Marcília Sierro Grassi

Detecção precoce da deleção 22q11.2 em recém-nascidos e lactentes portadores de cardiopatia congênita

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Magda Maria Sales
Carneiro Sampaio
Coorientadora: Profa. Dra. Leslie Domenici
Kulikowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Grassi, Marcília Sierro

Detecção precoce da deleção 22q11.2 em recém-nascidos e lactentes portadores de cardiopatia congênita / Marcília Sierro Grassi. -- São Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Magda Maria Sales Carneiro Sampaio.

Coorientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1.Cardiopatias 2.Malformações congênitas 3.Deleção 22q11.2 4.Síndrome de DiGeorge 5.Diagnóstico precoce 6.Amplificação multiplex de sondas dependente de ligação 7.Imunodeficiência primária 8.Timo

USP/FM/DBD-340/19

Responsável: Erinalva da Concelção Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Hugo e Gicelda e aos meus avós, Alfonso e Marcília (in memorium) por todo amor, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e suas famílias que doaram voluntariamente as amostras para que este estudo pudesse acontecer.

À minha orientadora Profa. Dra. Magda Carneiro-Sampaio, pela oportunidade, pelo aprendizado, pela confiança e amizade durante estes anos.

À minha coorientadora Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski, pela amizade, apoio, incentivo e seus ensinamentos.

Ao Dr. Antônio Carlos Pastorino, pelo apoio constante, amizade, atenção, ensinamentos e por estar sempre ao meu lado. Acredito não conseguir demonstrar em palavras toda minha gratidão.

À Profa. Dra. Cristina Abe Jacob, pela atenção, amizade, acolhimento, ensinamentos e os bons momentos compartilhados.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Jornada Krebs, pelo carinho, estímulo, amizade, ajuda e pelo apoio pessoal dado desde a minha chegada como residente no Instituto da Criança.

À equipe da Neonatologia, Dra. Renata Amato Vieira, Dra. Cristina Erico Yoshimoto, Dr. Mário Cícero Falcão, Dra. Meire Nagaiassu, Dra. Cecília Lin, Dra. Juliana Zoboli Del Bigio, Dra. Nádia Orozco, Dra. Ana Paula Telles, Dr. Rafael Comparini, Ângela Midori Matuhara, Angélica Arantes, Maria Cristina Attico e Cristiane Coimbra Simões, pela colaboração e cumplicidade.

À Dra. Nana Miura e o Prof Dr. Edmar Atik pelo apoio e estímulo constantes.

À Dra. Ana Paula B. M. Castro, Dra. Mayra de Barros Dorna e Dra. Cristiane Santos, pela amizade e ajuda.

À equipe do Instituto do Coração, Prof. Dr. Marcelo Biscegli Jatene, Profa. Dra. Carla Tanamati, Dr. Leonardo Austo Miana, Dr. Luiz Fernando Caneo, Dr. Juliano Gomes Penha, Profa. Dra. Estela Azeka, Dra. Mônica Shimoda, Dra. Ana Maria Thomaz, Dra. Ana Cristina Sayuri Tanaka, Dra. Maria Angélica Binotto, Dr. Adailson Wagner da Silva Siqueira, Dr. Gustavo Foronda, Dra. Paula Vieira de Vicenzi Gaiolla e Dra. Leina Zorzanelli por toda colaboração.

À toda equipe do Laboratório de Citogenômica, Alexandre Torchio Dias, Évelin Aline Zanardo, Roberta Lelis Dutra, Marília Moreira Montenegro, Gil Monteiro Novo Filho, Thaís Moura Costa, Amom Mendes Nascimento, Fabrícia Andrea Rosa Madia, Yanca Gasparini e Samar Nasser Chehimi pela amizade, carinho, apoio e pela prontidão com que sempre me auxiliaram.

Aos médicos da Unidade de Genética do Instituto da Criança, Profa. Dra. Chong Ae Kim, Dra. Rachel Sayuri Honjo e Dra. Débora Romeo Bertola, pelo aprendizado proporcionado.

À equipe da enfermagem do Serviço de Neonatologia e Cardiologia por toda disponibilidade e ajuda para a coleta das amostras.

Aos médicos em estágio no Serviço de Neonatologia, Imunologia e Cardiologia, meu agradecimento pela cooperação.

Ao Laboratório de Genômica Pediátrica – LIM 36 pela colaboração e aprendizado.

À Profa. Dra. Edna Maria de Albuquerque Diniz, Profa. Dra. Maria Esther Jurfest Ceccon, Profa. Dra. Cléa Leone e o Prof. Dr. Rubens Feferbaum pela amizade, pelo carinho e conhecimentos transmitidos durante a minha formação médica.

Aos Professores titulares de Pediatria: Prof. Dr. Werther Brunow Carvalho, Prof. Dr. Uenis Tannuri, Profa. Dra. Sandra Josefina Ferraz Ellero Grisi e Prof. Dr. Vicente Odone Filho pelo incentivo à carreira acadêmica.

À bibliotecária Mariza, pela amizade, pronta disponibilidade e atenção.

EPÍGRAFE

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Principais cardiopatias congênitas	5
1.2	Aspectos gerais da SD22q11.2	12
1.3	Histórico.....	14
1.4	Epidemiologia	19
1.5	Etiologia e fisiopatologia da SD22q11.2	20
1.5.1	A microdeleção do cromossomo 22.	21
1.5.1.1.	O gene TBX1 na patogênese da SD22q11.2.	25
1.5.1.2.	O gene COMT na patogênese da SD22q11.2.....	28
1.5.1.3.	O gene UFD1L na patogênese da SD22q11.2.....	29
1.5.1.4.	Outros genes envolvidos na patogênese da SD22q11.2.....	29
1.6	Caracterização clínica da SD22q11.2	30
1.7	Diagnóstico clínico, molecular e laboratorial da SD22q11.2.....	36
1.8	Outras síndromes de microdeleções e microduplicações	41
2	OBJETIVOS.....	43
3	MÉTODOS.....	45
3.1	Locais do estudo	46
3.2	Crítérios de inclusão e exclusão	46
3.3	Métodos.....	47
3.3.1	Citogenética molecular	47
3.3.2	Isolamento e quantificação de DNA.....	47
3.3.3	MLPA.....	48

3.3.4	Análise dos resultados de MLPA.....	56
3.4	Delineamento do estudo.....	61
3.5	Análise estatística.....	61
3.6	Aprovação por Comissão de Ética	61
4	RESULTADOS	62
4.1	Cardiopatias congênicas encontradas no estudo.....	64
4.2	Alterações genômicas diagnosticadas	66
4.2.1	Diagnóstico da deleção 22q11.2	68
4.2.2	Diagnóstico das outras alterações genômicas.	69
4.3	Descrição clínico-laboratorial dos pacientes do estudo	72
5	DISCUSSÃO.....	76
5.1	Características dos pacientes estudados	79
5.2	Cardiopatias congênicas presentes nos pacientes do estudo.....	79
5.3	Visão geral dos estudos sobre a deleção 22q11.2 no Brasil	82
5.4	Características dos pacientes com a deleção 22q11.2 estudados ...	89
5.5	Cardiopatias congênicas presentes nos pacientes com a deleção 22q11.2 estudados	90
5.6	Importância do diagnóstico precoce da SD22q11.2 pela técnica de MLPA.....	93
5.7	Deteção de outras alterações genômicas e/ou duplicações durante a investigação da deleção 22q11.2	96
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	105
7	CONCLUSÃO	108
8	ANEXOS.....	110
	ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa	111
	ANEXO B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para a criança.....	112
	ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os responsáveis.....	116
	ANEXO D – Protocolo aplicado no estudo	120
	ANEXO E – Autorização para o uso de fotografias.....	129
	ANEXO F – Nome (iniciais), registro (RG), idade, sexo e kits de MLPA utilizados nas 118 crianças do estudo.....	130
	ANEXO G –Tabela das sondas disponíveis no kit P064 da MLPA	134
	ANEXO H – Tabela das sondas disponíveis no kit P036 da MLPA	136

ANEXO I – Tabela das sondas disponíveis no kit P070 da MLPA.....	138
ANEXO J – Tabela das sondas disponíveis no kit P250 da MLPA.....	140
ANEXO K – Tabela das sondas disponíveis no kit P356 da MLPA	142
8 REFERÊNCIAS	144

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH-array	- <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
AP	- Atresia pulmonar
AP/CIV	- Atresia pulmonar com comunicação interventricular
CC	- Cardiopatia Congênita
CIA	- Comunicação interatrial
CIV	- Comunicação interventricular
CNVs	- Variações no número de cópias
CTIN2	- Centro de Tratamento Intensivo Neonatal do Instituto da Criança
CTI	- Centro de Terapia Intensivo
CoAo	- Coarctação da aorta
COMT	- <i>Catecol O-Metiltransferase</i>
CRKL	- <i>V-crk avian Sarcoma Vírus CT 10 Oncogene Homolog-like</i>
DGCR8	- <i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DSAVP	- Defeito do septo atrioventricular parcial
DSAVT	- Defeito do septo atrioventricular total
DSV	- Defeito do septo ventricular
EA	- Estenose aórtica
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetra-acético
EP	- Estenose pulmonar
FISH	- Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência
FO	- Forame oval
GABRD	- <i>Gamma-aminobutyric acid receptor subunit delta</i>

GATA4	- <i>GATA Binding Protein 4</i>
HIRA/TUPLE1	- <i>HIR Histone Cell Cycle Regulation Defective</i>
IAA	- Interrupção do arco aórtico
ICr-HCFMUSP	- Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
InCor	- Instituto do Coração
KCNQ3	- <i>Potassium Channel Voltage Gated KQT-Like Subfamily Q. Member 3</i>
LCR	- Low Copy Repeats
MAPK1	- <i>Mitogen-activated Protein Kinase 1</i>
MCPH1	- <i>Microcefalina 1</i>
MLPA	- <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MMP23B	- <i>Matrix metalloproteinase-23</i>
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PCA	- Persistência do canal arterial
PCR-RFLP	- <i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PIK4CA	- <i>Phosphatidylinositol 4-kinase alpha</i>
PKS	- Síndrome de Pallister-Killian
PRODH	- <i>Prolina Dehydrogenase</i>
RN	- Recém-Nascidos
SD22q11.2	- Síndrome da deleção 22q11.2
SDG	- Síndrome de DiGeorge
SHCE	- Síndrome do coração esquerdo hipoplásico
SKY	- <i>Skywalker</i>

SNAP29	- <i>Synaptosomal associated protein 29KDa</i>
SVCF	- Síndrome Velocardiofacial
SOX7	- <i>SRY-Box 7</i>
SUS	- Sistema Único de Saúde
TA	- Truncus arteriosus
TBX1	- <i>T-box Fator de Transcrição 1</i>
TGA	- Transposição das grandes artérias
<i>TNKS</i>	- <i>Tankyrase 1</i>
TOF	- Tetralogia de Fallot
TREC	- <i>TCR Rearrangement Excision Circles</i>
UFD1L	- <i>Ubiquitin Fusion Degradation 1-like</i>
VD	- Ventrículo direito
ZDHHC8 C8	- <i>Zinc Finger DHHC Domain-Containing Protein 8</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da deleção 22q11.2.....	26
Figura 2 – Localização cromossômica do gene TBX1.....	27
Figura 3 – Modelo de constituição da sonda da MLPA	51
Figura 4 – Representação esquemática da metodologia de MLPA.....	52
Figura 5 – Etapas do método de MLPA.....	56
Figura 6 – Sequenciador automático ABI 3500 <i>Genetic Analyzer</i>	57
Figura 7 – Relatório de análise da MLPA gerado pelo <i>software GeneMarker®</i>	60
Figura 8 – Representação esquemática do <i>software</i> de análise Coffalyser.Net	61
Figura 9 – Distribuição das principais cardiopatias congênitas em 118 pacientes.....	65
Figura 10 – Fluxograma das alterações genômicas encontradas no estudo pela técnica de MLPA	68
Figura 11 – Cardiopatias encontradas nos pacientes com a deleção 22q11.2	70
Figura 12 – Cardiopatias dos pacientes com outras alterações genômicas....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da amostra de pacientes do estudo	64
Tabela 2 – Cardiopatias encontradas nos 118 pacientes do estudo.....	66
Tabela 3 – Análise molecular dos 10 pacientes com deleção 22q11.2.....	69
Tabela 4 – Análise molecular dos 6 pacientes com outras alterações genômicas.....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estudo sobre a detecção da deleção 22q11.2 no Brasil.....	14
---	----

RESUMO

Grassi MS. *Detecção precoce da deleção 22q11.2 em recém-nascidos e lactentes portadores de cardiopatia congênita* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A Síndrome da deleção 22q11.2 (SD22q11.2) apresenta alta variabilidade fenotípica incluindo diferentes características clínicas e comportamentais, representando um desafio diagnóstico ao nascimento, que pode retardar o tratamento adequado e o aconselhamento genético. O diagnóstico precoce da SD22q11.2 é fundamental, devido à significativa morbimortalidade no primeiro ano de vida, no impacto na conduta do tratamento para essas crianças e para a elaboração de políticas públicas de saúde.

