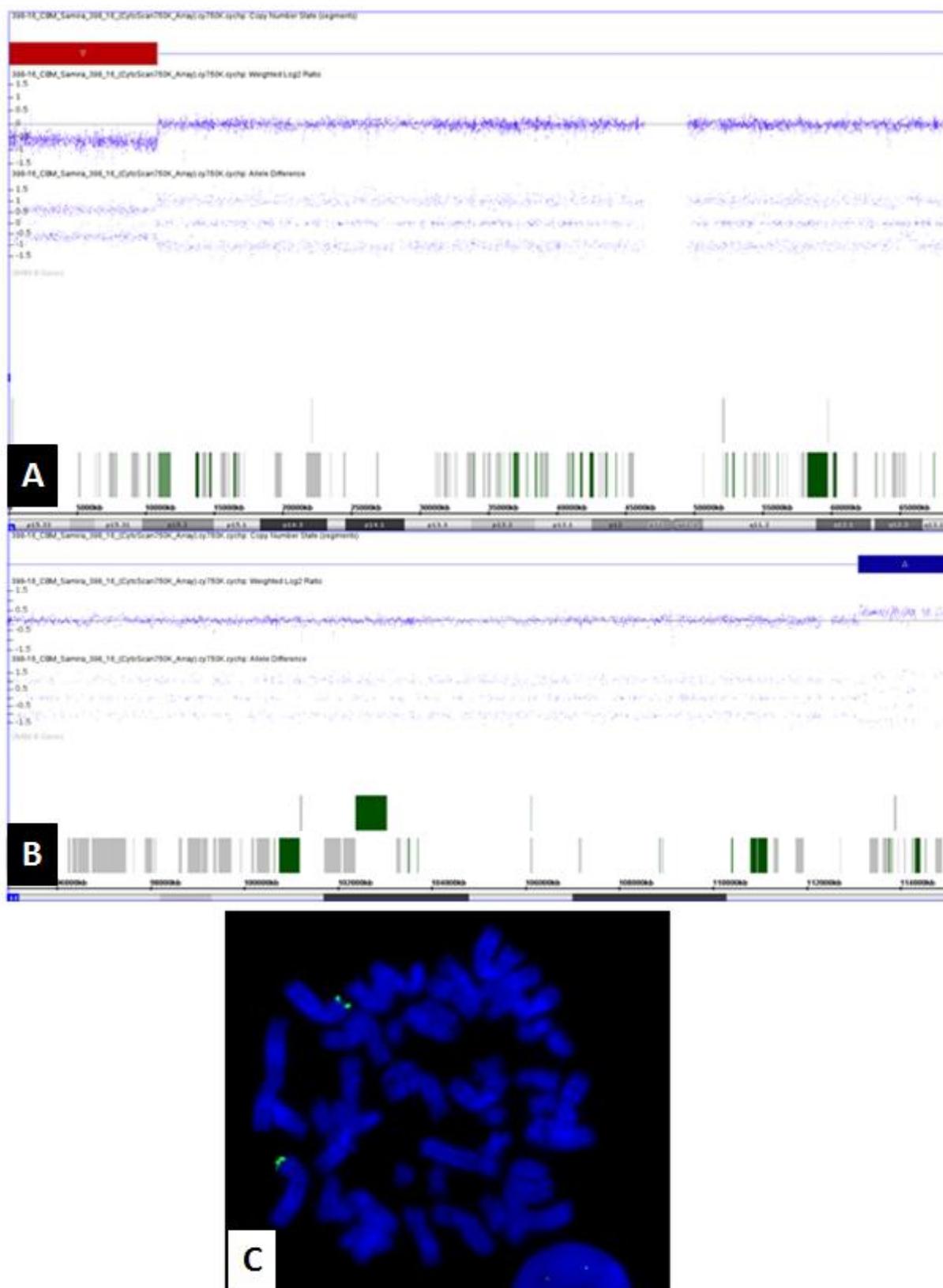


Figura 19. Resultado de ACM do **indivíduo 5** mostrando duas variantes patogênicas **A:** perfil de hibridação parcial do cromossomo 5 mostrando uma deleção de 10.772 kb na região 5p15.33 arr[GRCh37]5p15.33p15.2(113576_10885441)*1. **B:** perfil de hibridação do cromossomo 13 mostrando uma duplicação de 2.000 kb na região 13q34 arr[GRCh37]13q34(113107756_115107733)*3; **C:** Resultado de *FISH* (Hibridação Fluorescente *in situ*) da mãe do paciente mostrando o sinal da sonda 5pter subteloômérica marcada em verde.

Tabela 7. Comparação do fenótipo dos casos de EOAV com deleção 5p descritos na literatura e o indivíduo 5.

	Dyggve and Mikklson, 1965	Ladekarl, 1968	Neu et al, 1982	Choong et al, 2003	Josifova et al, 2004	Descartes et al, 2006	Ala-Mello et al, 2008	Indivíduo 5
Alteração	del 4p-5p	del 5p	del 5p14	del 5p14	del 5p15.3, dup 8p23.1 p-ter	del 5p15.33	del 5p15.33, del 21q22.3, q-ter, ddup 21q21q22	del 5p15, dup 13q34
OAV								
Macrostomia	-	-	D	NR	-	E	E	-
Microsomia hemifacial	NR	NR	+	+	-	-	+	-
Apêndice pré-auricular	D	E	B	B	B	B	E	D
Microtia	-	-	D	-	NR	-	-	-
Dermóide epibulbar	-	+	NR	+	-	-	+	-
Alterações vertebrais	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
OUTROS								
Cardiopatias		-	-	-	-	-	+	+
Alterações de membros	NR	NR	NR	NR	NR	+	-	-
Alterações renais	NR	NR	NR	+	NR	-	-	-

5.2.2 Variantes de significado incerto (*variants of unknown significance – vus*)

Quatro variantes de significado incerto foram observadas: uma duplicação em 9p22.1 no indivíduo 6 (Figura 20); uma duplicação em 5q22.1 encontrada no indivíduo 13 (Figura 21); deleções em 22q11.2 e perda de heterozigose em 17p12 encontradas no indivíduo 25 (Figuras 22 - 24).

5.2.2.1 Duplicação em 9p22.1

O Indivíduo 6 apresentou uma duplicação em 9p22.1 de 425 kb. As principais características clínicas apresentadas foram: occipital plano, implantação baixa de cabelos na nuca, assimetria facial, apêndices pré-auriculares, coloboma, epicanto, estrabismo, macrostomia com fenda lateral, hérnia umbilical, clinodactilia do 2º dedo do pé.

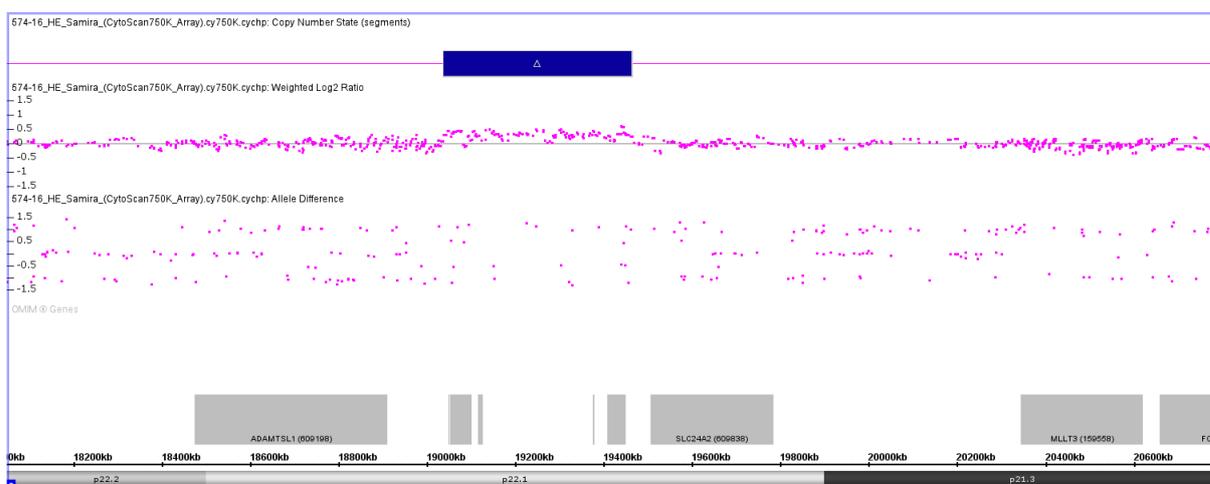


Figura 20. Resultados de ACM do **indivíduo 6** mostrando perfil de hibridação do cromossomo 9 com uma duplicação de 425 kb na região 9p22.1 arr[GRCh37] 9p22.1(19037935_19463385) \times 3, classificada como variante de significado incerto.

As duplicações em 9p isoladas não são frequentes, associadas às trissomias do cromossomo 21, 18 e 13 são as trissomias mais frequentes encontradas em recém-nascidos, isto está relacionado à baixa concentração gênica nesta região (93).

Associados a duplicação 9p parcial e completa incluem os sinais clínicos: nariz proeminente e largo, ponta nasal bulbosa, baixa implantação das orelhas, pescoço curto, clinodactilia e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor e de fala (93). No entanto, a região 9p22.3-p23 tem sido considerada a região crítica para a Síndrome de duplicação em 9p (94).

Na literatura uma menina com uma duplicação em 9p, (9p)(p22.1→p13.1) de aproximadamente 20 Mb apresentou quociente de inteligência (QI) normal e poucos sinais clínicos, como dolicocefalia, dentes aglomerados e palato alto (94).

A duplicação do indivíduo 6 deste estudo possui 425 kb e 7 genes, dos quais 5 estão catalogados na base de dados *OMIM*: *RRAGA*, *HAUS6*, *PLIN2*, *RPS6*, *ACER2*. Não houve sobreposição desta alteração com os 117 controles da população brasileira. No aDGV e DGV não houve alteração com 100% de sobreposição. No DECIPHER foram observadas cinco duplicações menores, sobrepondo boa parte da alteração, e outras alterações maiores. Os indivíduos do DECIPHER apresentaram fenda de palato, micrognatia, atraso no desenvolvimento e hipotonia central. Essas alterações foram consideradas VUS.

Não há associação dos genes, dentro ou próximo da região alterada, com alterações no desenvolvimento dos arcos faríngeos. Portanto, como não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo e essa duplicação é uma variante rara de origem parental desconhecida, foi classificada como VUS.

5.2.2.2 Duplicação em 5q22.1

O Indivíduo 13 apresentou uma duplicação em 22q11.22 de 261 kb que foi classificada como benigna e uma duplicação em 5q22.1 de 536 kb (Figura 21) classificada como VUS. As principais características clínicas apresentadas foram: orelha de formato rudimentar e de implantação baixa, fenda de palato, atraso motor e de linguagem; quadro sugestivo de déficit intelectual.

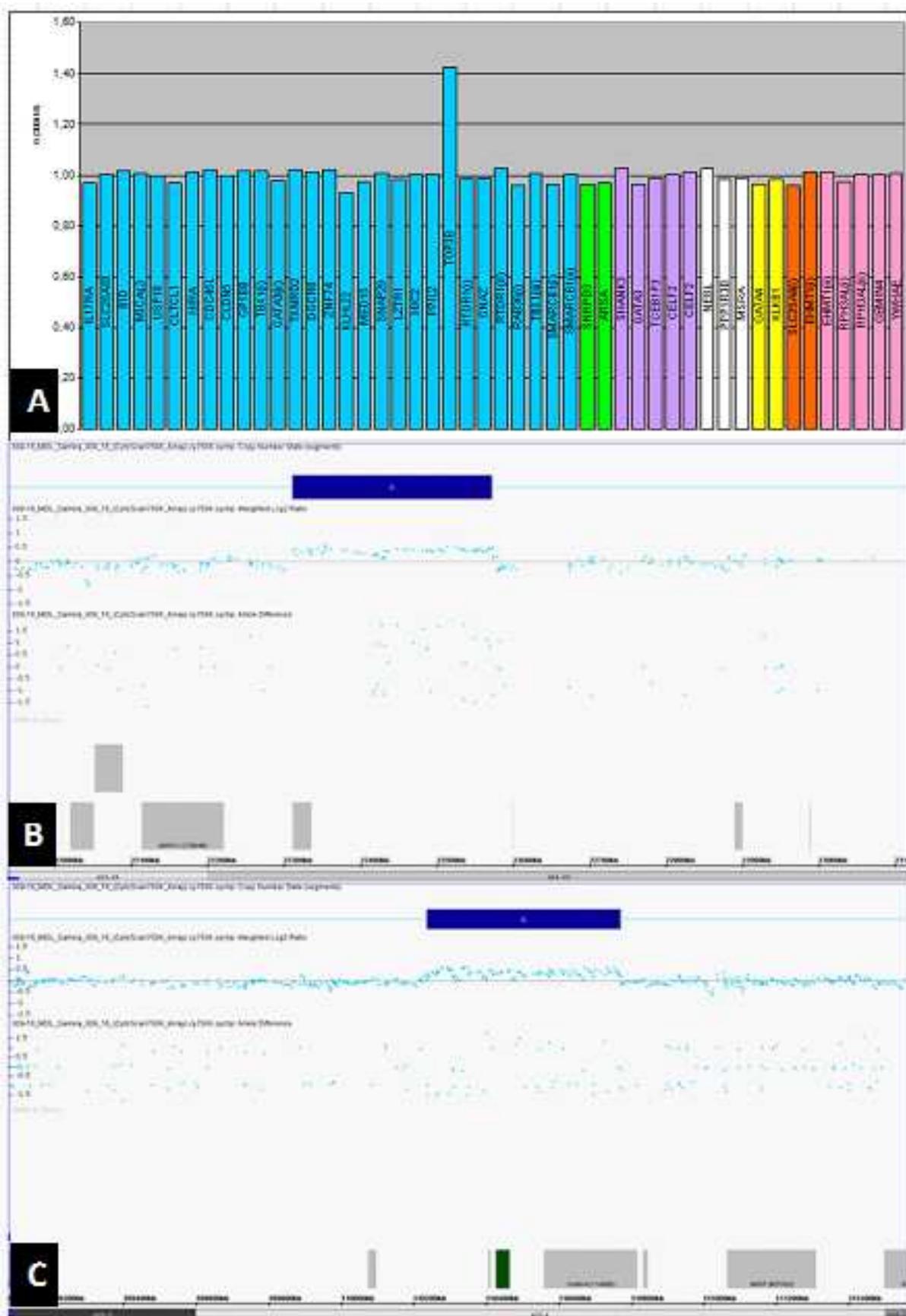


Figura 21. A: resultado e *MLPA* do indivíduo 13 mostrando uma duplicação no *TOP3B*. **B- C:** resultado de ACM; **B:** perfil de hibridação do cromossomo 22 mostrando uma duplicação de 261 kb na região 22q11.22 arr[GRCh37] 22q11.22(22311348_22572480)x3; **C:** perfil de

hibridação do cromossomo 5 mostrando uma duplicação de 536 kb na região 5q22.1 arr[GRCh37]5q22.1(110237190_110772699)^{x3}.