OBJETIVO: Investigar a frequência da SD22q11.2 em recém-nascidos (RN) e lactentes no primeiro ano de vida portadores de cardiopatia congênita (CC), atendidos no Centro Neonatal do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HCFMUSP); no Centro de Tratamento Intensivo Neonatal do Instituto da Criança (CTIN2) – ICr-HCFMUSP e na UTI Pediátrica do Instituto do Coração (InCor) HCFMUSP por meio da técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que detecta a variação do número de cópias gênicas. **MÉTODOS:** Participaram do estudo 118 RN e lactentes portadores de CC no período de março de 2012 a junho de 2014. As amostras de DNA foram analisadas utilizando a técnica de MLPA com os kits P036, P064, P070, P250-B1 e P356-A1. **RESULTADOS:** Nos 118 pacientes estudados (69M: 49F), a idade variou entre um dia a 11 meses, com média de idade de 41,4 dias. A análise molecular pela técnica de MLPA possibilitou a detecção da deleção 22q11.2 em 10/118 pacientes (8,5%). Outras alterações genômicas foram diagnosticadas em 6/118 pacientes (5%): deleção 1p36, deleção 7p, deleção 8p23 (2 casos), duplicação 7q e duplicação 8q24. As CC encontradas nos 10 pacientes com a SD22q11.2 foram: atresia pulmonar, estenose pulmonar, tetralogia de Fallot, truncus arteriosus, coarctação de aorta, dupla via de saída de ventrículo direito e conexão anômala de veias pulmonares. **CONCLUSÕES:** Foi possível investigar e detectar alterações genômicas presentes em RN e lactentes portadores de CC com a técnica de MLPA em um número maior do que é demonstrado na literatura. Isso demonstra a importância da investigação precoce em pacientes com CC grave para avaliar o prognóstico, os riscos de recorrência e, ao mesmo tempo, permitir seguimento e terapêuticas adequados, visando melhora na qualidade de vida dessas crianças.

Descritores: Cardiopatias; Malformações congênitas; Deleção 22q11.2; Síndrome de DiGeorge; Diagnóstico precoce; Amplificação multiplex de sondas dependente de ligação; Imunodeficiência primária; Timo.

SUMMARY

Grassi MS. *Early detection of the 22q11.2 deletion syndrome in newborns and infants with congenital heart disease* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: The 22q11.2 deletion syndrome (SD22q11.2) has a high phenotypic variation, including different clinical and behavioral features, which represents a diagnostic challenge at birth, which may delay the proper treatment and genetic counseling. The early diagnosis of SD22q11.2 is crucial, due to the significant morbi-mortality during the first year of life, to the impact in conducting the treatment for these infants and to the formulation of health public policies.

OBJECTIVE: Investigate the incidence of SD22q11.2 in newborns (NB) and infants with congenital heart diseases (CHD), assisted by the Newborn Care Center of the Children’s Institute– HCFMUSP; by the Newborn Intensive Care Center of the Children’s Institute (CTIN2) – HCFMUSP and by the pediatric ICU of the Heart Institute– HCFMUSP using the MLPA technique, which detects aberrant copy numbers.

METHODS: The survey included 118 NB and infants with CHDs from March 2012 to June 2014.. The DNA samples were analyzed using the MLPA technique with the P036, P064, P070, P250-B1 and P356-A1 sets.

RESULTS: The molecular analysis using the MLPA technique allowed the detection of the 22q11.2 deletion in 10/118 patients (8.5%). The other genomic alterations diagnosed in 6/118 patients (5%) were: 1p36 del, 7p del, 8p23 del (2 cases), 7q dup and 8q24 dup. In the 118 surveyed patients (69M: 49F), the age ranged from one day to 11 months old, with an average age of 41.4 days. The heart diseases found in the 10 patients with SD22q11.2 were: pulmonary atresia, pulmonary stenosis, Fallot tetralogy, truncus arteriosus, aortic coarctation, double outlet right ventricle and anomalous connection of pulmonary veins.

CONCLUSIONS: It was possible to investigate and detect genomic alterations present in NB and infants with CHDs using the MLPA technique in a larger number than is demonstrated in the literature. The detection of genomic alterations will allow clinicians to evaluate the prognosis and the risks of recurrence while allowing proper follow-up and treatment, aiming at improving the children’s life quality.

Descriptors: Heart diseases; Congenital malformations; 22q11.2 deletion; DiGeorge syndrome; Early diagnosis; MLPA; Primary immunodeficiency; Thymus gland.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As malformações congênitas são detectadas em aproximadamente 6% dos recém-nascidos, sendo descrito na literatura mundial que 7,9 milhões de crianças nascem com defeitos congênitos graves por ano. No Brasil, as malformações representam a segunda causa de óbito em menores de um ano tornando-se um problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 2017; Lima et al., 2018).

A doença cardíaca congênita, conforme a definição proposta por Mitchell et al, consiste em uma anormalidade estrutural macroscópica do coração ou dos grandes vasos intratorácicos, com repercussões funcionais e representa cerca de 40% de todas as malformações congênitas. A sua frequência segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), varia entre 0,8% nos países com alta renda e 1,2% nos países com baixa renda, sendo que o valor médio de 1% de incidência é habitualmente aceito para o Brasil e demais países da América Latina (Mitchell et al., 1971; Rosa et al., 2013; Ministério da Saúde, 2017).

O Brasil registra anualmente 2,8 milhões de nascidos vivos, podendo-se estimar o surgimento de quase 29 mil novos casos de cardiopatias congênitas (CC) ao ano. Aproximadamente 20 a 30% dos recém-nascidos (RN) cardiopatas evoluem a óbito ainda no período neonatal. Podemos observar que as CC são as malformações de maior impacto na

morbimortalidade infantil e nos custos com Saúde Pública (Caneo et al. 2012; Rosa et al., 2013; Ministério da Saúde, 2017).

A malformação cardíaca é a anomalia congênita isolada mais comum, respondendo por 3 a 5% das mortes no período neonatal. Estimativas apontam que aproximadamente 20-30% das crianças morrem no primeiro mês de vida por insuficiência cardíaca ou crises de hipóxia (Silva et al., 2014).

Estima-se que 5% dos cardiopatas apresentam a Síndrome da Deleção do 22q11.2 (SD22q11.2) e o seu diagnóstico no primeiro ano de vida representa um grande desafio devido a uma variabilidade clínica significativa e taxa elevada de mortalidade, principalmente nos primeiros meses de vida, em decorrência de complicações associadas às CC. É considerada a segunda Imunodeficiência Primária mais comum. (Matsuoka et al., 1998; McDonald-McGinn et al., 1999; Goldmuntz, 2005, Karayiorgou et al., 2010; Maggadottir et al., 2013; Kuo et al., 2018; Mutlu et al., 2018; Palmer et al., 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

O atendimento integral à criança com cardiopatia no Brasil é um dos maiores desafios do nosso sistema de saúde. Diante das dimensões continentais do País e da distribuição geográfica desigual dos centros de referência de cardiologia e cirurgia cardíaca pediátrica, crianças cardiopatas não obtêm o tratamento adequado no momento oportuno. Diante disso, torna-se fundamental estabelecer diretrizes nacionais com vistas à atenção integral e resolutiva que se deseja ofertar, abordando a fase de diagnóstico pré-natal e pós-natal, o atendimento clínico inicial adequado, a transferência racional

para os centros de referência e o apropriado seguimento das crianças tratadas (Ministério da Saúde, 2017).

Atualmente, preconiza-se a triagem neonatal de CC por meio da combinação entre a ultrassonografia pré-natal, o exame clínico detalhado do neonato e a realização da oximetria de pulso. A adoção dessa estratégia tripla de triagem potencializa o diagnóstico das malformações, e a incorporação da oximetria de pulso, também conhecida como Teste do Coraçãozinho, que contribui para a detecção das CC críticas, condições graves que cursam com diminuição da saturação periférica de oxigênio e muito dificilmente são identificadas no exame clínico (Ministério da Saúde, 2017).

As causas genéticas envolvidas na etiologia das CC podem ser decorrentes de mutações, alterações cromossômicas e gênicas, sendo que a deleção do 22q11.2 é considerada a segunda alteração cromossômica mais associada à CC, com frequência de 1:2000-6000 nascidos vivos. É importante ressaltar que a síndrome genética mais comumente relacionada à CC é síndrome de Down. (Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Fomin et al., 2010; Ikari & Azeka et al., 2011; Caneo et al., 2012; Gennery, 2012; Campbell et al., 2018; Kuo et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

No que se refere aos possíveis fatores causais das CC, algumas condições maternas contribuem para o aumento dos riscos, tais como diabetes mellitus, obesidade, hipertensão arterial, doenças da tireoide, epilepsia, tabagismo no primeiro trimestre de gestação, algumas infecções, doenças do colágeno, exposição a toxinas ambientais, uso de alguns

medicamentos e álcool, a reprodução assistida e CC na história materna ou familiar (parentes de primeiro grau) (Hockenberry et al., 2011; Oster et al., 2011; Liu et al., 2013).

As CC com apresentação no período neonatal merecem especial atenção devido à sua elevada gravidade. Cerca de 25% das CC apresentam quadro clínico grave já nos primeiros dias de vida e são consideradas como CC críticas. Esse tipo de cardiopatia requer diagnóstico rápido e tratamento clínico inicial específico, além de provável cirurgia cardíaca ou cateterismo intervencionista já no primeiro mês de vida (Koshnood et al., 2012).

O grupo de CC críticas representa ainda uma das principais causas de mortalidade nesta faixa etária (Koshnood et al., 2012). Nessas crianças, o fechamento do canal arterial pode precipitar a rápida deterioração clínica e ocasionar um desfecho fatal. A detecção precoce de CC críticas neonatais constitui um desafio porque os achados clínicos podem ser sutis ou ausentes imediatamente após o nascimento e a triagem pré-natal não detecta de forma confiável todos os casos de doença congênita. Infelizmente, um número considerável de bebês falece nas primeiras semanas de vida sem sequer terem recebido o diagnóstico da cardiopatia (Chang et al., 2008; De-Wahl et al., 2009; Koshnood et al., 2012).