A duplicação em 22q11.2 do indivíduo 13 engloba o gene *TOP3B*. Essa duplicação pode ser encontrada em pacientes fenotipicamente normais (95). Na literatura sua deleção foi observada em paciente com dismorfismos faciais e deficiência intelectual (96). No entanto, na base de dados DGV essa duplicação foi observada em estudos diferentes em mais de dois indivíduos, sendo considerada uma CNV comum e, portanto, classificada como benigna.

A duplicação em 5q22.1 engloba três genes catalogados na base de dados OMIM: *TSLP*, *WDR36* e *CAMK4*. Na análise da ACM não houve sobreposição com os 117 controles da população brasileira. No aDGV não foi observada alteração igual ou menor e no DGV nenhuma duplicação ou deleção apresentou 100% de sobreposição. No DECIPHER todas as duplicações e deleções são muito maiores do que a encontrada neste indivíduo.

Não foi possível realizar a correlação genótipo-fenótipo baseado em estudos da literatura e nas funções dos respectivos genes, pois até o momento não há estudos que associam esses genes a defeitos no desenvolvimento das estruturas craniofaciais, dos arcos faríngeos ou de outros sinais clínicos que o indivíduo 13 possui. Portanto, como essa duplicação é uma variante rara de origem parental desconhecida, foi classificada como VUS.

5.2.2.3 Deleção em 22q11.2 e perda de heterozigose em 17p12

O Indivíduo 25 apresentou deleção das sondas correspondentes ao gene *TBX1* em 22q11.2 e da sonda correspondente ao gene *SHANK3* em 22q13, por MLPA (Figura 22). Porém, nenhuma alteração em 22q11.2 ou 22q13 foi detectada pela técnica de ACM. Entretanto, a cobertura de sondas do chip utilizado não permite a detecção de deleção do gene *TBX1*. Esta técnica, por sua vez, detectou uma perda de heterozigose de 8,0 Mb em 17p12 (Figura 24). Para a confirmação do resultado da deleção do gene *TBX1* foi utilizado o ensaio de MLPA P324-A1 que revelou a deleção de 8 éxons do gene *TBX1* (éxons 1 ao 8) de aproximadamente 9.237 pb (Figura 23).

As principais características clínicas deste indivíduo foram: microtia D grau II; malformação de ossículos, assimetria facial; hipoplasia de hemiface D; hipoplasia da musculatura facial; hipoplasia malar; hipoplasia mandibular; hipoplasia vertebral e hemivértebras.

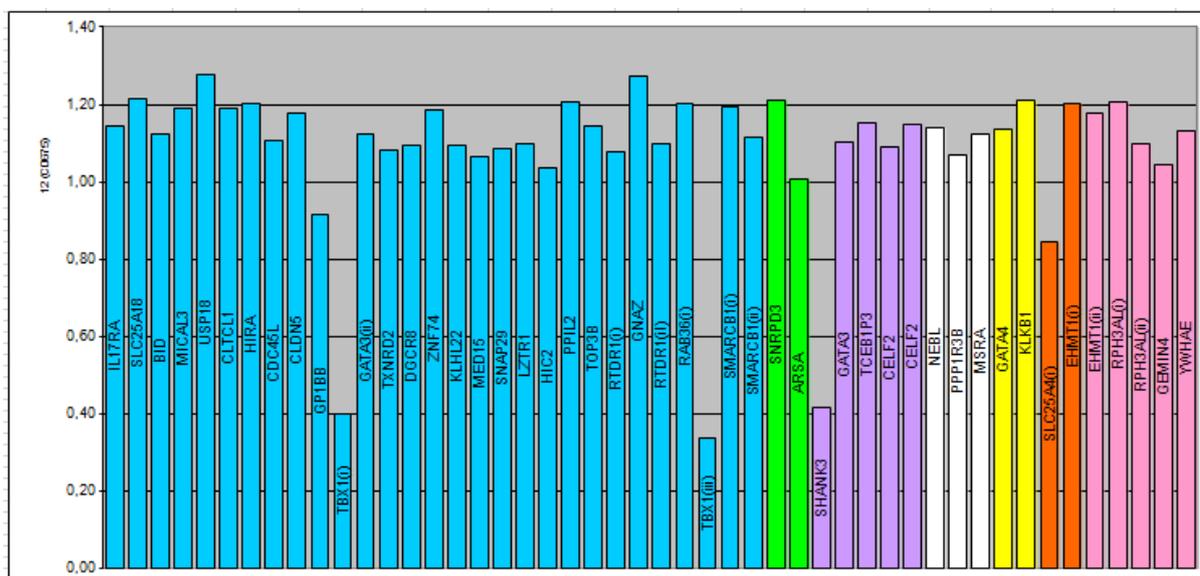


Figura 22. Resultado de *MLPA* do indivíduo 25 mostrando as deleções das sondas dos genes *TBX1* e *SHANK3*.

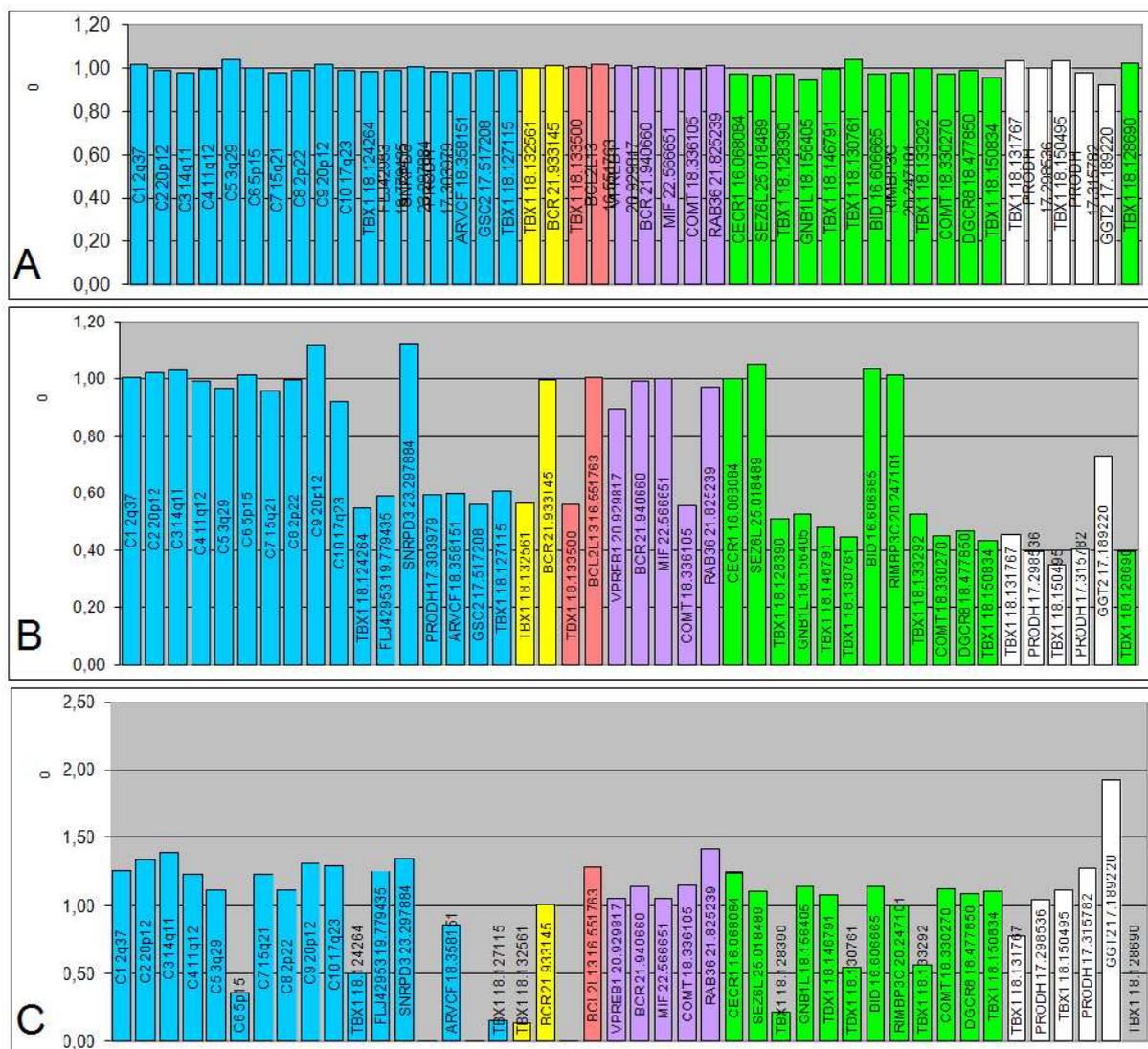


Figura 23. A: controle negativo; **B:** controle positivo de deleção proximal 22q11.2; **C:** deleção de 8 éxons do gene *TBX1* do **indivíduo 25**. Obs: As sondas dos genes *GSC2* e *PRODH* frequentemente aparecem deletadas por estarem localizada dentro ou próxima a uma ilha CpG e pela presença de SNPs, respectivamente.

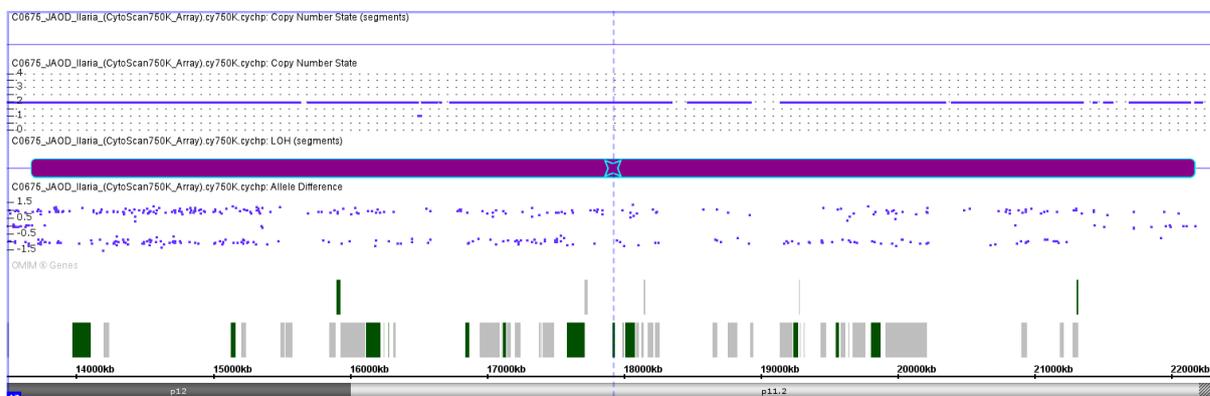


Figura 24. Resultado de ACM do **indivíduo 25**: perfil de hibridação parcial do cromossomo 17 mostrando uma região de perda de heterozigose em 17p12 de 8.000 kb arr[GRCh37]17p12p11.2(13678238_22170994) hnz.

O gene *TBX1* está localizado na região proximal (LCRs A e B) em 22q11.2, sendo deletado em todos os casos que possuem a Síndrome de deleção 22q11.2. Essa síndrome também ocorre pela falha no desenvolvimento dos arcos faríngeos e o gene *TBX1* está associado a grande parte das características clínicas dessa condição (97).

A haploinsuficiência do gene *TBX1* é considerada uma das principais causas dos defeitos cardíacos congênitos da síndrome de deleção 22q11.2. Em um estudo realizado por Xu e colaboradores (2014) (98) foram investigados 199 indivíduos com defeitos conotrunciais (DCT) sem microdeleção 22q11.2 e foi identificada uma mutação *de novo missense* no *TBX1* com perda de função. Os autores consideraram que essa mutação pode ser a causa dos defeitos conotrunciais em indivíduos que não possuem a deleção 22q11.2.

Em outro estudo recente, 136 indivíduos com DCT foram investigados pelo sequenciamento do *TBX1* e uma nova mutação em heterozigose com perda de função foi identificada em um indivíduo com Transposição de Grandes Artérias (TGA) (99).

A haploinsuficiência do *TBX1* em modelo animal demonstrou ser importante para o desenvolvimento das artérias do quarto arco faríngeo e uma mutação em homozigose levou a disrupção do sistema arterial dos arcos faríngeos (100). Além disso, também foi associada a malformações na orelha (101). O indivíduo 25 ainda não possui exames que confirmem a presença ou não de defeitos cardíacos, mas apresenta microtia e malformação de ossículos.

No entanto, na literatura não há descrição de mutações no gene *TBX1* em indivíduos com EOAV. No DECIPHER o paciente 260594 com DI apresenta uma deleção do gene *TBX1*. No DGV também foram observados indivíduos com deleção do gene *TBX1*. Dessa forma, essa alteração foi classificada como VUS.

A região de perda de heterozigose em 17p12 possui 54 genes catalogados na base de dados *OMIM*. Quando frequente no genoma de um indivíduo, a perda de heterozigose pode indicar consanguinidade dos pais. Por outro lado, quando esporádica, os mecanismos de origem mais comuns são os erros na forquilha de replicação do DNA causados pela presença de DS ou de sequências menores que possuem micro-homologia (102).

Quando há perda de heterozigose em uma região genômica, algumas doenças podem se manifestar como consequência de genes recessivos presentes na região, pela maior chance deles se encontrarem em homozigose e/ou regiões que sofrem *imprinting* genômico não serem expressas. Essa região, 17p12, não é uma região genômica que sofre *imprinting* (www.geneimprint.com).

Há algumas condições recessivas causadas por genes localizados dentro dessa região, mas não explicam o fenótipo desse indivíduo. A que mais se aproximou das características clínicas do indivíduo 25 foi o gene *PIGL* responsável pela Síndrome de CHIME, que possui como algumas de suas características orelhas malformadas (103).

5.3 Discussão geral

Os resultados encontrados neste trabalho reforçam a heterogeneidade clínica presente no EOAV, bem como a sua heterogeneidade etiológica e genética. Após caracterização clínica desta casuística, verificou-se que 21/30 indivíduos preencheram os critérios mínimos de EOAV sugeridos na literatura (presença de microtia e/ou apêndices pré-auriculares + microssomia hemifacial) e que 9/30 não preencheram esses critérios, apresentado apenas alguns sinais clínicos que fazem parte do EOAV. Encontraram-se desequilíbrios genômicos em ambos os grupos, porém desequilíbrios patogênicos foram encontrados apenas no grupo de pacientes que não preenchia os critérios mínimos sugeridos. Encontraram-se VUS em ambos os grupos (Figura 25).

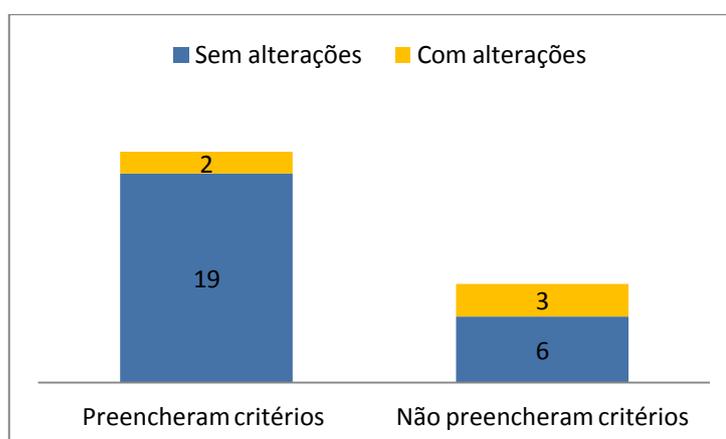


Figura 25. Número de indivíduos que preenchem os critérios clínicos mínimos de EOAV sugeridos na literatura e número de alterações encontradas nos testes de MLPA e ACM.

Três (10%) desequilíbrios genômicos foram encontradas em 22q11.2, dos quais uma foi classificada como patogênica, no indivíduo 1, que não preencheu os critérios clínicos mínimos sugeridos pela literatura.

Das alterações encontradas em outras regiões genômica pela técnica de ACM, um dos dois desequilíbrios genômicos patogênicos encontrados no indivíduo 5, a deleção em 5p15 atribuiu-lhe o diagnóstico da Síndrome de Cri-du-Chat. Ao buscar na literatura resultados semelhantes, observou-se que a maioria dos pacientes não preenchem os critérios clínicos mínimos para o diagnóstico de EOAV, incluindo o indivíduo 5. Dessa forma, supõe-se que os sinais de EOAV, poderiam ser adicionais a Síndrome de Cri-du-Chat e que este pode ser um diagnóstico diferencial de EOAV em indivíduos com sobreposição de sinais clínicos encontrados em ambas as condições.

As VUS presentes no indivíduo 6 e 13 podem mudar de classificação com novos estudos, podendo inclusive ser variações normais que ainda não foram descritas na literatura ou registradas em bases de dados. O indivíduo 6 também não preencheu os critérios clínicos mínimos propostos pela literatura.

Para os casos com alterações clínicas adicionais *major* e que foram investigados por ACM, mas não foram encontrados desequilíbrios genômico ou que não foram classificados como patogênicos, não se descarta a hipótese de que a causa possa ser genética. Na literatura a etiologia da maioria dos casos de EOAV permanece desconhecida, sendo considerada a possibilidade de ser multifatorial. No entanto, como observado nesta casuística, em algumas famílias há consanguinidade ou recorrência familiar, levando a suspeita de que possa haver mutações em genes de herança recessiva. Além disso, mutações no gene *MYT1* também foram descritas, que podem apresentar penetrância incompleta (5).

O gene *MYT1* pode ser uma das causas desses indivíduos que ainda estão sem diagnóstico e foram investigados por ACM. Portanto, outros métodos seriam indicados para o estudo de genes candidatos para o EOAV e diagnóstico diferencial, como o sequenciamento do exoma.

6. Conclusão

Foram detectadas alterações em 22q11.2 por MLPA em três indivíduos, 10% da casuística. Porém, apenas uma foi considerada patogênica (3,3%). Assim, a triagem específica da região 22q11.2 não seria indicada para a investigação de EOAV. Considerando a heterogeneidade etiológica desta condição, a técnica de ACM seria mais vantajosa na detecção de alterações patogênicas.

Foram detectados desequilíbrios genômicos em outras regiões genômicas por ACM em três indivíduos. Porém, alterações consideradas patogênicas foram encontradas em apenas um indivíduo.

Ambos os indivíduos com alterações patogênicas apresentaram sinais clínicos *major* adicionais, reforçando que a indicação para a investigação de desequilíbrios genômicos pela técnica de ACM seria importante para aqueles indivíduos que possuem sinais clínicos *major* associados.

As alterações patogênicas encontradas em 5p e em 22q11.2 reforçam os dados da literatura, que apontam desequilíbrios genômicos nessas regiões como os mais recorrentes em EOAV.

Houve correlação genótipo-fenótipo entre as alterações patogênicas encontradas e as características clínicas desses indivíduos. Não foi possível estabelecer correlação genótipo-fenótipo entre as variantes de significado incerto e os sinais clínicos dos indivíduos com essas alterações.

7. Referências

1. Passos-Bueno MR, Ornelas CC, Fanganiello RD. Syndromes of the first and second pharyngeal arches: A review. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(8):1853-9.
2. Barisic I, Odak L, Loane M, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, et al. Prevalence, prenatal diagnosis and clinical features of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a registry-based study in Europe. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(8):1026-33.
3. Rooryck C, Stef M, Burgelin I, Simon D, Souakri N, Thambo JB, et al. 2.3 Mb terminal deletion in 12p13.33 associated with oculoauriculovertebral spectrum and evaluation of WNT5B as a candidate gene. *Eur J Med Genet*. 2009;52(6):446-9.
4. Beleza-Meireles A, Clayton-Smith J, Saraiva JM, Tassabehji M. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: a review of the literature and genetic update. *J Med Genet*. 2014;51(10):635-45.
5. Lopez E, Berenguer M, Tingaud-Sequeira A, Marlin S, Toutain A, Denoyelle F, et al. Mutations in MYT1, encoding the myelin transcription factor 1, are a rare cause of OAVS. *Journal of Medical Genetics*. 2016;53(11):752-60.
6. Beleza-Meireles A, Hart R, Clayton-Smith J, Oliveira R, Reis CF, Venâncio M, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: clinical and molecular analysis of 51 patients. *Eur J Med Genet*. 2015;58(9):455-65.
7. Colovati ME, Bragagnolo S, Guilherme RS, Dantas AG, Soares MF, Kim CA, et al. Atypical 581-kb 22q11.21 Deletion in a Patient with Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum Phenotype. *Cytogenet Genome Res*. 2016;147(2-3):130-4.
8. Goldenhar M. Associations malformatives de l'oeil et l'oreille, en particulier le syndrome dermoide epibulbaire-appendices auriculaires-fistula auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J Genet Hum*. 1952:243-82.
9. Gorlin RJ, Jue KL, Jacobsen U, Goldschmidt E. Oculoauriculovertebral Dysplasia. *J Pediatr*. 1963;63:991-9.
10. Birgfeld CB, Heike CL, Saltzman BS, Leroux BG, Evans KN, Luquetti DV. Reliable classification of facial phenotypic variation in craniofacial microsomia: a comparison of physical exam and photographs. *Head Face Med*. 2016;12:14.
11. Poswillo D. The aetiology and pathogenesis of craniofacial deformity. *Development*. 1988;103 Suppl:207-12.
12. Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Básica*. 8 ed. Rio de Janeiro 2013.
13. Bogusiak K, Puch A, Arkuszewski P. Goldenhar syndrome: current perspectives. *World J Pediatr*. 2017.

14. Tasse C, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Albrecht B, Horn D, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification. *Eur J Med Genet.* 2005;48(4):397-411.
15. Silva AP, Rosa RF, Trevisan P, Dorneles JC, Mesquita CS, Mattos VF, et al. Clinical and cytogenetic features of a Brazilian sample of patients with phenotype of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a cross-sectional study. *Sao Paulo Med J.* 2015;133(3):191-8.
16. Luquetti DV, Heike CL, Hing AV, Cunningham ML, Cox TC. Microtia: epidemiology and genetics. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(1):124-39.
17. Luquetti DV, Cox TC, Lopez-Camelo J, Dutra MaG, Cunningham ML, Castilla EE. Preferential associated anomalies in 818 cases of microtia in South America. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(5):1051-7.
18. Vendramini S, Richieri-Costa A, Guion-Almeida ML. Oculoauriculovertebral spectrum with radial defects: a new syndrome or an extension of the oculoauriculovertebral spectrum? Report of fourteen Brazilian cases and review of the literature. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(4):411-21.
19. Rosa RF, Dall'agnol L, Zen PR, Pereira VL, Graziadio C, Paskulin GA. [Oculo-auriculo-vertebral spectrum and cardiac malformations]. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(1):62-6.
20. Muñoz-Pedroza LA, Arenas-Sordo ML. Clinical features of 149 patients with facio-auriculo-vertebral spectrum. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2013;64(5):359-62.
21. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell.* 1995;80(3):371-8.
22. Ventura E, Ormitti F, Crisi G, Sesenna E. Goldenhar syndrome associated with contralateral agenesis of the internal carotid artery. *Neuroradiol J.* 2014;27(2):150-3.
23. Werler MM, Sheehan JE, Hayes C, Mitchell AA, Mulliken JB. Vasoactive exposures, vascular events, and hemifacial microsomia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004;70(6):389-95.
24. Werler MM, Sheehan JE, Hayes C, Padwa BL, Mitchell AA, Mulliken JB. Demographic and reproductive factors associated with hemifacial microsomia. *Cleft Palate Craniofac J.* 2004;41(5):494-50.
25. Castilla EE, Lopez-Camelo JS, Campaña H. Altitude as a risk factor for congenital anomalies. *Am J Med Genet.* 1999;86(1):9-14.
26. Wieczorek D, Ludwig M, Boehringer S, Jongbloet PH, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. Reproduction abnormalities and twin pregnancies in parents of sporadic patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum/Goldenhar syndrome. *Hum Genet.* 2007;121(3-4):369-76.

27. Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Dulcet LA, Rodríguez-Santiago B, Garcia-Miñaúr S, Guillen-Navarro E. Autosomal dominant oculoauriculovertebral spectrum and 14q23.1 microduplication. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(8):2030-5.
28. Farra C, Yunis K, Yazbeck N, Majdalani M, Charafeddine L, Wakim R, et al. A Lebanese family with autosomal recessive oculo-auriculo-vertebral (OAV) spectrum and review of the literature: is OAV a genetically heterogeneous disorder? *Appl Clin Genet*. 2011;4:93-7.
29. Tasse C, Majewski F, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Gillissen-Kaesbach G, et al. A family with autosomal dominant oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Clin Dysmorphol*. 2007;16(1):1-7.
30. Vendramini-Pittoli S, Kokitsu-Nakata NM. Oculoauriculovertebral spectrum: report of nine familial cases with evidence of autosomal dominant inheritance and review of the literature. *Clin Dysmorphol*. 2009;18(2):67-77.
31. Josifova DJ, Patton MA, Marks K. Oculoauriculovertebral spectrum phenotype caused by an unbalanced t(5;8)(p15.31;p23.1) rearrangement. *Clin Dysmorphol*. 2004;13(3):151-3.
32. Rooryck C, VuPhi Y, Souakri N, Burgelin I, Saura R, Lacombe D, et al. Characterization of a de novo balanced translocation t(9;18)(p23;q12.2) in a patient with oculoauriculovertebral spectrum. *Eur J Med Genet*. 2010;53(2):104-7.
33. Redin C, Brand H, Collins RL, Kammin T, Mitchell E, Hodge JC, et al. The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. *Nat Genet*. 2017;49(1):36-45.
34. Le Scouarnec S, Gribble SM. Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. *Heredity (Edinb)*. 2012;108(1):75-85.
35. Rooryck C, Souakri N, Cailley D, Bouron J, Goizet C, Delrue MA, et al. Array-CGH analysis of a cohort of 86 patients with oculoauriculovertebral spectrum. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(8):1984-9.
36. Berenguer M, Tingaud-Sequeira A, Colovati M, Melaragno MI, Bragagnolo S, Perez ABA, et al. A novel de novo mutation in MYT1, the unique OAVS gene identified so far. *Eur J Hum Genet*. 2017 ;25(9):1083-1086.
37. Kim JG, Armstrong RC, v Agoston D, Robinsky A, Wiese C, Nagle J, et al. Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J Neurosci Res*. 1997;50(2):272-90.