1.1. Principais cardiopatias congênitas

Os defeitos cardíacos são classificados como cianóticos e acianóticos, indicando a presença ou não de coloração azulada da pele e das mucosas em virtude de oxigenação insuficiente do sangue. A outra classificação leva

em conta as características hemodinâmicas, como fluxo sanguíneo pulmonar aumentado ou diminuído, obstrução do fluxo sanguíneo fora do coração e fluxo sanguíneo misto. Entre as cardiopatias acianóticas mais frequentes estão a comunicação interatrial (CIA), a comunicação interventricular (CIV), o defeito do septo atrioventricular total (DSAVT) ou parcial (DSAVP), que, muitas vezes, podem estar associados à síndrome de Down, estenose aórtica (EA), persistência do canal arterial (PCA) e coarctação da aorta (CoAo). As CC cianóticas são relacionadas a um maior potencial de gravidade, sendo a mais comum a tetralogia de Fallot (TOF), que corresponde a 10% de todas as cardiopatias (Jatene et al., 2002).

É importante destacar que, em 74-80% dos pacientes com a SD22q11.2., encontram-se os defeitos conotruncais: TOF, transposição das grandes artérias (TGA), CoAo, atresia pulmonar com comunicação interventricular (AP/CIV), truncus arteriosus (TA) tipo I e interrupção do arco aórtico (IAA) tipo B (Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Gennery, 2012; Zhang et al., 2015; Campbell et al., 2018; Kuo et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

A TOF é geralmente reconhecida como a malformação cardíaca cianótica mais comum, com incidência de 7 a 10% do total das cardiopatias congênitas. Apresenta quatro características principais: defeito de septo ventricular (DSV), estenose pulmonar (EP), dextroposição de aorta e hipertrofia de ventrículo direito (VD), secundários ao desvio anterior do septo infundibular, a qual é a sua principal característica (Pinsky & Arciniegas, 1990). Os defeitos anatômicos diminuem a quantidade de oxigênio no sangue,

levando à cianose, policitemia e hipóxia. A hipóxia é encontrada com frequência, predispondo os pacientes a acidentes cerebrovasculares. Quando não tratada, a maioria dos pacientes morre ainda na infância, sendo, portanto, indicada a cirurgia cardíaca o mais cedo possível, preferencialmente entre 18 e 24 meses de idade (Spivack, 2001). Cabe salientar que a frequência da TOF nos pacientes com SD22q11.2 varia de 20 a 45% (Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Gennery, 2012; McDonald-McGinn, 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

Considerada como uma das CC cianogênicas mais comumente encontradas no período neonatal, com incidência de 1 a cada 3000 nascidos vivos, a TGA classicamente se caracteriza pela aorta anteriorizada e à direita da artéria pulmonar. Em alguns pacientes podem ocorrer variações anatômicas, como a aorta posterior, por exemplo. Os *shunts* são necessários entre os sistemas circulatórios, pulmonar e sistêmico, sendo que em 40% dos casos o septo interventricular está aberto (Carvalho et al., 1984, Gontijo et al., 2001).

A TGA clássica ou simples é assim denominada quando existe integridade do septo interventricular, ausência de obstrução na via de saída do ventrículo esquerdo e, frequentemente, forame oval pérvio (FO) e PCA. Já a forma complexa pode estar associada a CIV/EP em 30% dos casos e CoAo, o que dificulta o fluxo na saída do ventrículo esquerdo (Farah & Villela 2001).

Vale ressaltar que a TGA é uma patologia que cursa com alta mortalidade, a qual sem tratamento cirúrgico leva ao óbito na primeira semana de vida em 28,7% dos pacientes, 51,6% no primeiro mês e 89,3% não

sobrevivem ao primeiro ano. A cirurgia de correção definitiva da TGA é a conhecida como cirurgia de Jatene. (Farah & Villela 2001).

A CoAo é uma malformação cardiovascular também comum, responsável por 5 a 8% das CC, com uma prevalência de 3/10.000 nascidos vivos e com predomínio no sexo masculino. (Rao, 2005).

Essa malformação cardíaca, pode-se apresentar como lesão isolada ou associada a outras anomalias, tais como a valva aórtica bivalvular, PCA, CIV, EA valvar ou subvalvar, sendo ainda a malformação cardiovascular mais frequente na síndrome de Turner. O reconhecimento clínico é relativamente simples, caracterizado pela ausência ou diminuição da amplitude dos pulsos arteriais nos membros inferiores associado a presença de pulsos amplos e hipertensão arterial nos membros superiores (Hager et al., 2007; Baumgartner et al., 2010).

Vale ressaltar que muitos RN recebem alta das maternidades sem o diagnóstico estabelecido de CoAo e, uma a duas semanas depois, retornam aos hospitais com insuficiência cardíaca congestiva, broncopneumonia e insuficiência respiratória, situação de alto risco para qualquer procedimento terapêutico, sobretudo a correção cirúrgica.

Dentre as CC, a CIV é considerada a cardiopatia mais frequente, acometendo 20 a 30% do número total dos casos e com predominância do sexo masculino. É uma importante causa de mortalidade no primeiro ano de vida, podendo apresentar-se de maneira isolada ou associada a outras síndromes. Existem associações de outros defeitos cardíacos a CIV, entre eles, a atresia pulmonar (AP) é a mais frequente. A CIV, usualmente

perimembranosa ou subarterial, ocorre em 10-50% dos pacientes com a SD22q11.2 (Croti et al., 2005; Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Gennery, 2012; McDonald-McGinn, 2018);

AP/CIV é definida como o grupo de malformações cardiopulmonares com dificuldade de conexão entre o ventrículo direito e as artérias pulmonares com intensidade dependente do grau de EP. Cabe salientar que essa associação está presente em 10 a 25% dos pacientes com a deleção 22q11.2 (Croti et al., 2005; Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Gennery, 2012; McDonald-McGinn, 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

É importante destacar que os pacientes portadores desta patologia apresentam quadro grave, sendo fundamental a identificação precoce, para possibilitar a realização de medidas eficazes a tempo de se obter um melhor prognóstico. (Croti et al., 2005).

A classificação da atresia pulmonar com CIV mais utilizada é a de Barbero-Marcial, que divide em três grupos: A, B e C. O grupo A corresponde ao suprimento de todos os segmentos pulmonares serem realizados exclusivamente pelas artérias pulmonares centrais. O B apenas alguns segmentos supridos pelas centrais e os outros segmentos pelas artérias colaterais sistêmicopulmonares. Já o grupo C possui todos os segmentos pulmonares supridos exclusivamente pelas artérias colaterais sistêmico-pulmonares (Croti et al., 2005).

É importante ressaltar que os pacientes portadores de AP possuem ecocardiograma com achados semelhantes da TOF, como o cavalgamento da

valva aórtica sobre o septo trabecular, desvio ântero-superior do septo infundibular e o aumento do calibre da aorta ascendente. Dessa forma, se diferenciam pela presença de uma via de saída do ventrículo direito fechada, sem fluxo anterógrado e sem a detecção de uma valva pulmonar (Zielinsky, 1997).

O TA, ou tronco arterial comum, é uma malformação cardíaca congênita rara, com incidência de 6-10 casos por 100000 e mais frequente no sexo masculino. É caracterizada por apenas uma artéria que emerge do coração, sendo responsável pela circulação sistêmica, pulmonar e coronariana. Outros achados são comuns e incluem o DSV e anormalidades do arco aórtico. Ocorre em 5-10% dos pacientes com a SD 22q11.2 (Croti et al., 2005; Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Gennery, 2012; Mendes S et al., 2015; McDonald-McGinn, 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

Essa malformação cardíaca apresenta variações na sua forma de apresentação quanto à origem do tronco pulmonar, o que em 1949 gerou uma primeira classificação por Collett & Edwards, seguida pela de Van Praagh em 1965.

O TA pode ser classificado em 4 tipos conforme o local de origem da artéria pulmonar. No tipo I a artéria pulmonar principal nasce do tronco e, a seguir, se divide em artérias pulmonares direita e esquerda. No tipo II as artérias pulmonares direita e esquerda nascem separadamente (mas uma adjacente a outra) da face posterior do tronco. Já no tipo III as artérias pulmonares direita e esquerda nascem da face lateral da raiz do tronco

razoavelmente separadas uma da outra e o tipo IV, ambas as artérias pulmonares são irrigadas por vasos colaterais da parte descendente da aorta, sendo reclassificado como TOF com AP (Mendes S et al., 2015; Unolt et al., 2018).

A IAA é uma CC rara, com incidência de três casos para cada milhão de nascidos vivo, representa 1,3% das CC graves e presente em 5 a 20% dos pacientes com a deleção 22q11.2 (Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Gennery, 2012; Mendes S et al., 2015; McDonald-McGinn, 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019). Caracteriza-se por uma ausência total de continuidade anatômica entre o arco aórtico transverso e a aorta torácica descendente. Por vezes pode ser difícil distinguir entre interrupção e coarctação severa. O local mais frequente de interrupção é entre a artéria subclávia esquerda e a carótida comum esquerda. Cursa com mortalidade de 75% aos 10 dias e de 90% aos 12 meses de vida e eventualmente não está associada a outras anomalias, como PCA, valva aórtica bivalvular, estenose subaórtica, TA comunis e TGA (Irwin et al., 1991; Bove et al., 1993; Unolt et al., 2018).

Os três locais de interrupção foram designados Tipos A, B, e C por Celoria e Patton em 1959. No Tipo A, a interrupção pode ser encontrada no istmo; no Tipo B, entre a artéria carótida comum esquerda e a subclávia esquerda e no Tipo C entre o tronco braquicefálico e a artéria carótida comum esquerda. Um canal arterial patente está usualmente presente para permitir o fluxo distalmente ao local da interrupção e para os membros inferiores.

Qualquer dos tipos de interrupção podem ser encontrados com origem aberrante, ou isolamento, de uma artéria subclávia, porém isto é extremamente raro. A interrupção entre a artéria carótida comum esquerda e a artéria subclávia esquerda (Tipo B) é a mais frequentemente associada com a SD22q11.2. (Momma, 2007; Rosa et al., 2011; McDonald-McGinn, 2018; Sullivan, 2019). Interrupção no istmo (Tipo A) é menos comum, mas está, frequentemente, mais associada à janela aortopulmonar. A terceira forma, interrupção entre as artérias carótidas (Tipo C), é rara (Moller & Edwards, 1965; Van Mierop & Kutsche, 1984; Kuo et al., 2018; Unolt et al., 2018).

1.2 Aspectos gerais da SD22q11.2

Estudos realizados na Europa e nos Estados Unidos demonstram que a SD22q11.2 ocorre em aproximadamente 1:2000-6000 nascidos vivos, embora a frequência real possa ser maior. (Kobrynski & Sullivan, 2007; Gennery, 2012; Kuo et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019). É importante destacar que dados precisos sobre sua incidência em nosso país ainda não estão bem estabelecidos, pois nem todos os RN com suspeita clínica da deleção 22q11.2 fazem teste de triagem para a síndrome. Considerando-se que em nosso país nascem 2,8 milhões de crianças/ano, estima-se cerca de 480 a 725 novos casos da SD22q11.2 por ano (DATASUS, 2011; Kruszka et al., 2017; Palmer et al., 2018).

A microdeleção no braço longo do cromossomo 22, localizada em 22q11.2, não é detectada pelo cariótipo por bandeamento G, o exame

citogenético da rotina laboratorial, sendo somente possível de ser diagnosticada quando aplicamos outras técnicas moleculares como a FISH (hibridação *in situ* por fluorescência), a técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ou ainda mais recentemente utilizando cariotipagem por “arrays” (Miller et al., 2010; Costain et al., 2016; Kruszka et al., 2017; Kuo et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Mutlu et al., 2018; Palmer et al., 2018).