38. Kroepfl T, Petek E, Schwarzbraun T, Kroisel PM, Plecko B. Mental retardation in a girl with a subtelomeric deletion on chromosome 20q and complete deletion of the myelin transcription factor 1 gene (MYT1). *Clin Genet.* 2008;73(5):492-5.
39. Johnson JM, Moonis G, Green GE, Carmody R, Burbank HN. Syndromes of the first and second branchial arches, part 1: embryology and characteristic defects. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32(1):14-9.
40. Hartsfield JK. Review of the etiologic heterogeneity of the oculo-auriculo-vertebral spectrum (Hemifacial Microsomia). *Orthod Craniofac Res.* 2007;10(3):121-8.
41. Bragagnolo S. Estudo Clínico e Molecular de Pacientes com Espectro Óculo Aurículo Vertebral. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2017.
42. Rieder MJ, Green GE, Park SS, Stamper BD, Gordon CT, Johnson JM, et al. A human homeotic transformation resulting from mutations in *PLCB4* and *GNAI3* causes auriculocondylar syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012;90(5):907-14.
43. Heike CL, Luquetti DV, Hing AV. *Craniofacial Microsomia Overview*; 2009.
44. Callier P, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Marle N, Mosca AL, D'Athis P, et al. Array-CGH in a series of 30 patients with mental retardation, dysmorphic features, and congenital malformations detected an interstitial 1p22.2-p31.1 deletion in a patient with features overlapping the Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(16):2109-15.
45. Abdelmoity AT, Hall JJ, Bittel DC, Yu S. 1.39 Mb inherited interstitial deletion in 12p13.33 associated with developmental delay. *Eur J Med Genet.* 2011;54(2):198-203.
46. Gimelli S, Cuoco C, Ronchetto P, Gimelli G, Tassano E. Interstitial deletion 14q31.1q31.3 transmitted from a mother to her daughter, both with features of hemifacial microsomia. *J Appl Genet.* 2013;54(3):361-5.
47. Brun A, Cailley D, Toutain J, Bouron J, Arveiler B, Lacombe D, et al. 1.5 Mb microdeletion in 15q24 in a patient with mild OAVS phenotype. *Eur J Med Genet.* 2012;55(2):135-9.
48. Buffoni L, Tarateta A, Aicardi G, Vianello MG, Bonioli E. [Pituitary dwarfism and "Goldenhar type= multiple deformities in a patient with deletion of the short arm of chromosome 18]. *Minerva Pediatr.* 1976;28(12-3):716-29.
49. Ala-Mello S, Siggberg L, Knuutila S, von Koskull H, Taskinen M, Peippo M. Further evidence for a relationship between the 5p15 chromosome region and the oculoauriculovertebral anomaly. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(19):2490-4.
50. Dyggve HV, Mikkelsen M. Partial deletion of the short arms of chromosome of the 4-5 group. *Arch Dis Child.* 1965;40:82-5.

51. Ladekarl S. Combination of Goldenhar's syndrome with the Cri-Du-Chat syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1968;46(3):605-10.
52. Neu KW, Friedman JM, Howard-Peebles PN. Hemifacial microsomia in cri du chat (5p-) syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1982;2(4):295-8.
53. Choong YF, Watts P, Little E, Beck L. Goldenhar and cri-du-chat syndromes: a contiguous gene deletion syndrome? *J AAPOS*. 2003;7(3):226-7.
54. Descartes M. Oculoauriculovertebral spectrum with 5p15.33-pter deletion. *Clin Dymorphol*. 2006;15(3):153-4.
55. Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygili A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A*. 2003;116A(2):129-35.
56. Digilio MC, McDonald-McGinn DM, Heike C, Catania C, Dallapiccola B, Marino B, et al. Three patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and microdeletion 22q11.2. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(12):2860-4.
57. Dos Santos PA, de Oliveira SF, Freitas EL, Safatle HP, Rosenberg C, Ferrari I, et al. Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(2):551-3.
58. Jackson EM, Shaikh TH, Gururangan S, Jones MC, Malkin D, Nikkel SM, et al. High-density single nucleotide polymorphism array analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Hum Genet*. 2007;122(2):117-27.
59. Xu J, Fan YS, Siu VM. A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide array CGH: is this a candidate region for the syndrome? *Am J Med Genet A*. 2008;146A(14):1886-9.
60. Lafay-Cousin L, Payne E, Strother D, Chernos J, Chan M, Bernier FP. Goldenhar phenotype in a child with distal 22q11.2 deletion and intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(12):2855-9.
61. Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z, Gordon CT, et al. Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(7):1623-33.
62. Herman GE, Greenberg F, Ledbetter DH. Multiple congenital anomaly/mental retardation (MCA/MR) syndrome with Goldenhar complex due to a terminal del(22q). *Am J Med Genet*. 1988;29(4):909-15.
63. Dabir TA, Morrison PJ. Trisomy 10p with clinical features of facio-auriculo-vertebral spectrum: a case report. *Clin Dymorphol*. 2006;15(1):25-7.

64. Ou Z, Martin DM, Bedoyan JK, Cooper ML, Chinault AC, Stankiewicz P, et al. Branchiootorenal syndrome and oculoauriculovertebral spectrum features associated with duplication of SIX1, SIX6, and OTX2 resulting from a complex chromosomal rearrangement. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(19):2480-9.
65. Hathout EH, Elmendorf E, Bartley J. Hemifacial microsomia and abnormal chromosome 22. *Am J Med Genet*. 1998;76(1):71-3.
66. Quintero-Rivera F, Martinez-Agosto JA. Hemifacial microsomia in cat-eye syndrome: 22q11.1-q11.21 as candidate loci for facial symmetry. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(8):1985-91.
67. Verloes A, Seret N, Bernier V, Gonzales M, Herens C, Koulischer L. Branchial arch anomalies in trisomy 18. *Ann Genet*. 1991;34(1):22-4.
68. Hodes ME, Gleiser S, DeRosa GP, Yune HY, Girod DA, Weaver DD, et al. Trisomy 7 mosaicism and manifestations of Goldenhar syndrome with unilateral radial hypoplasia. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1981;1(1):49-55.
69. de Ravel TJ, Legius E, Brems H, Van Hoestenbergh R, Gillis PH, Fryns JP. Hemifacial microsomia in two patients further supporting chromosomal mosaicism as a causative factor. *Clin Dysmorphol*. 2001;10(4):263-7.
70. Kobrynski L, Chitayat D, Zahed L, McGregor D, Rochon L, Brownstein S, et al. Trisomy 22 and facioauriculovertebral (Goldenhar) sequence. *Am J Med Genet*. 1993;46(1):68-71.
71. Balci S, Engiz O, Yilmaz Z, Baltaci V. Partial trisomy (11;22) syndrome with manifestations of Goldenhar sequence due to maternal balanced t(11;22). *Genet Couns*. 2006;17(3):281-9.
72. Poonawalla HH, Kaye CI, Rosenthal IM, Pruzansky S. Hemifacial microsomia in a patient with Klinefelter syndrome. *Cleft Palate J*. 1980;17(3):194-6.
73. Garavelli L, Viridis R, Donadio A, Sigorini M, Banchini G, Balestrazzi P, et al. Oculo-auriculo-vertebral spectrum in Klinefelter syndrome. *Genet Couns*. 1999;10(3):321-4.
74. Rao VA, Kaliaperumal S, Subramanyan T, Rao KR, Bhargavan R. Goldenhar's sequence with associated juvenile glaucoma in Turner's syndrome. *Indian J Ophthalmol*. 2005;53(4):267-8.
75. Stanojević M, Stipoljev F, Koprčina B, Kurjak A. Oculo-auriculo-vertebral (Goldenhar) spectrum associated with pericentric inversion 9: coincidental findings or etiologic factor? *J Craniofac Genet Dev Biol*. 2000;20(3):150-4.
76. Northup JK, Matalon D, Hawkins JC, Matalon R, Velagaleti GV. Pericentric inversion, inv(14)(p11.2q22.3), in a 9-month old with features of Goldenhar syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2010;19(4):185-9.

77. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, et al. 3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1963;257:3098-102.
78. Nguyen JM, Qualmann KJ, Okashah R, Reilly A, Alexeyev MF, Campbell DJ. 5p deletions: Current knowledge and future directions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2015;169(3):224-38.
79. Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):489-501.
80. Gersen S, Keagle B. *The Principles of clinical cytogenetics.* 3^a ed. New York. 2013.
81. Burnside RD. 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features. *Cytogenet Genome Res.* 2015;146(2):89-99.
82. Moorhead P, Nowell P, Mellman W, al e. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:613-6.
83. Sanchez O, Escobar J, Yunis J. A simple G-banding technique. *Lancet.* 1973; 4;2(7823):269.
84. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16(3):172-83.
85. Gorlin, RJ, Cmm. H. *Syndromes of the head and neck.* New York: Oxford University Press. 2001.
86. Bragagnolo S, Colovati MES, Souza MZ, Dantas AG, F de Soares MF, Melaragno MI, et al. Clinical and cytogenomic findings in OAV spectrum. *Am J Med Genet A.* 2018;176(3):638-48.
87. Torti EE, Braddock SR, Bernreuter K, Batanian JR. Oculo-auriculo-vertebral spectrum, cat eye, and distal 22q11 microdeletion syndromes: a unique double rearrangement. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(8):1992-8.
88. Aerts S, Lambrechts D, Maity S, Van Loo P, Coessens B, De Smet F, et al. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol.* 2006;24(5):537-44.
89. Newbern J, Zhong J, Wickramasinghe RS, Li X, Wu Y, Samuels I, et al. Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(44):17115-20.

90. Dykes IM, van Bueren KL, Ashmore RJ, Floss T, Wurst W, Szumska D, et al. HIC2 is a novel dosage-dependent regulator of cardiac development located within the distal 22q11 deletion syndrome region. *Circ Res*. 2014;115(1):23-31.
91. Moscovich M, LeDoux MS, Xiao J, Rampon GL, Vemula SR, Rodriguez RL, et al. Dystonia, facial dysmorphism, intellectual disability and breast cancer associated with a chromosome 13q34 duplication and overexpression of TFDP1: case report. *BMC Med Genet*. 2013;14:70.
92. Di Bella MA, Calì F, Seidita G, Mirisola M, Ragusa A, Ragalmuto A, et al. Screening of subtelomeric rearrangements in autistic disorder: identification of a partial trisomy of 13q34 in a patient bearing a 13q;21p translocation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141B(6):584-90.
93. Guilherme RS, Meloni VA, Perez AB, Pilla AL, de Ramos MA, Dantas AG, et al. Duplication 9p and their implication to phenotype. *BMC Med Genet*. 2014;15:142.
94. Bonaglia MC, Giorda R, Carrozzo R, Roncoroni ME, Grasso R, Borgatti R, et al. 20-Mb duplication of chromosome 9p in a girl with minimal physical findings and normal IQ: narrowing of the 9p duplication critical region to 6 Mb. *Am J Med Genet*. 2002;112(2):154-9.
95. Pires R, Pires LM, Vaz SO, Maciel P, Anjos R, Moniz R, et al. Screening of copy number variants in the 22q11.2 region of congenital heart disease patients from the São Miguel Island, Azores, revealed the second patient with a triplication. *BMC Genet*. 2014;15:115.
96. Kaufman CS, Genovese A, Butler MG. Deletion of TOP3B Is Associated with Cognitive Impairment and Facial Dysmorphism. *Cytogenet Genome Res*. 2016; 150(2):106-111.
97. Papangelis I, Scambler P. The 22q11 deletion: DiGeorge and velocardiofacial syndromes and the role of TBX1. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2(3):393-403.
98. Xu YJ, Chen S, Zhang J, Fang SH, Guo QQ, Wang J, et al. Novel TBX1 loss-of-function mutation causes isolated conotruncal heart defects in Chinese patients without 22q11.2 deletion. *BMC Med Genet*. 2014;15:78.
99. Zhang M, Li FX, Liu XY, Hou JY, Ni SH, Wang J, et al. TBX1 loss-of-function mutation contributes to congenital conotruncal defects. *Exp Ther Med*. 2018;15(1):447-53.
100. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*. 2001;410(6824):97-101.
101. Funke B, Epstein JA, Kochilas LK, Lu MM, Pandita RK, Liao J, et al. Mice overexpressing genes from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial

syndrome/DiGeorge syndrome have middle and inner ear defects. *Hum Mol Genet.* 2001;10(22):2549-56.

102. Wechselblatt B, Rudd MK. Human Structural Variation: Mechanisms of Chromosome Rearrangements. *Trends Genet.* 2015;31(10):587-99.

103. Ng BG, Hackmann K, Jones MA, Eroshkin AM, He P, Williams R, et al. Mutations in the glycosylphosphatidylinositol gene PIGL cause CHIME syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):685-8.

8. Anexos

8.1 Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desequilíbrios genômicos no Espectro óculo-aurículo-vertebral

Pesquisador: Samira Spinesi Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 56915816.6.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.649.207

Apresentação do Projeto:

O Espectro óculo-aurículo-vertebral ou Microsomia Hemifacial apresenta grande variedade fenotípica e etiológica, o que dificulta o seu diagnóstico clínico. As estruturas acometidas são aquelas derivadas dos primeiros arcos faríngeos, principalmente, orelhas, ouvidos, olhos, boca, mandíbula e vértebras. O paciente pode ser afetado uni ou bilateralmente e pode apresentar anomalias de órgãos e sistemas, sendo a principal causa de óbito de EOAV as anomalias cardíacas. Muitos estudos têm investigado desequilíbrios genômicos em pacientes com esta condição. Desequilíbrios genômicos em 22q11.2 têm sido encontrado em pacientes diagnosticados com EOAV. Serão incluídos neste estudo cerca de 100 pacientes com hipótese diagnóstica de EOAV, encaminhados pelos respectivos médicos. Após a avaliação clínica, serão colhidos de 8 a 16 ml de sangue dos pacientes, em tubos contendo EDTA e heparina sódica, e esses serão encaminhados ao Departamento de Genética Médica da FCM/Unicamp.

As amostras serão encaminhadas de 10 serviços de genética diferentes, incluindo o da Unicamp e nove outros centros colaboradores do Projeto Crânio-Face Brasil:

1. Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Campinas-P);

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.649.207

2. Centro de Atendimento Integral ao Fissurado labiopalatal - CAIF (Curitiba-PR);
3. Centro de Atenção aos Defeitos da Face - CADEFI (Recife-PE);
4. Centrinho –Joinville (SC);
5. Serviço de Genética do Hospital Geral César Cals (Fortaleza-CE);
6. Centro Estadual de Tratamento de Anomalias Craniofaciais do Rio de Janeiro (RJ);
7. Grupo de Tratamento de Fendas Labiopalatais da Univ Federal de Natal (Natal-RN).
8. Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre-RS);
9. Serviço de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (SP);
10. Serviço de Genética da Universidade Federal de Alagoas (Maceió – AL).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar desequilíbrios genômicos no Espetro óculo-aurículo-vertebral

Objetivo Secundário: Investigar desequilíbrios genômicos na região 22q11.2 em pacientes com diagnóstico clínico de EOAV, pela técnica de MLPA; investigar desequilíbrios genômicos em outras regiões, nos casos sem deleção em 22q11.2, pela técnica de array-GH; realizar correlação genótipo-fenótipo comparando as características clínicas observadas nos pacientes com os desequilíbrios genômicos encontrados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O único risco previsível até o momento é aquele relacionado à coleta de sangue periférico. Esta será realizada por profissional treinado e com material adequado. O risco será apenas de dor leve durante o procedimento e possibilidade de formação de manchas rochas na região da coleta.

Benefícios: Não há benefícios diretos aos participantes. Porém nos casos em que forem encontrada alterações através dos exames realizados, a família poderá receber o aconselhamento genético, se assim desejarem. O único benefício para o participante e sua família é a realização de testes genéticos (com a finalidade de diagnóstico) que ainda não estão disponíveis na rede pública de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

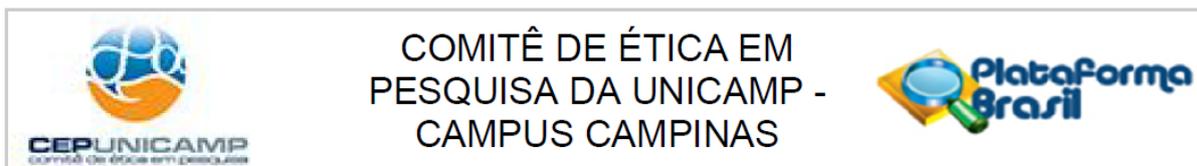
Projeto de mestrado em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.

Critério de Inclusão: Pessoas com diagnóstico clínico de Espectro óculo-aurículo-vertebral, de qualquer sexo e idade.

Critérios de exclusão: não informados.

Período de coleta de dados: 01/08/2016 a 01/02/2018.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.649.207

Biorrepositório: REGULAMENTO DO BIORREPOSITÓRIO DE INDIVÍDUOS E FAMÍLIAS REGISTRADOS NO BANCO DE DADOS DE FENDAS OROFACIAIS DO BRASIL (já aprovado anteriormente para o referido projeto).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados na presente versão:

- Formulário de informações básicas so projeto.
- carta de resposta a pendências emitidas em parecer anterior.
- Termo de assentimento, destinado a menores e tre 13 e 18 anos de idade.
- projeto atualizado

Recomendações:

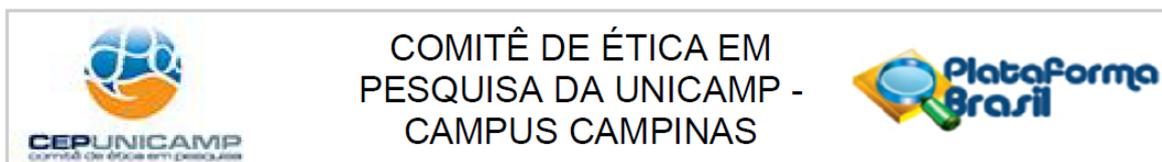
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto em acordo com os preceitos da Res. CNS 466-2012.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.649.207

adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_731831.pdf	22/07/2016 11:38:23		Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	22/07/2016 11:34:04	Samira Spinesi Silva	Aceito
Outros	Termo_de_Assentimento.pdf	22/07/2016 11:33:22	Samira Spinesi Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	22/07/2016 11:28:48	Samira Spinesi Silva	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	09/06/2016 17:45:11	Samira Spinesi Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	09/06/2016 17:36:54	Samira Spinesi Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/06/2016 17:32:14	Samira Spinesi Silva	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 1.649.207

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	08/06/2016 10:49:05	Samira Spinesi Silva	Aceito
----------------	--------------------	------------------------	----------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 26 de Julho de 2016

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

8.2 Anexo 2. Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Desequilíbrios genômicos no Espectro óculo-aurículo-vertebral

Nome do responsável: Samira Spineli Silva

Número do CAAE: (56915816.6.0000.5404)

Você, ou a pessoa pela qual é responsável, está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

As causas do Espectro óculo-aurículo-vertebral (EOAV) ou Síndrome de Goldenhar ainda não estão bem esclarecidas e há poucos estudos sobre sua causa. Compreender as causas de uma doença genética é importante para poder realizar o aconselhamento genético. Portanto, o objetivo geral deste estudo é investigar as causas de EOAV pela realização de exames que permitem a identificação de desequilíbrios genômicos (ganho ou perdas de pedaços do DNA).

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a: permitir a coleta de sangue periférico (venoso), para cultura de linfócitos e extração do DNA, para a realização dos seguintes exames genéticos: MLPA (Multiplex-ligating probe amplification); *array*-GH (Hibridação genômica em arrays); e FISH (Hibridação in situ com fluorescência) para a confirmação dos resultados.

Desconfortos e riscos:

A coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com material adequado (estéril e descartável). O único risco previsível até o momento é aquele relacionado à coleta de sangue periférico. O risco será apenas de dor leve durante o procedimento e possibilidade de formação de manchas rochas na região da coleta.

Benefícios:

O único benefício para o participante e sua família é a realização de testes genéticos (com a finalidade de diagnóstico) que ainda não estão disponíveis na rede pública de saúde.

Acompanhamento e assistência:

O acompanhamento do participante será realizado pelo geneticista clínico, em consultas regulares junto ao serviço de genética. Os resultados dos exames serão informados por este mesmo profissional.

Sigilo e privacidade:

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento e Indenização:

Esta pesquisa não prevê ressarcimento de despesas, pois todos os procedimentos serão realizados em consultas de rotina junto ao serviço onde é atendido. O participante terá direito à indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

Aconselhamento genético:

Os resultados serão transmitidos à família por um médico geneticista clínico experiente em consulta agendada no serviço de saúde que a família é acompanhada.

O aconselhamento genético poderá ser realizado, se for o desejo da família, por esse mesmo profissional.

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:

Todas as amostras de sangue coletadas serão processadas e armazenadas nos Laboratórios de Genética Molecular e Citogenética e Citogenômica da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP durante o tempo que a investigação diagnóstica durar.

Você poderá, também, autorizar a armazenagem do material em definitivo para futuras pesquisas sobre o assunto. No entanto, antes de se realizar qualquer estudo futuro, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para tal.

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() Autorizo a tomada de fotografias minha ou da pessoa sob minha guarda, para publicação em revista científica, se houver contribuição relevante após a conclusão da investigação.

() Concordo que as informações clínicas e resultados de exames (SEM NENHUMA IDENTIFICAÇÃO PESSOAL) possam ser consultadas na Base de Dados do Projeto Crânio-Face Brasil, por outros profissionais da área da saúde para comparação com bases mundiais visando melhorias em protocolos de investigação diagnóstica.

Você, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento da guarda e utilização do seu material biológico armazenado. O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: (detalhar).

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores **Samira Spinelí Silva, Prof. Társis Antonio Paiva Vieira ou Profa. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes. Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, andar térreo FCM 01, no Departamento de Genética Médica, CEP 13083-887 Campinas – SP. Telefones: (19) 3521-8906 ou (19) 3521-8909. E-mail: samiraspinel@gmail.com**

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____

e-mail (opcional): _____

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

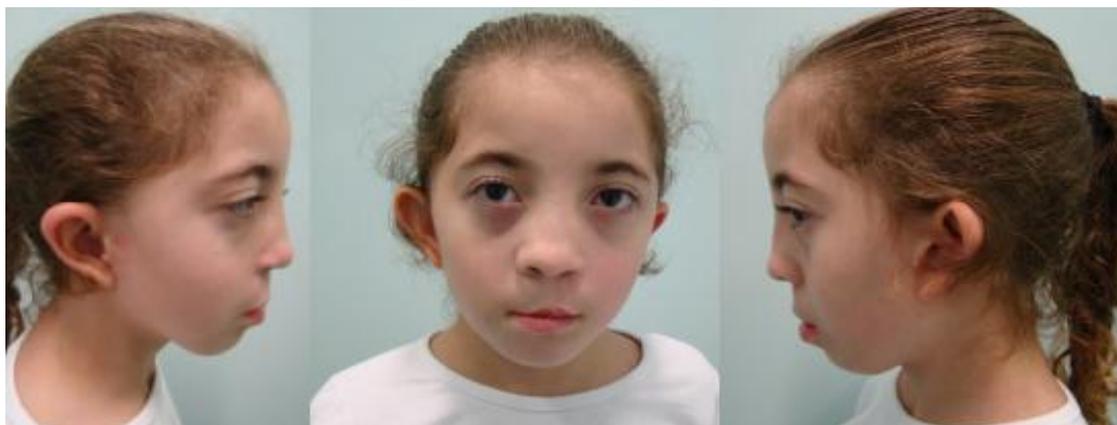
Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)

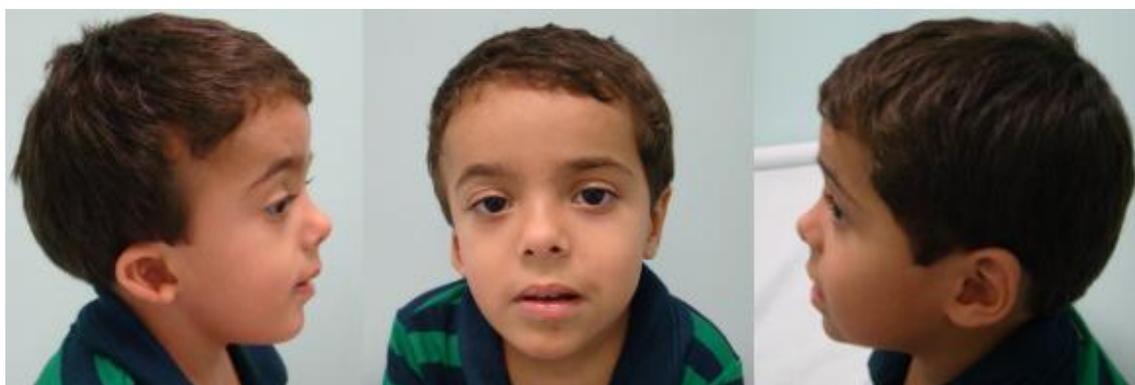
Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