Como a SD22q11.2 apresenta uma grande variabilidade fenotípica, muitas vezes o diagnóstico clínico pode ser difícil, tornando imprescindível realizar a triagem para a sua detecção precoce, no primeiro ano de vida, baseando-se em um conjunto de características clínicas e laboratoriais (Grassi et al., 2014; Kruszka et al., 2017; Mutlu et al., 2018; Palmer et al., 2018). Nessa faixa etária a morbimortalidade é elevada, principalmente pelo quadro de infecções de repetição decorrentes da aplasia ou hipoplasia tímica e pela CC complexa. O diagnóstico precoce é fundamental para melhorar a qualidade de vida dessas crianças.

O diagnóstico etiológico é importante para compreender a natureza da doença, estabelecer o prognóstico e iniciar o tratamento, possibilitando a inclusão dos pacientes na sociedade e minimizado o custo financeiro da doença.

No Brasil não há estudos sobre a pesquisa da microdeleção 22q11.2 pela técnica de MLPA em pacientes portadores de CC, com até um ano de vida, internados em Centro de Terapia Intensivo (CTI) Neonatal ou Cardiológico (Quadro 1). Nessa faixa etária o fenótipo nem sempre é tão

evidente, sendo fundamental o diagnóstico precoce da SD22q11.2, para a realização do acompanhamento multidisciplinar, do aconselhamento genético e da identificação de outras anomalias que podem estar associadas (Grassi et al., 2014).

Quadro 1 – Estudos sobre a detecção da deleção 22q11.2 no Brasil

Trabalhos	Idade	Técnica utilizada	N	SD22q11 (%)
Gioli et al., 2008	5-16a	PCR-RFLP	123	8 (6,5)
Rosa et al., 2008	1d-13a	FISH	207	4 (2)
Belanger et al., 2009	1d-28a11m	FISH	29	7 (25)
Koshiyama et al., 2009	1d-16a	FISH	30	3 (10)
Rosa et al., 2011	1d-10a	FISH	66	2 (3,1)
Monteiro et al., 2013	10d-33a	MLPA	194	45 (23,2)
Vieira et al., 2013	1m-33a	FISH/ MLPA	100	35 (35)
Huber et al., 2014	14d-66a	PCR-RFLPQ/ MLPA	392	5 (1,27)
Campos et al., 2015	2d-10a	MLPA	39	1 (2,5)
Sgardioli et al. 2015	-	FISH/ MLPA	109	30 (27,5)
Monteiro et al., 2017	2m-19a	MLPA/ SNP-array	47	4 (8,5)

*N: Número de pacientes analisados; D: Dias; M: Meses; A: Anos

1.3 Histórico

Em 1955, a foniatra Sediácková, descreveu na Eslováquia, um caso no qual havia associação do encurtamento do palato, hipernasalidade de fala, dismorfismo facial, hipertelorismo, base nasal alargada, lábio superior fino e anomalia dental. Essas características também foram relatadas em 1968 por Robert Strong, cardiologista pediátrico, que descreveu uma família na qual a mãe e seus três filhos apresentavam arco aórtico à direita, dismorfismo facial e déficit cognitivo.

A descrição original da Síndrome de DiGeorge (SDG) derivou de uma discussão publicada em um encontro de imunologia (Cooper et al., 1965) e apenas três anos mais tarde, o endocrinologista Ângelo DiGeorge, em 1968, publicou uma descrição formal sobre o relato de três crianças com “deficiência imune letal de células T”, associada à hipoplasia das paratireoides. Na ocasião, atribuiu esses achados a uma anormalidade do desenvolvimento do terceiro e quartos arcos branquiais e, nos casos subsequentes, notou uma associação com anomalias do arco aórtico. Além destas manifestações clínicas clássicas, alterações dentárias, renais, oftalmológicas, distúrbios de comportamento e atraso no desenvolvimento da fala podem estar presentes nos pacientes com a SDG. A etiologia é variada podendo ocorrer também em associação com diabetes materno e uso de álcool durante a gestação. (Greenberg et al., 1988; Driscoll et al., 1992). Em mais de 90% dos casos de SDG detectou-se a deleção do cromossomo 22q11.2, sendo que os principais genes envolvidos são: *UFD1L*, *TBX1*, *RALD2*, *COMT* que participam no desenvolvimento dos órgãos acometidos (Merscher et al., 2001).

No ano seguinte, Cayler descreveu uma série de indivíduos com anomalias cardíacas conotruncais e face assimétrica ao choro, enquanto Kinouchi et al. relataram, no Japão, em 1976, uma síndrome caracterizada por CC e aparência facial atípica à qual denominaram “Síndrome da anomalia facial conotruncal”.

Em 1978, Shprintzen et al. descreveram a Síndrome Velocardiofacial (SVCF) em 12 indivíduos, caracterizada pela presença de anomalias no palato (velo), defeitos congênitos cardiovasculares (cardio) e dismorfismo facial leve

(facial). Os outros sinais relatados foram a microcefalia, atraso mental, mão com dedos finos e alongados, anomalias menores de orelha, hérnia inguinal ou umbilical, escoliose e sequência de Pierre-Robin. A síndrome também ficou conhecida como “Síndrome de Shprintzen” (Shprintzen et al., 1978; Shprintzen et al., 1981; Shprintzen et al., 1985; Linpson et al., 1991; Robin & Shprintzen, 2005).

Em 1981, de la Chapelle et al., descreveram a SDG em quatro membros de uma família com translocações entre o cromossomo 20 e o 22. A partir dessas observações sugeriram que a SDG poderia ser causada por uma deleção no cromossomo 22 ou por uma duplicação parcial do braço curto do cromossomo 20.

No ano seguinte, a hipótese de que a SDG poderia resultar de uma monossomia de 22q11 foi confirmada por Kelley et al. (1982) em três pacientes com translocações envolvendo 22q11. Greenberg et al. (1984) usando bandeamento G observaram a existência de monossomia parcial causada por uma translocação não equilibrada entre o cromossomo 4 e o cromossomo 22 em uma criança de 2 meses de idade com características de SDG. A mãe, assintomática, mostrava uma deficiência parcial de células T e a mesma translocação com deleção de 22q11.

Em 1986, Lammer e Opitz sugeriram que a SDG deveria ser heterogênea do ponto de vista etiológico. Essa heterogeneidade é discutida pelos autores baseada em achados que indicam uma população de células da crista neural cefálica como a unidade dismorfogeneticamente responsável pelo fenótipo na SDG. Entretanto, para entender a base genética da SDG

seria necessário caracterizar os genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação de estruturas derivadas dessas células.

Greenberg et al. (1988) fizeram análise de alta resolução em 27 de 28 pacientes com características de SDG e verificaram que em 18% (cinco pacientes) existiam anomalias cromossômicas e em 81% (22 pacientes) o cariótipo era normal. A anomalia cromossômica encontrada nos cinco pacientes foi uma monossomia, em três pacientes era em 22q11, em outro era em 10p13 e no último em 18q21.33. A monossomia de 22q11 nos três pacientes foi causada por diferentes fatores. Em um, havia uma deleção intersticial em 22q11, em outro, encontraram uma translocação entre 4q e 22q e no último, a monossomia era decorrente de uma translocação entre 20q e 22q.

Wilson et al. (1992) realizaram bandeamento de alta resolução em 30 casos de SDG e observaram nove casos de deleção intersticial em 22q11. Todos os outros casos eram aparentemente normais. No mesmo ano, Lai et al. também descreveram características da SDG em pacientes com deleção 10p sem nenhuma associação com alterações na região 22q11.

O uso de análises moleculares e FISH com sondas específicas revelaram deleções de 22q11 em 21 de 22 casos com cariótipos normais, em contraste com estudo realizado usando análise citogenética convencional em 16 pacientes que revelou apenas seis casos de deleção em 22q11 (Carey et al., 1992). Ainda em 1992, Driscoll et al. (1992) fizeram análises clínica, citogenética e molecular em 14 pacientes com SDG. O bandeamento de alta resolução foi capaz de detectar deleção intersticial em 22q11 em cinco

pacientes, dando um resultado inconclusivo para três e negativo, ou seja, cariótipo normal para os seis restantes. Em contraste ao bandejamento de alta resolução, a análise molecular da mesma região detectou deleções em todos os 14 pacientes estudados.

Wilson et al. (1993) sugeriram o acrônimo CATCH22 (conotruncal heart defect, abnormal face, T-cell deficiency, clefting, e hypocalcemia, decorrentes de uma anormalidade no cromossomo 22), termo que não foi bem aceito. Posteriormente, Basset et al. (1998) sugeriram o termo Síndrome de Deleção 22q11, utilizado até o presente momento.

Estes resultados sugeriam que os estudos de Greenberg et al. (1988), Monaco et al. (1991) e Lai et al. (1992) não poderiam ser considerados conclusivos, já que somente foram utilizadas técnicas de bandejamento G e de alta resolução. A conclusão foi que a microdeleção existia nos pacientes por eles estudados, mas não pôde ser detectada pelas técnicas utilizadas por ser muito pequena. E acreditou-se que a SDG só poderia ser causada por uma deleção no cromossomo 22 até outros autores como Schuffenhauer et al. (1995), Lipson et al. (1996), Kato et al. (1996) e Daw et al. (1996) provarem a ausência de microdeleções em 22q11 por técnicas moleculares em pacientes com quadro clínico de SDG.

Roberts et al. (1997) clonaram um gene de galinha (CHIRA) que se expressa durante o desenvolvimento embrionário na placa, no tubo e crista neural, no mesênquima da cabeça e em estruturas dos arcos branquiais. A próxima etapa foi produzir fenocópias da SDG pela disrupção no desenvolvimento da crista neural. Desse modo, genes que, como o CHIRA,

se expressam na crista neural e parecem estar relacionados ao desenvolvimento de estruturas derivadas, podem ser considerados genes candidatos para a etiologia da SDG e de outros quadros relacionados a deleções da região 22q11.2.

1.4 Epidemiologia

A SD22q11.2 engloba as síndromes de SDG, VCF e de anomalias faciais e conotruncais, consideradas atualmente como variações de um mesmo espectro clínico, com sobreposição de fenótipos e expressividade variável (Campbell et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Sullina, 2019).

Hoje se sabe que essa síndrome ocorre com frequência superior àquela previamente estimada na literatura. No Estado de São Paulo, onde nascem aproximadamente 600.000 crianças/ano, teríamos assim 150 casos novos anualmente, mas muito poucos casos são identificados e a maior parte dos afetados deixa de receber um acompanhamento clínico adequado. A sua frequência seria maior à da Fibrose Cística do Pâncreas e ao Hipotireoidismo congênito, defeitos que já podem ser detectados ao nascimento através dos programas de triagem neonatal, conhecidos em seu conjunto como “Teste do pezinho”.

Apesar do grande número de casos já estudados com a SD22q11.2, não se têm conseguido estabelecer relações claras entre o fenótipo clínico e o tamanho da deleção cromossômica. Tampouco se tem conseguido estabelecer relações entre o tamanho da deleção e o grau de acometimento do desenvolvimento do timo e, em consequência, com a gravidade da imunodeficiência dos pacientes com deleção 22q11.2. Achados clássicos da

SD22q11.2 têm sido descritos em pacientes com mutações no gene *TBX1* (codificado no local da deleção), assim como malformações equivalentes às desta doença tem sido observada em camundongos “knock-out” para esse gene (Moraes, 2005; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018).

1.5 Etiologia e fisiopatologia da SD22q11.2

As anomalias fenotípicas observadas na SD22q11.2 decorrem da alteração na migração das células da crista neural para as bolsas faríngeas a partir da 4ª semana do desenvolvimento embrionário, afetando diretamente a morfogênese dos grandes vasos do coração, timo, paratireoides, tireoide e estruturas craniofaciais. Encontra-se mais comumente afetada a formação da terceira e quartas bolsas, muito embora o distúrbio também possa envolver a primeira, a segunda e a sexta bolsa faríngea (Molesky, 2011; Gennery, 2012; McDonald-McGinn, 2018; Sullivan, 2019).

A deleção pode ter herança autossômica dominante, porém, na maioria dos casos ocorre uma mutação de *novo*. A chance de herdar esta deleção de um progenitor varia de 8 a 28%. Portadores da deleção 22q11.2 apresentam risco de 50% de transmitirem a seus filhos. Os descendentes são afetados com maior gravidade, sendo fundamental o aconselhamento genético (Molesky, 2011; Gennery, 2012; Gao & Amendt, 2013; Costain et al., 2016; Cohen et al., 2018; Morrow et al., 2018; Mutlu et al., 2018).

Em casos mais raros, alterações genômicas no braço curto do cromossomo 10, na região 10p13, levam à alteração fenotípica semelhante à SD22q11.2, assim os pacientes podem apresentar malformações cardíacas,

alterações imunológicas, hipoparatireoidismo e déficit intelectual (Lindstran et al. 2010, Morrow et al., 2018).

É importante destacar que nenhuma relação entre o tamanho da deleção e o fenótipo foi encontrada uma vez que deleções maiores (3Mb) não acarretam necessariamente fenótipos mais graves, nem deleções menores (1,5 Mb ou menos) estão associadas a um fenótipo mais discreto (Miller et al., 2010; Cohen et al., 2018; Morrow et al., 2018; Mutlu et al., 2018).

Vale ressaltar que as características da SD22Q11.2 têm sido descritas em crianças com evidência clínica de Síndrome Alcoólica Fetal. Amman et al. (1982) estudaram quatro crianças, filhas de mães alcoólatras, que apresentavam imunodeficiência e hipocalcemia com níveis baixos de paratormônio. Além disso, todas apresentavam lesões cardiovasculares idênticas às que ocorrem nessa síndrome, e duas delas tinham ausência de timo. Os autores sugerem que o álcool pode ter interrompido a migração de células da crista neural.

1.5.1 A microdeleção no cromossomo 22

Scambler et al. (1992), realizaram o primeiro relato da presença da microdeleção do cromossomo 22 na região q11.2 e vários outros relatos seguiram a este, confirmando a deleção pela técnica de FISH (Swillen et al., 1998; Kates et al., 2004).

A maior disponibilidade de testes genéticos e o crescente conhecimento sobre as síndromes genéticas têm aumentado o número de casos descritos, levando a uma ampliação do espectro clínico, permitindo,

dessa forma, o diagnóstico em pacientes com manifestações não clássicas (Silva et.al.,2010; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018).

Embora o cromossomo 22 represente apenas 2% do genoma haplóide humano, rearranjos envolvendo o cromossomo 22 estão associados tanto com alterações constitucionais do desenvolvimento, quanto com múltiplas desordens malignas como leucemia linfocítica aguda, mieloma múltiplo e linfoma. A maioria destes rearranjos envolvem a região 22q11.2 o que sugere uma maior instabilidade estrutural desta região (Shaikh et al., 2000).

A identificação de sequências de DNA repetidas em poucas cópias no cromossomo 22, denominadas de LCRs (*Low Copy Repeats*), levou a suspeita de que estas regiões poderiam ser responsáveis pela instabilidade de 22q11. Assim, o braço longo do cromossomo 22 tem um arranjo peculiar que predispõe a região do 22q11.2 para sofrer essas deleções com tamanho 3 ou 1,5 Mb (Edelmann et al., 2012; Campbell et al., 2018; Cohen et al., 2018; Kuo et al. 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Unol et al., 2018; Sullivan, 2019).

As LCRs são constituídas por grandes sequências idênticas e fornecem substrato para a recombinação homóloga. São também chamadas de duplicações segmentais (SD, *Segmental Duplications*) ou *duplicons*, consistindo de blocos de DNA de aproximadamente 10-400 kb com mais de 97% de identidade, que se originam por duplicações de segmentos genômicos resultando em regiões parálogas, e compreendem de 5% a 10% do genoma. Estão localizadas próximas, mas não adjacentes umas às outras, e geralmente são separadas por menos do que 10 Mb de sequência única

(Shaw & Lupski, 2004; Campbell et al., 2018; Kuo et al. 2018; McDonald-McGinn, 2018; Unol et al., 2018; Sullivan, 2019).

Devido à alta similaridade, as LCRs se alinham durante a divisão celular meiótica ou mitótica, e esse alinhamento pode ocorrer entre cromossomos distintos, homólogos ou não, ou entre diferentes loci de um mesmo cromossomo. Quando as LCRs estão localizadas em um mesmo cromossomo nós temos deleções, duplicações e inversões. Já quando as LCRs estão localizadas em cromossomos diferentes nós vamos ter o que chamamos de translocações. (Lupski, 2003; Lupski, 2004; McDonald-McGinn, 2018; Sullivan, 2019).

A deleção é causada por um evento de recombinação homóloga durante o primeiro estágio da prófase da meiose, na maioria das vezes secundário a um erro de pareamento das sequências de DNA entre dois cromossomos 22, de forma que a LCR proximal de um deles reconhece a distal do outro. Como os cromossomos estão próximos e alinhados ocorre um crossing-over desigual, fazendo com que um dos cromossomos 22 sofra uma deleção e o outro receba o material cromossômico extra (Shillen et al., 2000; Kobrynski & Sullivan, 2007; Sandri, 2011; Kuo et al. 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Unol et al., 2018; Sullivan, 2019).

Na região 22q11.2, oito grupos de LCRs foram identificadas e são chamadas de LCR22 A até H. Estas LCRs estão flanqueando ou dentro da região de microdeleção. São quatro LCR22s centroméricas (LCR22 A- D) que estão relacionadas com microdeleção recíproca e a SD22q11.2. Em

contrapartida, as LCR22s teloméricas, denominadas de LCR22s D - H, localizadas na porção distal da região 22q11.2, foram relacionadas com microdeleções distal e microduplicações recíprocas (Shaikh et al., 2001; Mikhail et al., 2014; Campbell et al., 2018; Cohen et al., 2018; Kuo et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Unol et al., 2018; Sullivan, 2019).

Os estudos citogenéticos e moleculares evidenciam que as deleções mais frequentes nos pacientes com SD22q11.2 (85-90%) possuem tamanho aproximado de 3,0 Mb, conhecida como a região tipicamente deletada (*typically deleted region*, TDR) que se estende da LCR22s A – D, onde engloba mais de 60 genes, entre os quais incluem-se o UFD1L (*Ubiquitin Fusion Degradation 1-like*), o TBX1 (*T-box Fator de Transcrição 1*) e o HIRA/TUPLE 1 (*HIR Histone Cell Cycle Regulation Defective*), expressos nas células derivadas da crista neural e possíveis responsáveis pelos achados clínicos observados nesses pacientes (Figura 1) (Driscoll et al., 1992; Merscher et al., 2001; Belangero et al., 2009; Campbell et al., 2018; Cohen et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Sullivan, 2019).

Já as deleções menores, com 1,5 Mb aparecem com uma frequência um pouco menor (7-8%) incluindo cerca de aproximadamente 28 genes, flanqueadas pelas LCRS22 A- B. Deleções atípicas menores na mesma região em 22q11.2, também têm sido descritas na literatura dificultando a associação genótipo-fenótipo (Figura 1) (Shaikh et al., 2001, Michaelovsky et al., 2012, Parker et al., 2015; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Unol et al., 2018; Sullivan, 2019).

Em um estudo feito por Rump et al., 2014, propôs chamar de Deleção Central 22q11.2 as deleções localizadas entre as LCR22 B- D, denominadas na literatura de deleções 22q11.2 atípicas ou distal. A identificação dessas deleções centrais é relevante não apenas para o aumento das taxas de diagnóstico, mas para a identificação de genes específicos que poderiam estar envolvidos em diferentes fenótipos da SD22q11.2. Alguns estudos têm indicado que a deleção do gene CRKL (*V-crk avian Sarcoma Vírus CT10 Oncogene Homolog-like*) localizado dentro da região central 22q11.2 pode causar as características fenotípicas da síndrome da deleção 22q11.2 (Guris et al., 2001; Moon et al., 2006, Stachon et al., 2007; Morrow et al., 2018).

Figura 1 - Representação esquemática da deleção 22q11.2

1.5.1.1 O gene TBX1 na patogênese da SD22q11.2

O principal gene candidato para a modulação dos fenótipos de pacientes com duplicações e deleções é o TBX1, responsável pela formação da crista neural. Em estudos com modelo animal, a haploinsuficiência do gene TBX1, pode levar a alterações faciais, hipoplasia do timo e paratiroide,

alterações imunológicas e alterações cardíacas. Esse gene é expresso no mesoderma cerebral em desenvolvimento e no esclerotoma que dá origem a várias estruturas da coluna espinal. O seu padrão de expressão é importante para a compreensão dos fenótipos extra arcos braquiais (Mahadevan et al., 2004; Kuo et al., 2018; Campbell et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Sullivan, 2019).

O gene *TBX1* (Figura 2), localizado na região 22q11.2, é membro de uma família de genes filogeneticamente conservada que possui um domínio de ligação ao DNA, denominado T-BOX (Chieffo et al., 1997).

Figura 2 - Localização cromossômica do gene *TBX1*

O desenvolvimento dos músculos branquiais é gravemente afetado em camundongos mutantes *TBX1*. Na ausência desse gene, a ativação dos genes de determinação miogênica *MYF5* e *MYOD* é alterada no mesoderma faríngeo. Assim, sugeriu-se que a redução dos níveis de expressão do gene

TBX1 poderia contribuir para a hipotonia faríngea presente em indivíduos com deleção 22q11.2 (Kelly et al., 2004).

Os achados de Yagi et al. (2003) indicam que mutações no gene TBX1 são responsáveis por cinco características fenotípicas principais da SD22q11.2: dismorfismos faciais, defeitos cardíacos, hipoplasia tímica, insuficiência velofaríngea com fissura de palato e disfunção na glândula paratireoide com hipocalcemia.

O gene TBX1 é um gene dose-dependente e a dose pode ser afetada por modificadores genéticos e ambientais (Garg et al., 2001; Zhang et al., 2006). Estudos apontam que o padrão de expressão do fator de crescimento de fibroblasto 8, o gene FGF8, é alterado em mutantes TBX1^{-/-} e sua expressão é abolida no endoderma faríngeo (Vitelli et al., 2006).

Hu et al em 2004 relataram que o gene FGF8 é ativado pelo gene TBX1 durante sua expressão no trato cardíaco. Além disso, existem evidências que mostram a associação de alterações no gene FGF8 ao fenótipo da SD22q11.2 em humanos, baseado em modelos animais (Frank et al., 2002).

O gene FGF8 pertence à família dos fatores de crescimento de fibroblastos, a qual desempenha um papel importante no desenvolvimento geral do embrião e no desenvolvimento de tipos celulares específicos, destacando a função de sinalizadores intracelulares (Cohn et al., 1995; Morrow et al., 2018). O estudo realizado por Bobick et al. (2007) demonstrou que os fatores 8, 4 e 2 possuem tanto um efeito estimulatório como inibitório na diferenciação das células dos membros em formação, do processo frontonasal e do arco mandibular.

Há relatos de que possivelmente há interação genética entre o TBX1 e o FGF8 na formação dos arcos aórticos evidenciando a participação dos mesmos na TOF, enquanto outros alegam que o gene FGF8 está relacionado apenas a formação cardíaca (Aggarwal et al., 2008).