8.3 Anexo 3. Fotos dos indivíduos da casuística



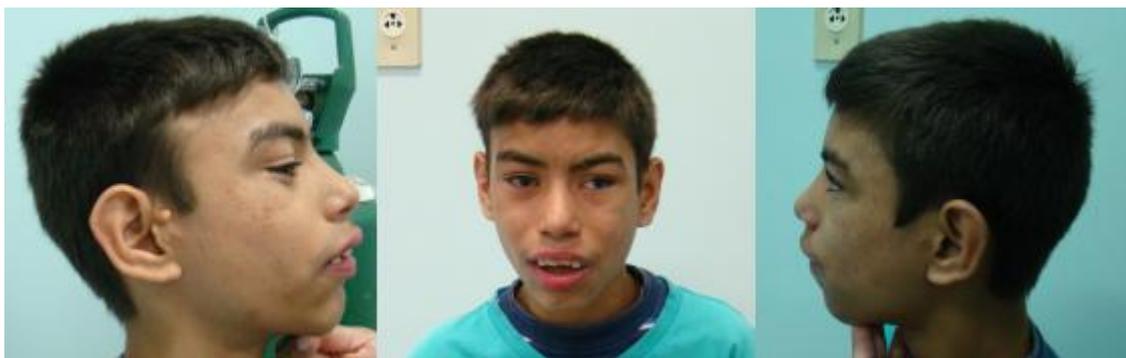
Indivíduo 1



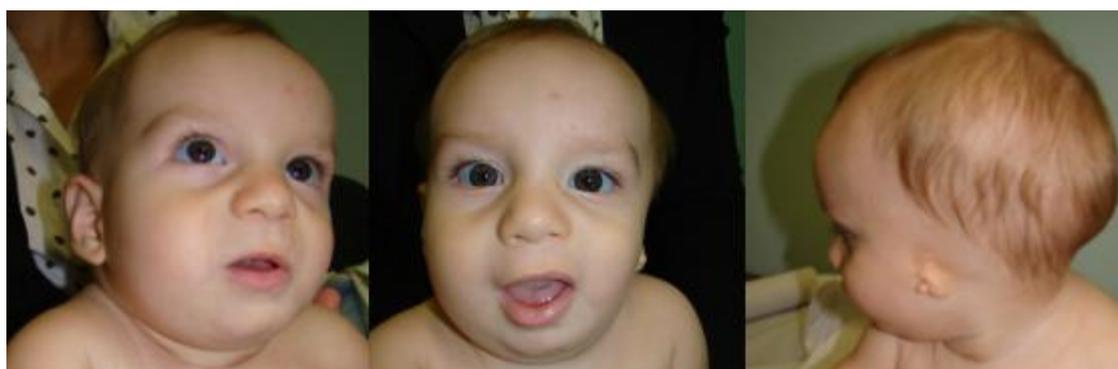
Indivíduo 3



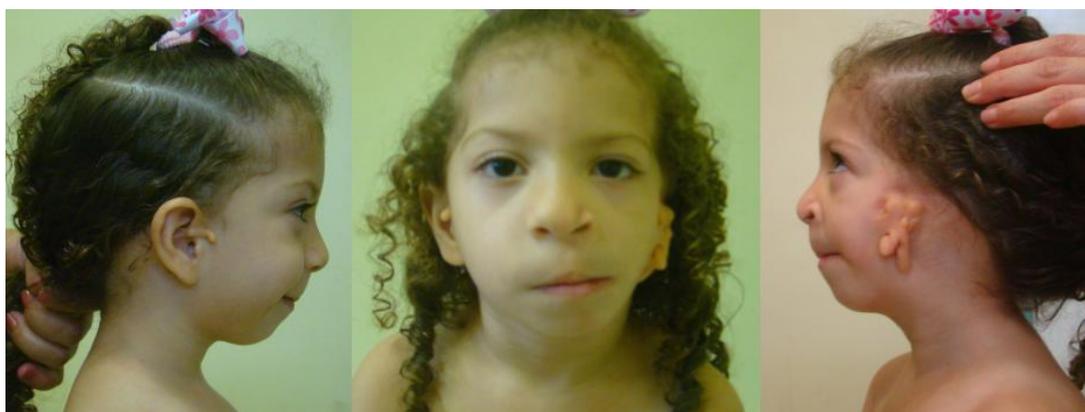
Indivíduo 4



Indivíduo 5



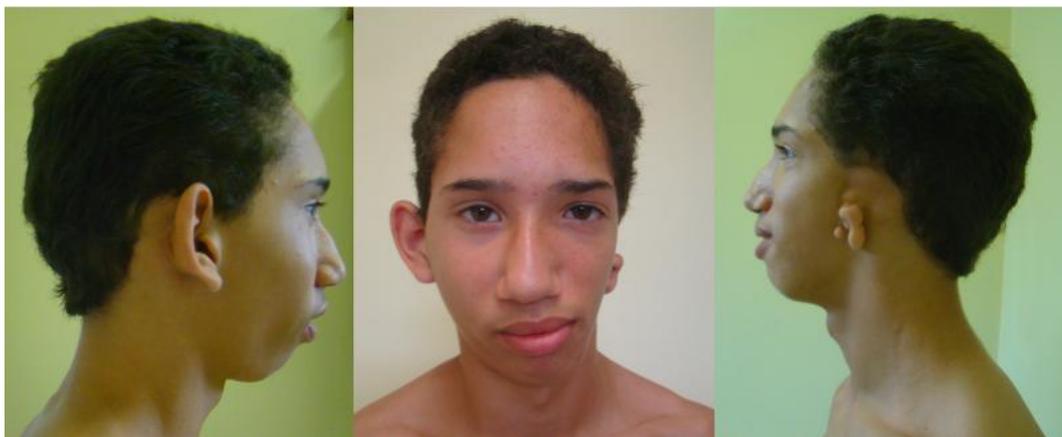
Indivíduo 7



Indivíduo 8



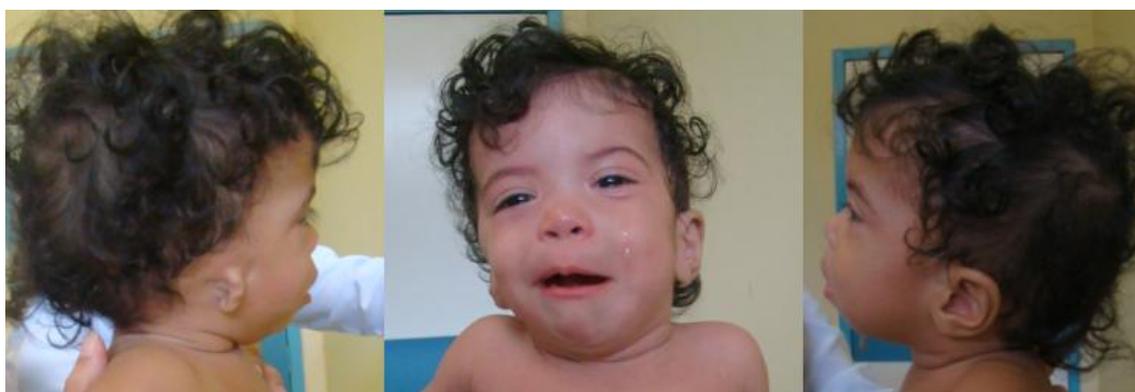
Indivíduo 9



Indivíduo 10



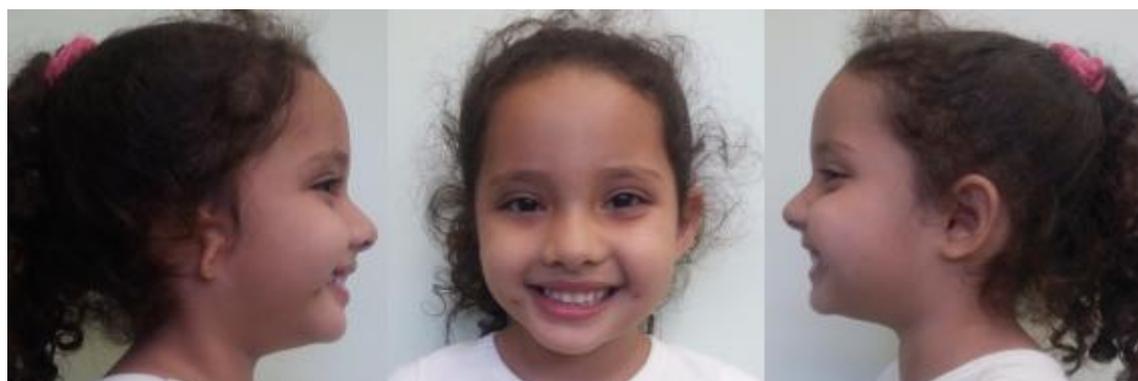
Indivíduo 11



Indivíduo 12



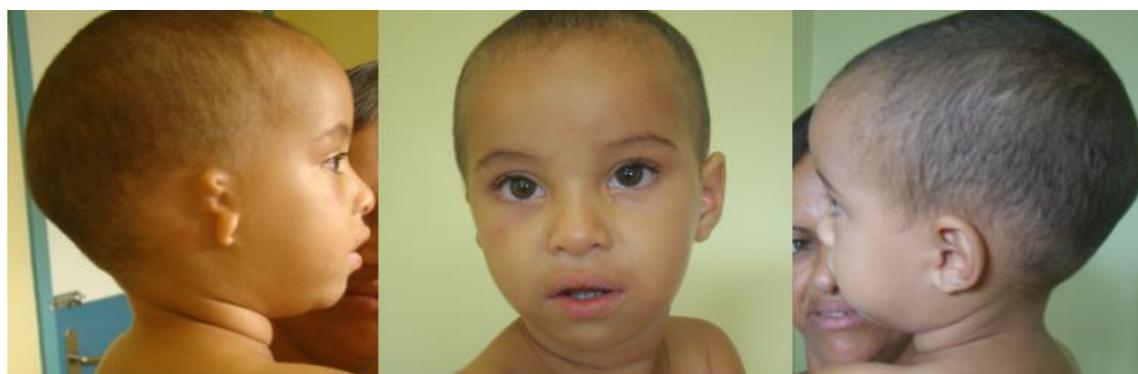
Indivíduo 14



Indivíduo 15



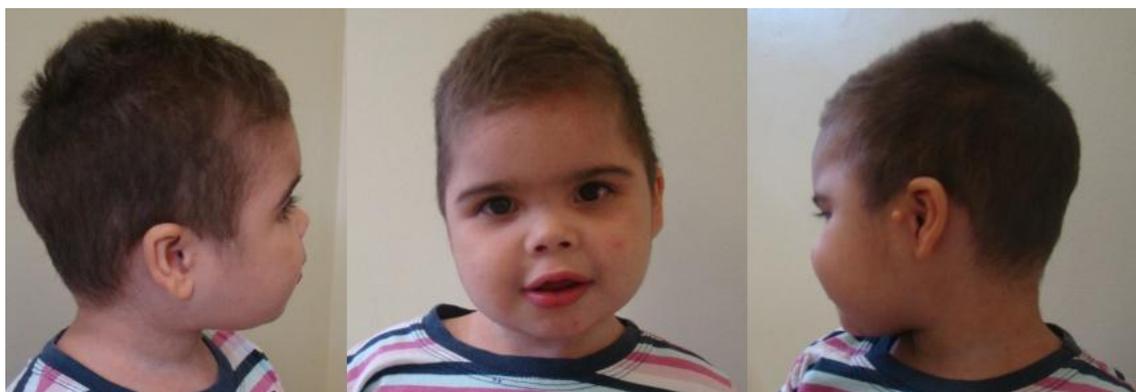
Indivíduo 16



Indivíduo 17



Indivíduo 18



Indivíduo 19



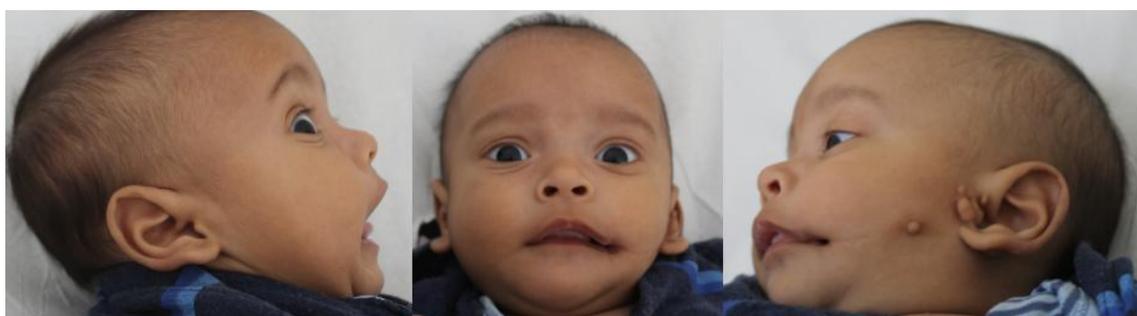
Indivíduo 21



Indivíduo 22



Indivíduo 27



Indivíduo 28



Indivíduo 30

8.4 Anexo 4. Artigo – Relato de Caso

European Journal of Medical Genetics 61 (2018) 262–268



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmg

Distal deletion at 22q11.2 as differential diagnosis in Craniofacial Microsomia: Case report and literature review



Samira Spineli-Silva, Luciana M. Bispo, Vera L. Gil-da-Silva-Lopes, Társis P. Vieira*

Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Distal 22q11.2 deletion
Craniofacial Microsomia
Oculo-auriculo-vertebral Spectrum
Goldenhar Syndrome

ABSTRACT

Craniofacial Microsomia (CFM) also known as Oculo-auriculo-vertebral Spectrum (OAVS) or Goldenhar Syndrome, presents wide phenotypic and etiological heterogeneity. It affects mainly the structures originated from the first and second pharyngeal arches. In addition, other *major* anomalies may also be found, including congenital heart diseases. In this study, we report a patient with distal deletion in the 22q11.2 region and a phenotype which resembles CFM. The proband is a girl, who presented bilateral preauricular tags, left auditory canal stenosis, malar hypoplasia, cleft lip and palate, mild asymmetry of soft tissue in face, congenital heart disease, intestinal atresia, annular pancreas and hydronephrosis. The genomic imbalances investigation by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Chromosomal Microarray Analysis (CMA) revealed a distal deletion of 1,048 kb at 22q11.2 encompassing the region from Low Copy Repeats (LCRs) D to E. We did review of the literature and genotype-phenotype correlation. This is the sixth case of distal 22q11.2 deletion resembling CFM and the second encompassing the region between LCRs D to E. All cases share some phenotypic signs, such as preauricular tags, facial asymmetry, cleft lip and palate, and congenital heart diseases. Candidate genes in this region have been studied by having an important role in pharyngeal arches developmental and in congenital heart diseases, such as *HIC2*, *YPEL1* and *MAPK1/ERK2*. This case corroborates the phenotypic similarity between 22q11.2 distal deletion and CFM/OAVS. It also contributes to genotype-phenotype correlation and reinforces that candidate genes for CFM, in the 22q11.2 region, might be located between LCRs D and E.

1. Introduction

Craniofacial Microsomia (CFM) also known as Oculo-auriculo-vertebral Spectrum (OAVS, OMIM 164210) Goldenhar Syndrome and Hemifacial Microsomia (HFM) is a congenital condition that occurs due to a morphogenesis defect of the first and second pharyngeal arches. The prevalence in the population is approximately 1:26.000 (Barisic et al., 2014) and the main structures affected are ears, eyes, mandibles and cervical spine (Ashokan et al., 2014). Other congenital defects may occur, such as congenital heart diseases, which represent the main cause of CFM deaths (Rosa et al., 2010).

The wide phenotypic and etiologic heterogeneity hampers the clinical diagnosis. The main craniofacial features observed are: microtia/otia, preauricular tags and pits, epibulbar dermoids, facial asymmetry, malar hypoplasia, mandibular hypoplasia and orofacial clefts (Silva et al., 2015).

Genetic causes of CFM are not well elucidated yet. Some recent studies have been investigated genomic imbalances in patients with this condition and deletions or duplications in the 22q11.2 region represent

the most frequent alterations found (Beleza-Meireles et al., 2015). The chromosome 22 have eight LCRs (Low Copy Repeats), sequences with high homology that are substrates to non-allelic homology recombination (NAHR) and to originate recurrent CNVs (copy number variations). In this region, CNVs are classified as proximal, central and distal (Burnside, 2015). The proximal deletion, also known as typical deletion, is associated to the 22q11.2 Deletion Syndrome, and is flanked by LCRs A and D (~3 Mb) or from A and B (~1,5 Mb). There are five OAVS/CFM cases with distal (atypical) deletions 22q11.2 encompassing LCRs D to G described in the literature (Jackson et al., 2007; Xu et al., 2008; Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011; Torti et al., 2013). We report a patient with distal deletion in the 22q11.2 region between LCRs D and E and a phenotype suggesting CFM.

2. Clinical report

This study was approved by the Ethics Committee Board of the University of Campinas (Number 35316314.9.1001.5404). Written informed consents and permission to use the images were obtained from

* Corresponding author. Department of Medical Genetics, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo Street, 126, CEP 13083-887 Campinas, SP, Brazil.
E-mail address: tvieira@fcm.unicamp.br (T.P. Vieira).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.12.013>

Received 16 August 2017; Received in revised form 17 December 2017; Accepted 23 December 2017

Available online 27 December 2017

1769-7212/ © 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

her parents.

The proband is a girl, first child of healthy, young and non-conanguineous parents, with no significant family history. She was referred to genetics evaluation due to cleft lip and palate, intestinal atresia, annular pancreas, hydronephrosis and congenital heart disease (CHD). Her mother presented pre-eclampsia during the pregnancy and she was medicated with Methyl dopa and Hydralazine. There were no known exposures to illness infections, tobacco, alcohol or drugs during pregnancy. Antenatal ultrasound, approximately on the 5th month of gestation, revealed a cleft lip and palate, jejunal stenosis and bilateral hydronephrosis. Due to pre-eclampsia, she was delivered at preterm (35 weeks and 5 days) by uncomplicated cesarean section. At birth, her weight was 1765 g (- 2.1 SD), length 42 cm (- 2.3 SD), head circumference 31 cm (- 0.84 SD). Early in the neonatal period, the patient underwent duodenal anastomosis and parenteral nutrition was required for 11 days. In this period, an abdominal ultrasonography showed moderate pyloric dilatation with bilateral renal echogenicity increase. A cardiac evaluation, including echocardiography, revealed atrial septal defect (ASD) and ventricular septal defect (VSD) and a neonatal hearing screening showed no response for the right ear. However there was no follow-up about hearing impairment.

Clinical examination at two months of age revealed flat occiput, low-set and dysmorphic ears, bilateral preauricular tags, stenosis of left auditory canal, malar hypoplasia, epicanthus, mild asymmetry of soft tissue in face, right nasal cleft, bilateral cleft lip, complete cleft palate, clinodactyly of the 5th finger. Her psychomotor development was otherwise normal at time. However, developmental delay became progressively evident. The ASD resolved spontaneously. She did not present ocular and vertebral malformations.

At the last clinical evaluation, at 11 years old, her height was 129.0 cm (-2.01 SD), weight 24.4 kg (-2.25 SD) and head circumference 50 cm (-2.1 SD). Physical examination revealed the same dysmorphic features, with surgically corrected cleft lip and palate and removed preauricular tags. In addition, she showed high frontal hairline and depressed nasal bridge (Fig. 1). She also presented speech and developmental delay. VSD resolved spontaneously. Echocardiography, vertebral column X-ray and ophthalmologic assessments were normal. At 11 years old there was no complaint of hearing loss, however no specific hearing evaluation was conducted.

The G banding karyotype with a total of 50 analyzed cells with a resolution of 500 bands was normal. The multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis, with the P250-B2 kit (MRC-Holland[®], Amsterdam, The Netherlands) was performed on genomic DNA from peripheral blood. A deletion in the 22q11.2 distal region was detected, involving the LCRs D to E encompassing HCl2, PPIL2 and TOP3B probes, being classified as a type I distal deletion (Fig. 2).

The Chromosomal Microarray Analysis (CMA) was performed with the CytoScan 750K Array chip (Affymetrix[®], Santa Clara, CA, USA), on genomic DNA from peripheral blood, with Reagent Kit Bundle (Affymetrix[®], Santa Clara, CA, USA). The data were analyzed with the

Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software (Affymetrix[®], Santa Clara, CA, USA) which disclosed a deletion of 1048 kb in the 22q11.2 region: 46,XX,arr[GRCh37] 22q11.21q11.22(21464763.22962962) × 1 (Fig. 2). No other genomic imbalances were found. Parents have normal phenotype and they are not interested in parental investigation and genetic counselling. Therefore we were not able to conclude if the deletion is de novo or inherited.

3. Discussion

The causes of CFM/OAVS are still largely unknown, both genetic and environmental factors have been suggested. Most cases are sporadic with no relevant family history. However, a genetic predisposition has been proposed based on growing evidence from the literature. There are evidences for Mendelian inheritance due to several familial cases described following recessive or dominant patterns (Beleza-Meireles et al., 2014). Recently, the first gene implicated in CFM/OAVS was described, the *MYT1*, in which heterozygous mutations were found to be causative of the OAVS phenotype. However, the frequency of mutations found in this gene was too low, only three out of 226 OAVS patients screened (Berenguer et al., 2017).

Additional evidence for a genetic basis for CFM/OAVS comes from the identification of chromosomal anomalies in patients with this phenotype (Beleza-Meireles et al., 2014). Several chromosomal anomalies and small genomic imbalances detected by CMA have been reported in patients with CFM/OAVS (Rooryck et al., 2010; Beleza-Meireles et al., 2015; Silva et al., 2015). Some of the genomic imbalances found are recurrent, among them, those in the 22q11.2 region are the most frequent (Derbent et al., 2003; Jackson et al., 2007; Xu et al., 2008; Digilio et al., 2009; Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011; Torti et al., 2013; Dos Santos et al., 2014; Beleza-Meireles et al., 2015; Colovati et al., 2015).

Deletions and duplications in the 22q11.2 region are classified as proximal, central and distal type I, II and III (Burnside, 2015). To date only 11 cases with CFM/OAVS phenotype and 22q11.2 deletions have been described so far, including five cases with the distal type (Jackson et al., 2007; Xu et al., 2008; Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011; Torti et al., 2013). The patient reported in this study is the sixth case with distal 22q11.2 deletion and a phenotype resembling CFM/OAVS and the second encompassing the region from LCRs D to E (type I) (Fig. 3).

The main clinical features of the 11 cases previously reported are described in Table 1. All cases share some phenotypic signs, however there is clinical heterogeneity. Among these 11 cases, preauricular tags is more commonly observed in patients with distal deletions than those with proximal deletions, most cases are affected bilaterally, including the present patient (Xu et al., 2008; Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011; Torti et al., 2013). Malar hypoplasia was observed in central and distal type deletions (Torti et al., 2013; Colovati et al., 2015). Epibulbar dermoid (Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011) and macrostomia



Fig. 1. Facial features of the patient after preauricular tags and cleft lip and palate repair showing A: low-set and dysmorphic ears and malar hypoplasia; B: high frontal hairline, depressed nasal bridge and epicanthus. C: low-set ears, preauricular tag scar and malar hypoplasia.

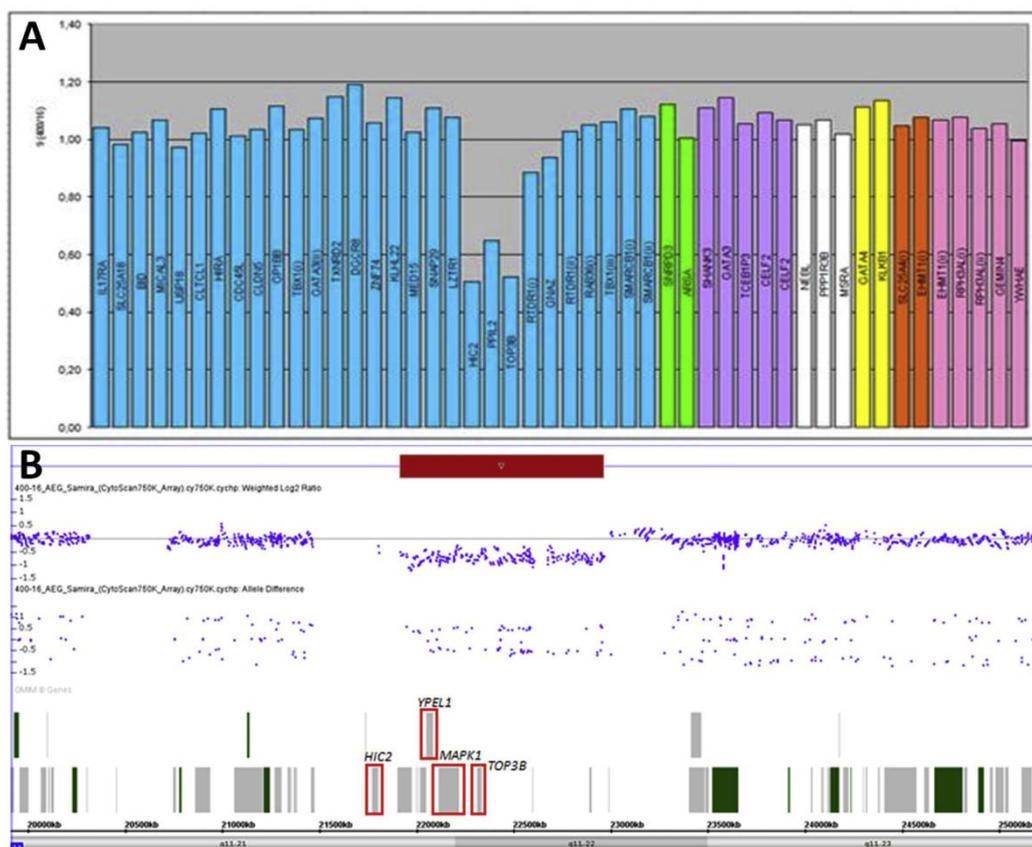


Fig. 2. A: MLPA result showing HIC2, PPL2 and TOP3B probes deletion. B: Partial chromosome 22 microarray hybridization profile showing a deletion of 1048 kb in the 22q11.2 region - [GRCh37] 22q11.21q11.22(21464763,22962962) × 1.

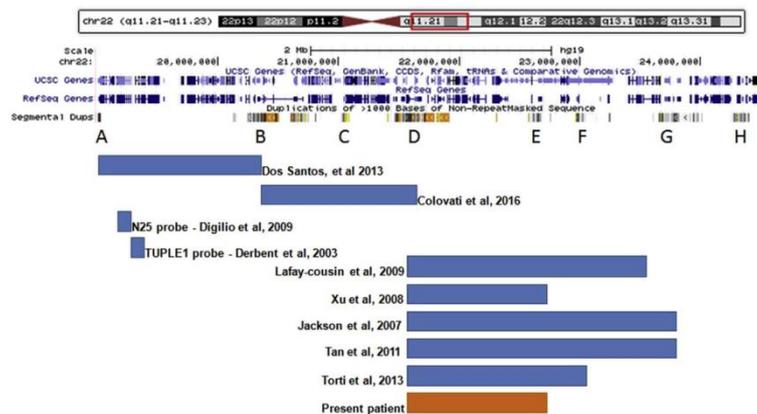


Fig. 3. 22q11.2 deletions described in the literature in patients with CFM/OAVS phenotype.

Table 1
Comparison of clinical signs between the present patient and other CFM/OAVS cases with 22q11.2 deletions described in the literature.

Type	CFM/OAVS										
	Proximal	Central		Distal							
	Digilio et al., 2009	Derbent et al., 2003	Dos Santos et al., 2014	Colovati et al., 2015	Jackson et al., 2007	Lafay-Cousin et al., 2009	Tan et al., 2011	Torti et al., 2013	Xi et al., 2008	Present patient	Burnside 2015
22q11.2 region	N25 Probe	TUPLE1 A-D Probe	A-D	B-D	D-G	D-G	D-G	D-F	D-E	D-E	C-E, D-E, D-F
	Patient 1	Patient 2	Patient 3			Patient 1		Patient 2			
Microtia	+	+	+L	+	-	+	-	-	-	-	-
Low-set ears	+	+L	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Preauricular tags	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Other ear alterations			Dysmorphic ears		Simple ears			+R Lop ear with an overfolded superior helix		+B	+B
Hearing loss	+L	+	+R	+L	+	+R	+	NR	+	NR	-
Epibulbar dermoids	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Other ocular anomalies			+B optic nerve hypoplasia								
Coloboma of the upper left eyelid and microphthalmia											
Facial asymmetry	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Malar hypoplasia	-	-	-	+	NR	+	NR	-	-	-	+
Mandibular hypoplasia	-	-	-	-	NR	-	NR	+	-	-	+
Micro/retrognathia	-	-	-	+	NR	+	NR	NR	+	+	-
Orofacial clefts/palatal anomalies	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	-	+R macrostomia	CLP, macrostomia	+B CL, CP
Vertebral anomalies	-	-	BV	BV	NR	Incomplete closure of the vertebral body in the thoracic portion	NR	-	-	-	-
Limb anomalies	Long fingers	Long fingers	Tapered fingers and flat feet	NR	Ligament laxity and hyperextensible fingers and right deafness	NR	Joint hyperextensibility and tapered fingers	Right-sided weakness	+	Mild lumbar lordosis and camptodactyly of digits	Clinoactyly of the 5th finger

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Type	CFM/OAVS												
	Proximal			Central			Distal						
	Digilio et al., 2009	Derbent et al., 2003	Dos Santos et al., 2014	Colovati et al., 2015	Jackson et al., 2007	Lafay-Cousin et al., 2009	Tan et al., 2011	Torti et al., 2013	Xu et al., 2008	Present patient	Burnside 2015		
22q11.2 region	NS5 Probe	TUPLE1 Probe	A-D	B-D	D-G	D-G	D-G	D-F	D-E	D-E	D-E	C-E, D-E, D-F	
	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 1			Patient 2						
Congenital Heart defects	DORV, PS,VSD	Absent right subclavian artery, patent foramen ovale, and tricuspid regurgitation	ASD	-	VSD	-	-	-	VSD	VSD, ASD	VSD, ASD	53%	
Other organs alterations	-	-	NR	-	Rhabdoid tumor	Cystic mass in the left frontal region associated with obstructive hydrocephalus	Abdominal distension, bilious aspirate and evidence of bowel obstruction	-	NR	Annular pancreas, Hydromegaly			
Microcephaly	-	-	-	-	-	NR	+	+	+	+	+	38%	
Developmental delay/Intellectual disability	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47%	
Grow restriction	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	56%	
Speech delay	NR	NR	+	NR	+	+	+	NR	NR	+	+	13%	

B: bilateral; R: right; L: left; NR: not reported; CL: cleft lip; CP: cleft palate; GLP: cleft lip and palate; BV: butterfly vertebra; VSD: ventricular septal defect; ASD: atrial septal defect; DORV: double outlet right ventricle.