1.5.1.2 O gene COMT na patogênese da SD22q11.2

Dentre os genes presentes na região 22q11.2, o gene COMT é um dos mais estudados e, em particular, o seu polimorfismo funcional Val158Met. Esse gene tem um importante papel, pois é responsável por degradar as catecolaminas, incluindo dopamina e epinefrina, dois neurotransmissores de extrema importância para as funções neurológicas. Na deleção de uma cópia do gene COMT ou em situações de polimorfismo, a doença psiquiátrica está presente e com uma gravidade maior (McDonald-Mc-McGinn et al., 2006; Campbell et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018).

A perda de uma cópia do gene COMT conduz a regulação anormal dos níveis de catecol-O-metiltransferase no cérebro, e alguns pesquisadores acreditam que mudanças envolvendo essa enzima pode ajudar a explicar o aumento do risco de problemas comportamentais e doenças mentais associadas à SD22q11.2. Portanto o gene COMT é um candidato para diversos fenótipos neurológicos dessa síndrome. A desregulação de importantes genes de desenvolvimento pode resultar em diferentes fenótipos (McDonald-Mc-McGinn et al., 2006; Morrow et al., 2018).

1.5.1.3 O gene UFD1L na patogênese da SD22q11.2

O gene UFD1L, localizado no meio da região 22q11.2, codifica uma proteína envolvida em uma via metabólica da degradação de proteínas ubiquitina-dependentes (Kunte et al., 2001). O gene apresenta 12 éxons e o promotor está localizado a 463 pares de base *upstream* da primeira base do códon de iniciação, sendo que, especificamente, a região de -198 a - 463 pares de base é responsável pela maior parte da atividade (Amati et al., 2002). Apesar do gene UFD1L não ter uma função claramente definida, diferentes linhas de evidências indicam que ele parece estar envolvido tanto na SD22q11.2 quanto na esquizofrenia (Campbell et al., 2018).

Esse gene é expresso a partir da décima semana gestacional e continua a ser transcrito durante o período fetal e pós-natal (Novelli et al., 1998). Yamagishi et al. observaram que o gene UFD1L estava deletado em todos os 182 pacientes estudados com a SD22q11.2.

Mohamed et al. (2005) encontraram associação entre a válvula aórtica bicúspide, uma malformação cardíaca congênita relativamente comum, e reduções na expressão do gene UFD1L.

1.5.1.4. Outros genes envolvidos na patogênese da SD22q11.2

A haploinsuficiência do produto do gene HIRA/TUPLE 1 localizado no final proximal da região tipicamente deletada da SD22q11, leva ao acúmulo de proteínas e afeta o desenvolvimento das células da crista neural craniana, do coração e apoptose de timócitos imaturos. A sua deleção pode causar IAA, fissura de palato, displasia do timo e outras anomalias craniofaciais (Lee et al., 2009; Sandri, 2011; Morrow et al., 2018).

O gene CRKL também tem sido relacionado aos mecanismos moleculares subjacentes à SD22q11.2. Esse gene já foi mapeado na metade distal da região típica deletada, mas é altamente abundante na região da faringe, tecido neurais e derivados da crista neural (Guris et al., 2001) sugerindo que a deleção deste gene pode ser responsável por alguns casos com deleções mais distais que não envolvem gene TBX1 (Garciamiñaur et al. 2002; Morrow et al., 2018). A haploinsuficiência do CRKL pode contribuir para os defeitos cardíacos e fenótipos presentes na deleção típica de 3Mb assim como nas deleções atípicas (Ogilvie et al., 2009; Breckpot et al., 2012).

O MAPK 1 é mapeado distalmente a partir da LCR22– D. A presença de anomalias craniofacial e cardíaca são observados em pacientes com deleções distal 22q11 e são atribuídas a deficiência da sinalização do MAPK1 na crista neural (Newbern et al., 2008; Morrow et al., 2018).

O gene PIK4CA, quando deletado nos pacientes com SD22q11.2, pode ser associado ao quadro de esquizofrenia, uma vez que mutações nesse gene pode interromper a via de mielina e alterar a sua integridade, aumentando o risco de desenvolvimento da esquizofrenia (Parker, et al., 2015; Cohen et al., 2018; Morrow et al., 2018).

1.6 Caracterização clínica da SD22q11.2

As principais manifestações clínicas e laboratoriais para o diagnóstico da SD22q11.2 são os defeitos cardíacos conotrunciais (74-80%), deficiência imunológica leve a moderada devido à hipoplasia tímica (80%), anomalias palatais (69-100%), hipocalcemia secundária à aplasia ou hipoplasia das glândulas paratireoides (49%-60%), dismorfismos craniofaciais mais

evidentes com o crescimento, insuficiência velofaríngea com voz anasalada (27-92%), atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (75%) e da fala (79-84%). As anormalidades gênito-urinárias (estenose de válvula da uretra posterior, hidronefrose, agenesia renal, rim único, displasia renal multicística e acidose tubular renal) (36-37%), esqueléticas (17-19%) e oculares (embriotoxon posterior e tortuosidade dos vasos retinianos) (7-70%) também podem estar presentes. É relatado com uma menor frequência a fenda palatina submucosa (5-16%), fenda palatina (9-11%), refluxo gastroesofágico e úvula bífida (5%), deficiência do hormônio de crescimento (4%), atraso da erupção dentária (2,5%), atrofia cerebral (1%) e hipoplasia cerebelar (0,4%). A presença de fístula traqueoesofágica, laringomalácia, traqueomalácia ou broncomalácia pode ser observada e em alguns casos podem necessitar de traqueostomia (Matsuoka et al., 1998; McDonald-McGinn et al., 1999; Goldmuntz, 2005; Karayiorgou et al., 2010; Maggadottir & Sullivan, 2013; Cirillo et al. 2014; Campbell et al., 2018; Cohen et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Sullivan, 2019).

Os dismorfismos craniofaciais incluem hipertelorismo, pálpebras “encapuçadas” (parcialmente cobertas por pele quando os olhos estão abertos devido à configuração da estrutura óssea), fissuras palpebrais curtas, inclinação anti-mongólica dos olhos, nariz tubular, ponta do nariz bulbosa com hipoplasia alar e micrognatia. Outras alterações fenotípicas são relatadas, tais como achatamento/hipoplasia malar, boca pequena, arcada palatina elevada, retrognatia, alterações dos lóbulos com hiperdobramento, baixa implantação das orelhas e hipoacusia. Essas alterações fenotípicas são difíceis de serem

reconhecidas no período neonatal, a fâcie característica pode nem sempre estar presente, e o dismorfismo pode às vezes ser sutil. As mudanças fenotípicas associadas ao crescimento são bem conhecidas, sendo que a aparência facial tende a ficar mais distinta com a idade (McDonald-McGinn et al., 1999; Fomin et al., 2010; Maggadottir & Sullivan, 2013; Cirillo et al., 2014; Grassi et al., 2014; Campbell et al., 2018; Mutlu et al., 2018; Sullivan, 2019).

Os defeitos conotruncais, constituem importante característica presente na SD22q11.2, destacando-se a TOF, AP/CIV, TGA, TA tipo I e IAA tipo B (Goldmuntz, 2005; Kobrynski & Sullivan, 2007; Fomin et al., 2010; Gennery, 2012; Zhang et al., 2015; Campbell et al., 2018; Cohen et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Sullivan, 2019).

Na literatura, atualmente é recomendado que em todos os RN ou crianças com essas cardiopatias descritas acima e defeito perimembranoso do septo ventricular com anomalia do arco aórtico sejam realizados os testes moleculares para a deleção do cromossomo 22q11.2 (McDonald-McGinn et al., 1999; Goldmuntz, 2005; Ziolkowska et al., 2008; Rosa et al., 2011; Monteiro et al., 2013; Kuo et al., 2018; Unolt et al., 2018).

Nos pacientes com defeito perimembranoso do septo ventricular sem a anomalia do arco aórtico, mas com qualquer outra característica da SD22q11.2 também deverá ser realizado a MLPA. Em pacientes com outros tipos de CC e com manifestações fenotípicas características, deve-se levantar a suspeita clínica da SD22q11.2 e tornar-se uma indicação para a realização da triagem genômica quantitativa por MLPA. É importante destacar que nesses casos a pesquisa da deleção somente será realizada se houver

suspeita de que o paciente possa ser portador da síndrome (McDonald-McGinn et al., 1999; Goldmuntz, 2005; Ziolkowska et al., 2008; Rosa et al., 2011; Monteiro et al., 2013; Kuo et al., 2018).

As alterações imunológicas da SD22q11.2 são variáveis e decorrentes da hipoplasia ou agenesia do timo, classicamente denominados como SDG pelos imunologistas. Aproximadamente 80% dos pacientes com a SD 22q11.2 têm alterações no sistema imunológico. Contudo, a grande maioria apresenta imunodeficiência leve a moderada, independentemente das outras características clínicas. A maioria dos pacientes com a SDG tem hipoplasia tímica, com número baixo de células T, porém a função imune não é gravemente comprometida. A chamada forma parcial da doença caracteriza-se pela diminuição leve ou moderada do número de células T circulantes e pode cursar com infecções de vias aéreas superiores, otites médias, sinusites e pneumonias. Em 1% dos casos ocorre a forma total, com agenesia do timo, e os pacientes apresentam um quadro de imunodeficiência combinada grave, sendo o índice de mortalidade elevado e geralmente evoluem para o óbito até o segundo ano de vida. Nesses casos é indicado o transplante do timo (Sullivan, 2002; Belanger et al., 2009; Gennery, 2012; Market et al., 2010; Campbell et al., 2018; Crowley et al., 2018; Kuo et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Sullivan, 2019).

Inicialmente a SD22q11.2 foi classicamente associada com uma imunodeficiência mediada por células, no entanto, a recorrência e a gravidade das infecções, nem sempre estão correlacionadas com o número de linfócitos T, existindo evidências atuais que a deficiência funcional do linfócito B e a

hipogamaglobulinemia podem estar associadas a infecções mais graves descritas nessa síndrome (Patel et al., 2012; Kuo et al., 2018; Sullivan, 2019). Na literatura há relatos de imunodeficiência comum variável, deficiência de IgA, deficiência de IgM e diminuição da resposta vacinal em pacientes com a SDG (Patel et al., 2012). O estudo realizado por esse autor demonstrou que os níveis baixos de imunoglobulinas estão presentes em uma minoria de pacientes e, em geral, entre 2% e 3% necessitaram da administração de imunoglobulina de reposição.

A hipoplasia ou aplasia da glândula paratireoide é muito comum na SD22q11.2, devido ao acometimento na embriogênese do terceiro e quartos arcos faríngeos. Em 49% a 60% dos recém-nascidos com a SD 22q11.2, a hipocalcemia transitória pode estar presente, causando tetania e convulsões de difícil controle (Ryan et al., 1997; Maggadottir & Sullivan, 2013; Campbell et al., 2018; Kuo et al., 2018; Mutlu et al., 2018; Rayannavar et al., 2018). Os pediatras e cardiologistas devem ficar atentos que a presença de hipocalcemia no período neonatal, sem outra causa fisiopatológica aparente é altamente sugestiva do diagnóstico da síndrome.

Algumas doenças e manifestações autoimunes como a artrite reumatóide juvenil, púrpura trombocitopênica, anemia hemolítica, neutropenia, hipotireoidismo, endocrinopatia, vitiligo e Fenômeno de Raynaud são mais frequentes nos pacientes com SD 22q11.2 que na população geral (Sullivan et al., 1997; Gennery et al., 2002; Tison et al., 2011; Morrow et al., 2018).

Em 9 a 50% dos portadores da SD22q11.2, podemos observar déficits cognitivos e comportamentais e um grande risco de desenvolver doenças psiquiátricas, sendo que a mais prevalente delas é a esquizofrenia. Pode-se observar que, durante a adolescência ou início da fase adulta, aproximadamente um terço dos portadores da deleção 22q11.2 desenvolvem esquizofrenia ou transtorno esquizoafetivo (Karayiorgou et al., 2010; Butcher et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018; Sullivan, 2019).

Os estudos epidemiológicos demonstram que o risco do paciente portador da deleção 22q11.2 em desenvolver esquizofrenia é de 25-31 vezes maior do que a população geral (0,3-1,6%) (Basset et al., 2000). Além disso, a frequência dessa microdeleção em portadores de esquizofrenia pode ser de 12-80 vezes maior que o da população geral (0,016%) (Karayiorgou & Gogos, 2004). Dessa forma, foi sugerido que a deleção 22q11.2 seria um verdadeiro subtipo genético da esquizofrenia (Tam et al., 2009; Butcher et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018; Tang et al., 2018; Sullivan, 2019).

A associação de genes presentes na região 22q11.2 com a esquizofrenia e seus endofenótipos tem sido demonstrada através de diversos estudos moleculares (Shifman et al., 2002; Shin et al., 2010). Dentre eles estão inclusos os genes UFD1L, DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) e ZDHHC8 C8 (*Zinc Finger DHHC Domain-Containing Protein 8*), que parecem ter um papel importante no neurodesenvolvimento e na

esquizofrenia (De Luca et al., 2001; Mukai et al., 2004; Xie et al., 2008; Ota et al., 2010; Morrow et al., 2018).

1.7 Diagnóstico clínico, molecular e laboratorial na SD22q11.2

A técnica de FISH permite a detecção de síndromes de microdeleção e microduplicação já descritas na literatura por meio da hibridação de sondas genômicas complementares para as regiões de interesse específicas, dessa forma, existe uma disponibilidade de sondas diferentes, como as sondas de sequências repetitivas, que são únicas para cada centrômero e usadas para identificar o número de cópias de cada cromossomo; as sondas coloridas para cromossomos inteiros, que são úteis para delinear translocações; as sondas de um único locus que são utilizadas para identificar deleções e duplicações; além das sondas para identificar as aneuploidias comuns (13, 18, 21, X e Y) e das sondas teloméricas para identificar as extremidades dos cromossomos; dentre outras. Sendo as sondas de sequência única, específicas para a região do braço longo do cromossomo 22, as sondas mais utilizadas na rotina diagnóstica para a detecção da deleção de 22q11.2 (Miller et al., 2010; Belanger et al., 2009; Kruszka et al., 2017; Kuo et al., 2018; Morrow et al., 2018; Palmer et al., 2018; Rayannavar et al., 2018).

Com o aprimoramento da citogenética molecular, especialmente o surgimento da técnica de MLPA, já é possível identificar alterações genômicas menores que 5 Mb. Descrita por Schouten et al. (2002), e posteriormente comercializada pela empresa holandesa MRC-Holland, essa técnica foi desenvolvida de forma a permitir a detecção do número de cópias genômicas

de região de interesse, diagnosticando anormalidades genéticas como aneuploidias, deleções e duplicações em um único ensaio. Esse método permite a triagem genômica quantitativa de sequência alvo-específicas, baseado na hibridação simultânea e amplificação por PCR de até 50 sondas diferentes em uma única reação (Dutra et al., 2012; Campbell et al., 2018; Kruszka et al., 2017; Morrow et al., 2018; Mutlu et al., 2018; Zhang et al., 2015).

Já foram desenvolvidos mais de 400 *kits* diferentes de MLPA (www.mlpa.com), cada um deles com uma combinação de sondas diferentes, com o objetivo de identificar alterações no número de cópias em regiões específicas do genoma ou até mesmo em genes específicos (Dutra et al., 2012). A análise de genes foi desenvolvida para o diagnóstico de inúmeras doenças genéticas, doenças neuromusculares, distrofia musculares, diagnóstico pré-natal, estudo de metilação, estudo de mutações somáticas e germinativas para câncer (MRC-Holland®; Stuppia et al., 2012).

Vale ressaltar que os *kits* de MLPA utilizados são direcionados para o diagnóstico de síndromes de microdeleções e microduplicações específicas, sejam elas intersticiais ou subteloméricas (MRC-Holland®). Esta é uma primeira limitação do método. Ele não é um instrumento de diagnóstico amplo, que faça uma cobertura global, como o cariótipo e o aCGH (*array Comparative Genomic Hybridization*) (South et al., 2013). Esses *kits* abrangem um número limitado de doenças, diante de um universo de milhares. Por outro lado, apresenta vantagens, permitindo a confirmação diagnóstica, de forma econômica, de síndromes mais conhecidas, suspeitadas pelos respectivos

fenótipos. Quando há suspeita, bem estabelecida, de uma síndrome coberta pelo método, por exemplo, de SD22q11.2, não se justifica, do ponto de vista econômico a sua confirmação por um método muito mais dispendioso e complexo, como o aCGH.

Segundo Nevado et al. (2014), o espectro de síndromes coberto pelo MLPA inclui algumas doenças menos raras, com fenótipos relativamente bem estabelecidos, mas com uma expressividade muito variável. Isso dificulta a suspeita clínica das mesmas. Inclui também síndromes raras que, embora reportadas, contam com apenas dezenas de casos descritos e não têm ainda um fenótipo bem definido na literatura, pois os mesmos são estabelecidos com poucos casos descritos, sendo difícil para o médico geneticista incluí-la entre suas hipóteses diagnósticas.

É importante destacar, que atualmente é uma técnica amplamente utilizada em laboratórios ao redor do mundo, considerada uma alternativa mais sensível, econômica, rápida e simples, do que as técnicas de análise de marcadores polimórficos ou FISH, também utilizados para triagem de microdeleções (Dutra et al., 2012). Uma das principais vantagens da técnica de MLPA é a possibilidade de detectar, em apenas um exame, diferentes causas de alterações patogênicas de diferentes síndromes de microdeleções e microduplicações (Stuppia et al., 2012; Jehee et al., 2011). Isso é válido, tanto para pacientes com uma suspeita clínica passível de diagnóstico molecular por aquele método, quanto para casos em que não há uma suspeita específica. Além disso, do ponto de vista técnico, é um teste consideravelmente menos complexo comparado a outros como o aCGH.

Palomares et al. e Vorstman et al. em 2006, em estudos comparativos, utilizando as técnicas de FISH e MLPA, constataram concordância significativa entre os resultados de ambas, mas observaram maior rentabilidade e rapidez, além de custo menor, com a utilização de MLPA.

O estudo de Jehee et al. (2011), apontou que a técnica de MLPA como um teste de valor importante para países ou serviços onde os recursos técnicos e financeiros são escassos e aumentaria consideravelmente a taxa de diagnóstico molecular.

Cabe salientar que a maioria das síndromes genéticas são raras. As síndromes de microdeleção/microduplicação mais ainda, e se manifestam com uma expressividade muito variável e muitas delas descritas ainda recentemente (Nevado et al., 2014). Assim, a confirmação do achado clínico do Kit de MLPA por um outro *kit* com cobertura semelhante é importante para aumentar a confiabilidade dos resultados laboratoriais quando não há uma suspeita clínica clara.

A triagem genômica por *arrays* também é capaz de detectar a SD22q11.2, uma vez que consegue investigar todo o genoma em um único experimento. Sendo a técnica de *arrays* (CGH-*array* ou SNP/oligo-*arrays*) o exame de primeira escolha recomendado como consenso pela Sociedade Americana e Européia quando há uma suspeita de síndrome de microdeleção ou microduplicação. No entanto, no Brasil apenas a rede de assistência médica particular pode seguir essa diretriz, visto que o sistema de saúde público não disponibiliza esse tipo de diagnóstico (Miller et al., 2010).

Além da confirmação diagnóstica pela investigação molecular a avaliação da função tímica também é de extrema importância para os pacientes com SD22q11.2, e atualmente sabe-se que a medida da função tímica pode ser realizada através da população de “novos” linfócitos T, também conhecida como células recém-emigradas do timo, que podem ser estimadas a partir da frequência de excisões circulares de rearranjos do receptor de células T, o TREC (*TCR rearrangement excision circles*) (Fujimoto & Yamagishi, 1987; Zhang et al., 1999; Hazenberg et al., 2000; McDonald-McGinn et al., 2018).

Na proposta de Carneiro-Sampaio et al. (2011) que apresenta 12 sinais de alerta de Imunodeficiências Primárias para lactentes, quatro sinais se relacionam com a detecção da SD22q11.2: CC (em especial, as anomalias dos vasos da base); Linfocitopenia ($<2.500 /\text{mm}^3$) ou outra citopenia ou leucocitose sem infecções persistentes; Hipocalcemia com ou sem convulsão e ausência de imagem tímica ao raio-X de tórax. Vale destacar que os referidos sinais de alerta já se encontram no site oficial do Ministério da Saúde.

Embora a SD22q11.2 possa apresentar manifestações clínicas em praticamente qualquer órgão ou sistema, as malformações cardíacas, alterações palatais, imunodeficiência, dificuldade de aprendizado e distúrbios do comportamento estão entre as mais frequentes e, muitas vezes, os grandes responsáveis pela morbidade dessa síndrome (Ryan et al., 1997; Duke et al., 2000; Monteiro et al., 2013; Kuo et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Sullivan, 2019).

Dessa forma propomos nesse trabalho a identificação precoce destes defeitos genéticos, por métodos mais sensíveis, como a MLPA o qual possibilitará o diagnóstico, a instituição de terapêutica adequada para as diferentes manifestações presentes, o atendimento multidisciplinar e o aconselhamento genético das famílias.

1.8. Outras síndromes de microdeleções e microduplicações

As síndromes de microdeleções/microduplicações cromossômicas são causadas por variações submicroscópicas no número de cópias de determinada região do genoma e são uma causa comum de anomalias congênitas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor/déficit cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos (Deak et al., 2011).

Tanto as deleções quanto as duplicações submicroscópicas estão igualmente envolvidas na etiologia de fenótipos clínicos e são responsáveis por aproximadamente 15% das mutações nas doenças monogênicas. Na grande maioria das vezes, as microduplicações patológicas afetam os portadores com menor gravidade. (Shaffer & Lupski, 2001).

Como na maioria das anomalias cromossômicas, o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor é comumente observado. E há, ainda, distúrbios de comportamento em grande parte das síndromes de microdeleção (Cassidy & Morris, 2002)

As características clínicas são diversas e complexas em cada uma das síndromes de microdeleção. Portanto, essa grande variabilidade clínica parece não ser explicada, na maioria dos casos, pela haploinsuficiência de

um ou mais genes deletados em determinada região do genoma (Devriendt & Vermeesch, 2004). O estudo de diferenças fenotípicas em indivíduos com uma mesma síndrome de microdeleção pode ser de grande valia na identificação de fatores modificadores em fenótipos complexos (Devriendt e Vermeesch, 2004).

Outros fatores que podem também participar na variabilidade clínica das síndromes de microdeleção são os efeitos epigenéticos e mutações pós-zigóticas. Então, além dos modificadores genéticos, os fatores ambientais podem também influenciar a apresentação fenotípica (Devriendt & Vermeesch, 2004).