Table 2
Disease-causing genes candidate to CFM/OAVS mapped in the deleted region arr[hg19]22q11.21-q11.22.

Gene name	Description	Function
<i>HIC2</i>	Transcriptional repressor 2	It might play a role in cardiac developmental ^a
<i>YPEL1</i>	Yippee like 1	It plays a role in the regulation of cell division ^b
<i>MAPK1/ERK2</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	It plays a role in a wide variety of cellular processes such as proliferation, differentiation, transcription regulation and development ^b

^a Dykes et al., 2014.

^b Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM).

(Xu et al., 2008; Torti et al., 2013) were observed only in distal deletions. Cleft lip and palate (CLP) was observed only in cases presenting the distal deletion between LCRs D and E, in the present patient and in the case described by Xu et al., (2008) (Table 1).

Mandibular hypoplasia was observed in one proximal deletion case (Derbent et al., 2003) and two distal deletion cases (Tan et al., 2011; Torti et al., 2013). However, Derbent et al., (2003) and Digilio et al., (2009) used FISH (Fluorescent in situ hybridization) probes to detect the deletions, *TUPLE1* and *N25*, respectively. Therefore, it is not possible to recognize the exact extension of the segments deleted. However, as these probes are mapped in the proximal region, these authors considered the deletions as proximal 22q11.2 deletions.

In the present case, the deleted region 22q11.21q11.22 with 1048 kb encompasses 17 genes, including nine catalogued in OMIM database and three of them are candidates to pharyngeal arches developmental failure or heart disease (Fig. 3 and Table 2). The *YPEL1* gene has an aminoacid sequence conserved in many species (Farlie et al., 2001) and plays a role in developmental structures originated from pharyngeal arches, such as observed in zebrafish *Ypel1* knock-down which showed craniofacial defects and mandibular subdevelopmental (Aerts et al., 2006). Other study showed that the overexpression of *YPEL1* results in craniofacial hypoplasia and chondrogenesis alterations, reinforcing that this gene has an important role in these structures during morphogenesis (Tan et al., 2015).

Congenital heart diseases (CHDs) in patients with proximal 22q11.2 deletion are associated to *TBX1* gene haplo-insufficiency. In patients with central deletions, located between LCRs B and D, it was observed that CHDs are reduced compared to proximal and distal deletion cases, but the *CRKL* gene may be the cause of CHDs in this deletion type (Rump et al., 2014). In individuals with 22q11 distal deletion type 1 (LCRs C-E, D-E, D-F) the most common CHDs observed are septal defects (Burnside, 2015) as observed in the present individual. The cause of CHDs and craniofacial anomalies in patients with distal 22q11.2 deletions may be associated with haplo-insufficient *MAPK1/ERK2* expression, due to failure of neural crest cells development. Newbern et al., (2008) showed that the elimination of *Erk2* specifically in mouse neural crest leads to craniofacial and cardiac defects analogous to those seen in patients with *ERK2* deletions. The same authors suggested a neural crest autonomous role for *ERK2* signaling in the etiology of the distal 22q11.2 deletion (Newbern et al., 2008).

Another candidate gene involved in heart defects is *HIC2* that demonstrated to play a role in some stages of heart development. A study with mouse model showed that heterozygous deletions of this gene caused cardiac defects (Dykes et al., 2014). Deletion of *TOP3B* have been associated with cognitive impairment and facial dysmorphism in a patient with a small 22q11.2 deletion involving only this disease-causing gene (Kaufman et al., 2016). Our patient presents mild intellectual disability, developmental and speech delay.

Other genes in the 22q11.2 proximal have been proposed to be implicated in the development of neural crest and pharyngeal arches,

like the *GSC2* (Dos Santos et al., 2014). However, CFM/OAVS is a rare phenotype in patients with the 22q11.2 proximal deletion. In addition, the patient reported by Colovati et al., (2015) presents a central deletion, which does not encompass any gene involved in pharyngeal arch development. So, these authors suggested a possible position effect, because this reported deletion is mapped less than 1 Mb from *YPEL1* and *MAKPI* genes, supporting their role as candidate genes for the CFM/OAVS phenotype in the distal 22q11.2 deletion.

In conclusion, this case corroborates the phenotypic similarities between distal 22q11.2 deletion and CFM/OAVS. In addition, it contributes to genotype-phenotype correlation and reinforces the possibility that candidate genes for CFM/OAVS, in the 22q11.2 distal region, might be located between LCRs D and E.

Conflicts of interest

We declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge the patient and her parents for their cooperation. This study received financial support by the State of São Paulo Research Foundation (# 2012/51799-6), the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (# 460422/2014-6) and Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão/UNICAMP (# 519.292-0144/15; 519.294-0411/15).

References

- Aerts, S., Lambrechts, D., Maitly, S., Van Loo, P., Coessens, B., De Smet, F., Tranchevent, L.C., De Moor, B., Marynen, P., Hassan, B., Carmeliet, P., Moreau, Y., 2006. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat. Biotechnol.* 24 (5), 537–544.
- Ashokan, C.S., Sreenivasan, A., Saraswathy, G.K., 2014. Goldenhar syndrome - review with case series. *J. Clin. Diagn. Res.* 8 (4), ZD17–219.
- Barisic, I., Odak, L., Loane, M., Garne, E., Wellesley, D., Calzolari, E., Dolk, H., Addor, M.C., Arriola, L., Bergman, J., Bianca, S., Doray, B., Khoshnood, B., Klungsoyr, K., McDonnell, B., Pierini, A., Rankin, J., Rissmann, A., Roundling, C., Queisser-Luft, A., Scarano, G., Tucker, D., 2014. Prevalence, prenatal diagnosis and clinical features of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a registry-based study in Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 22 (8), 1026–1033.
- Beleza-Meireles, A., Clayton-Smith, J., Saraiva, J.M., Tassabehji, M., 2014. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: a review of the literature and genetic update. *J. Med. Genet.* 51 (10), 635–645.
- Beleza-Meireles, A., Hart, R., Clayton-Smith, J., Oliveira, R., Reis, C.F., Venâncio, M., Ramos, F., Sá, J., Ramos, L., Cunha, E., Pires, L.M., Carreira, I.M., Scholey, R., Wright, R., Urquhart, J.E., Briggs, T.A., Kerr, B., Kingston, H., Metcalfe, K., Donnai, D., Newman, W.G., Saraiva, J.M., Tassabehji, M., 2015. Oculo-auriculo-vertebral spectrum: clinical and molecular analysis of 51 patients. *Eur. J. Med. Genet.* 58 (9), 455–465.
- Berenguer, M., Tingaud-Sequeira, A., Colovati, M., Melaragno, M.I., Bragagnolo, S., Perez, A.B.A., Arveller, B., Lacombe, D., Rooryck, C., 2017. A novel de novo mutation in *MYT1*, the unique OAVS gene identified so far. *Eur. J. Hum. Genet.* 25 (9), 1083–1086.
- Burnside, R.D., 2015. 22q11.21 deletion syndromes: a review of proximal, central, and distal deletions and their associated features. *Cytogenet. Genome Res.* 146 (2), 89–99.
- Colovati, M.E., Bragagnolo, S., Guilherme, R.S., Dantas, A.G., Soares, M.F., Kim, C.A., Perez, A.B., Melaragno, M., 2015. Atypical 581-kb 22q11.21 deletion in a patient with oculo-auriculo-vertebral spectrum phenotype. *Cytogenet. Genome Res.* 147 (2–3), 130–134.
- Derbent, M., Yilmaz, Z., Baltaci, V., Saygil, i A., Varan, B., Tokel, K., 2003. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am. J. Med. Genet. A* 116A (2), 129–135.
- Digilio, M.C., McDonald-McGinn, D.M., Helke, C., Catania, C., Dallapiccola, B., Marino, B., Zackai, E.H., 2009. Three patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and microdeletion 22q11.2. *Am. J. Med. Genet. A* 149A (12), 2860–2864.
- Dos Santos, P.A., de Oliveira, S.F., Freitas, E.L., Safatle, H.P., Rosenberg, C., Ferrari, I., Mazzeu, J.F., 2014. Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Am. J. Med. Genet. A* 164A (2), 551–553.
- Dykes, I.M., van Bueren, K.L., Ashmore, R.J., Floss, T., Wurst, W., Szumska, D., Bhattacharya, S., Scambler, P.J., 2014. *HIC2* is a novel dosage-dependent regulator of cardiac development located within the distal 22q11 deletion syndrome region. *Circ. Res.* 115 (1), 23–31.
- Farlie, P., Reid, C., Wilcox, S., Peeters, J., Reed, G., Newgreen, D., 2001. *Ypel1*: a novel nuclear protein that induces an epithelial-like morphology in fibroblasts. *Gene Cell.* 6 (7), 619–629.
- Jackson, E.M., Shaikh, T.H., Gururangan, S., Jones, M.C., Malkin, D., Nikkel, S.M.,

- Zuppan, C.W., Wainwright, L.M., Zhang, F., Biegel, J.A., 2007. High-density single nucleotide polymorphism array analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Hum. Genet.* 122 (2), 117–127.
- Kaufman, C.S., Genovese, A., Butler, M.G., 2016. Deletion of TOP3B is associated with cognitive impairment and facial dysmorphism. *Cytogenet. Genome Res.* 150 (2), 106–111.
- Lafay-Cousin, L., Payne, E., Strother, D., Chermos, J., Chan, M., Bernier, F.P., 2009. Goldenhar phenotype in a child with distal 22q11.2 deletion and intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor. *Am. J. Med. Genet. A* 149A (12), 2855–2859.
- Newbern, J., Zhong, J., Wickramasinghe, R.S., Li, X., Wu, Y., Samuels, I., Cherosky, N., Karlo, J.C., O'Loughlin, B., Wikenheiser, J., Garghesha, M., Doughman, Y.Q., Channon, J., Ginty, D.D., Watanabe, M., Saitta, S.C., Snider, W.D., Landreth, G.E., 2008. Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (44), 17115–17120.
- Rooryck, C., Soukri, N., Caillley, D., Bouron, J., Goizet, C., Delrue, M.A., Marlin, S., Lacombe, F.D., Arveiler, B., 2010. Array-CGH analysis of a cohort of 86 patients with oculoauriculovertrebral spectrum. *Am. J. Med. Genet. A* 152A (8), 1984–1989.
- Rosa, R.F., Dall'agnol, L., Zen, P.R., Pereira, V.L., Graziadio, C., Paskulin, G.A., 2010. Oculo-auriculo-vertebral spectrum and cardiac malformations. *Rev. Assoc. Med. Bras* 56 (1), 62–66.
- Rump, P., de Leeuw, N., van Essen, A.J., Verschuuren-Bemelmans, C.C., Veenstra-Knol, H.E., Swinkels, M.E., Oostdijk, W., Rulvenkamp, C., Reardon, W., de Munick, S., Ruiters, M., Frumkin, A., Lev, D., Eves, C., Sikkema-Raddatz, B., Dijkhuizen, T., van Ravenswaaij-Arts, C.M., 2014. Central 22q11.2 deletions. *Am. J. Med. Genet. A* 164A (11), 2707–2723.
- Silva, A.P., Rosa, R.F., Trevisan, P., Dorneles, J.C., Mesquita, C.S., Mattos, V.F., Paskulin, G.A., Zen, P.R., 2015. Clinical and cytogenetic features of a Brazilian sample of patients with phenotype of oculo-auriculo-vertebral spectrum: a cross-sectional study. *Sao Paulo Med. J.* 133 (3), 191–198.
- Tan, T.Y., Collins, A., James, P.A., McGillivray, G., Stark, Z., Gordon, C.T., Leventer, R.J., Pope, K., Forbes, R., Crolla, J.A., Ganesamoorthy, D., Burgess, T., Bruno, D.L., Slater, H.R., Farlie, P.G., Amor, D.J., 2011. Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *Am. J. Med. Genet. A* 155A (7), 1623–1633.
- Tan, T.Y., Gordon, C.T., Miller, K.A., Amor, D.J., Farlie, P.G., 2015. YPELI overexpression in early avian craniofacial mesenchyme causes mandibular dysmorphogenesis by up-regulating apoptosis. *Dev. Dynam.* 244 (8), 1022–1030.
- Torti, E.E., Braddock, S.R., Bernreuter, K., Batanian, J.R., 2013. Oculo-auriculo-vertebral spectrum, cat eye, and distal 22q11 microdeletion syndromes: a unique double rearrangement. *Am. J. Med. Genet. A* 161A (8), 1992–1998.
- Xu, J., Fan, Y.S., Siu, V.M., 2008. A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide array CGH: is this a candidate region for the syndrome? *Am. J. Med. Genet. A* 146A (14), 1886–1889.

Web resources

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (OMIM) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

UCSC Genome Browser - <http://genome.ucsc.edu/>.