É importante destacar que um dos grandes desafios da genética médica têm sido a identificação e o diagnóstico de síndromes de Microdeleção/Microduplicação.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- Investigar a frequência da SD22q11.2 em recém-nascidos e lactentes no primeiro ano de vida portadores de cardiopatia congênita utilizando a técnica de MLPA.
- Caracterizar molecularmente as alterações genômicas encontradas.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Locais do estudo

- Centro Neonatal do Instituto da Criança (CTIN1) – HCFMUSP.
- Centro de Tratamento Intensivo Neonatal do Instituto da Criança (CTIN2) HCFMUSP.
- UTI Pediátrica do Instituto do Coração – HCFMUSP.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

No período compreendido de março de 2012 a junho de 2014 foram incluídas no estudo prospectivo, descritivo, transversal, 118 crianças com idade inferior a 12 meses, portadores de CC e sem suspeita de serem portadores de síndromes genéticas já definidas.

O tamanho da amostragem (n=100) foi calculado com base nas descrições da frequência da SD22q11.2 descritas na literatura por Gennery (2012) e Kobrynski & Sullivan (2007) com margem de segurança de 118 pacientes portadores de CC no primeiro ano de vida incluídos no estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Pediatria e pela CAPPesq (Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa) do HCFMUSP (Nº do protocolo: 0911/11) e todos os responsáveis pelos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido após orientação sobre a pesquisa, sem recusa por parte dos pais ou responsáveis para que as crianças participassem da pesquisa.

3.3 Métodos

3.3.1 Citogenética Molecular

O estudo molecular da microdeleção foi realizado no Laboratório de Citogenômica e Patologia Molecular do LIM 03 do Departamento de Patologia da FMUSP pertencente à Rede Premium de Laboratórios multiusuários da FMUSP, utilizando a técnica de MLPA através de diferentes *kits* (P036-E1, P070-B2, P064-B3, P250-B1, P356-A1 MRC-*Holland*, Amsterdam, Holanda – www.mlpa.com). Os dados gerados foram analisados por meio do *software* GeneMarker® (*Softgenetics, LLC, State College, PA, USA* – www.softgenetics.com).

3.3.2 Isolamento e quantificação do DNA

Para a extração de DNA genômico, foi coletada amostra de 2 mL de sangue periférico dos pacientes, utilizando como anticoagulante o ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA). O material genético foi extraído por meio do *kit* QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250) (*Qiagen*, Valencia, Califórnia) segundo o protocolo do fabricante com algumas modificações, incluindo a redução do volume de eluição para 100 µL. Essa modificação possibilitou uma concentração maior de DNA genômico, ideal para armazenamento e para alta sensibilidade das técnicas citogenômicas, permitindo a avaliação do número de cópias genômicas de cada paciente estudado.

Protocolo para a extração de DNA:

Em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado foram misturados 20 μ L de Protease com 200 μ L de sangue periférico total. Após a homogeneização, foram adicionados 200 μ L do *Buffer* AL e a mistura foi levada ao *vortex* por 15 segundos.

O tubo foi incubado a 56°C durante 10 minutos e centrifugado brevemente, após foram adicionados 200 μ L de etanol absoluto e novamente homogeneizado no *vortex* e centrifugado.

A mistura foi aplicada na coluna de extração e centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. Terminada a centrifugação, o tubo contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL. Foram adicionados 500 μ L do *Buffer* AW2 e centrifugados a 14000 rpm durante 3 minutos. A coluna foi, então, transferida para um novo tubo de 1,5 mL e foram adicionados 100 μ L de *Buffer* AE. O tubo foi incubado durante 5 minutos, centrifugado a 8000 rpm durante 1 minuto e a coluna foi descartada.

A concentração e qualidade das amostras de DNA foram determinadas por meio do gel de eletroforese a 1,5% e espectofotômetro *NanoVue*® (GE *Healthcare Life Sciences*) e as alíquotas de DNA foram armazenadas em *freezer* a -20°C.

3.3.3 MLPA

A técnica de amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação, descrita primeiramente por Schouten e colaboradores em 2002, permite a quantificação relativa do número de cópias de aproximadamente 45

sequências do genoma em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações em diversos genes ou regiões cromossômicas.

Baseia-se na hibridação do DNA genômico a uma mistura de sondas específicas para cada região estudada, com amplificação dos produtos de ligação por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), utilizando um par de primers universal (Schouten et al., 2002; Kozlowski et al., 2008; Jennings et al., 2011).

Além da sua vantagem *multiplex* para a análise de diversas regiões em uma única reação, esta técnica requer uma pequena quantidade de DNA (20-500 ng) para a detecção de deleções e duplicações em um único exon, sendo altamente específica (Schouten et al., 2002; Kozlowski et al., 2008; Mandal et al., 2009).

As sondas são compostas por duas partes, a primeira considerada curta e composta por oligonucleotídeos sintéticos e a outra derivada de um bacteriófago M13, e considerada longa. Essas sondas hibridam em locais adjacentes na sequência alvo do DNA e são unidas entre si por uma ligase, formando uma molécula única que será amplificada exponencialmente durante a reação de PCR.

Como cada metade das sondas possuem uma sequência de um *primer* universal em sua extremidade (posições 3' e 5'), ou seja, um único par de *primers* marcados fluorescentemente para todas as sondas do *kit*, a reação de amplificação das sondas ocorre simultaneamente e a quantidade relativa de sondas ligadas (extremidade curta e extremidade longa) no início da

reação de PCR corresponde à quantidade das sequências alvo na amostra (Figura 3) (Schounten et al., 2002; Sellner e Taylor, 2004; Vorstman et al., 2006; Zanardo et al., 2014).

Figura 3 - Modelo de constituição da sonda da MLPA. Em azul estão as sequências específicas para hibridação, em preto os *primers* universais e em verde a sequência intercalar de tamanho diferente de acordo com a sonda (Sequência *Stuffer*) (modificado de www.mlpa.com)

Os diferentes *amplicons* (sondas de MLPA + fragmentos de controle de controle de qualidade gerados pela PCR) gerados são separados por eletroforese capilar e quantificados por softwares específicos (Lam et al., 2006).

As reações de MLPA foram realizadas segundo orientações do fabricante, porém com algumas modificações para maior rendimento dos reagentes. O protocolo comercial de cada *kit* da MLPA permite a realização de 100 reações. Portanto, a partir de um protocolo desenvolvido e padronizado no Laboratório de Citogenômica (HC-FMUSP), o mesmo *kit* pôde ser utilizado para aproximadamente 300 reações (Dutra et al., 2014).

A visualização dessas amplificações pode ser feita por eletroforese capilar e a análise por programas específicos de genotipagem (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia de MLPA. (A) Oligonucleotídeos sintéticos; (B) Hibridações adjacentes dos pares de sondas de MLPA nas seqüências alvo; (C) Reação de Ligação com união das sondas adjacentes pela enzima ligase; (D) Reação de PCR Multiplex amplificação com *primers* universais; (E) Separação por eletroforese capilar dos fragmentos amplificados

Para a investigação molecular dos pacientes presentes no estudo foram utilizados diversos *kits* de MLPA (MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands, www.mlpa.com) disponíveis comercialmente: o SALSA MLPA *probemix* P064-B2, que investiga as principais síndromes de microdeleção/microduplicação em diversas regiões do genoma e permite avaliar alterações no número de cópias da região 22q; o SALSA MLPA *probemix* P036-E1 *Human Telomere-3*® e o SALSA MLPA *probemix* P070-B2 *Human Telomere-5*® que possibilitam a investigação de alterações subteloméricas de todos os cromossomos, com uma sonda no braço curto de cada cromossomo e uma no braço longo, com exceção dos cromossomos acrocêntricos (cromossomos 13, 14, 14, 21 e 22), que apresentam as duas

sondas no braço longo, uma logo abaixo do centrômero e outra no subtelômero. Podem esclarecer possíveis rearranjos envolvendo a região de interesse e outros cromossomos.

Os kits específicos para a região 22q11 utilizados foram o SALSA MLPA *probemix* P250-B1 *DiGeorge*[®] e o SALSA MLPA *probemix* P356-A1 *Chromosome 22q*[®] específicos para o cromossomo 22. O *kit* P250-B1, além de possuir mais de 40 sondas para a região 22q11.2, também é capaz de detectar alterações em outros cromossomos associados à alterações cardíacas, tornando-se de grande importância o diagnóstico molecular de cardiopatias complexas (Dutra et al., 2012).

As sondas presentes em cada *kit* de MLPA, bem como a localização genômica, a região cromossômica e o tamanho de cada sonda estão detalhadas nos Anexos.

A técnica baseia-se na hibridação do DNA genômico a uma mistura de sondas específicas para cada região estudada, com amplificação dos produtos de ligação pela técnica de PCR, utilizando um par de *primers* universal. A visualização dessas amplificações pode ser feita por eletroforese capilar e a análise por programas específicos de genotipagem.

Protocolo da técnica de MLPA:

A reação de MLPA foi realizada em quatro etapas principais: 1) Denaturação do DNA e sua hibridação com as sondas de MLPA; 2) Reação de ligação entre as duas partes da sonda; 3) Reação de PCR; 4) Separação

por eletroforese capilar dos produtos amplificados e análise dos dados (Figura 5).

Para a primeira fase, na qual ocorre a denaturação do DNA e a hibridação das sondas às regiões de complementariedade ao DNA, foram pipetados 1 µL de DNA genômico na concentração de aproximadamente 80 ng µL em microtubos de 0,2 mL. Os tubos foram colocados no termociclador *Mastercycler® Nexus Gradient (Eppendorf)* para denaturação do DNA por 15 minutos a 98°C, com posterior resfriamento a 25°C. Durante esse tempo foi preparada uma mistura contendo, para cada amostra ou tubo, 0,44 µL de tampão (*SALSA MLPA Buffer*), 0,44 µL de *probemix* (eT específico para cada *kit*) e 2,9 µL de *Nuclease-Free Water (Qiagen)*. Com o termociclador a 25°C foram adicionados 1 µL da mistura por tubo e incubado por 1 minuto a 95°C e por 3 horas a 60°C.

Na segunda etapa da reação, ocorrerá a ligação entre as duas metades das sondas. Para esta fase, foi preparada uma mistura contendo 0,8 µL de Ligase *Buffer A*, 0,8 µL de Ligase *Buffer B*, 7,3 µL de *Nuclease-Free Water (Qiagen)* e 0,29 µL de SALSA Ligase-65 por tubo (fig.2). A quantidade de 8 µL da mistura foi adicionada em cada amostra no termociclador à temperatura de 54°C e homogeneizada com o auxílio de uma pipeta. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 54°C, seguindo de 5 minutos a 98°C e mantidas a 20°C.

Na terceira etapa, em temperatura ambiente devido à *Taq* Polimerase ser termoestável, os reagentes para a reação de PCR foram adicionados para que ocorresse a amplificação somente dos fragmentos unidos pela ligase

(fig.3). Dessa forma, foi preparada uma mistura contendo 0,7 μL de SALSA PCR *Primer Mix*, 4,86 μL de *Nuclease-Free Water* (Qiagen) e 0,29 μL de SALSA *Polymerase* e distribuídos 5 μL desta mistura em cada tubo correspondente a cada amostra. Os tubos foram colocados no termociclador e selecionado o programa da PCR: 35 ciclos de 98°C por 30 segundos, 60°C por mais 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com posterior extensão a 72°C por 20 minutos e mantidos a 15°C. Os produtos amplificados foram mantidos no freezer a -20°C até o momento da preparação das placas para a separação dos fragmentos por eletroforese capilar.

Figura 5 - Etapas do método de MLPA. Denaturação do DNA e hibridação das sondas às regiões de complementariedade do genoma; Ligação entre as partes das sondas por meio de uma enzima ligase; PCR para amplificação das sondas ligadas; Análise dos fragmentos amplificados, em que cada pico corresponde a uma sonda (modificado de www.mlpa.com)

microplaca *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems®*) juntamente com 9,0 µL de *HiDi™ Formamide* (*Applied Biosystems®*) e 0,075 µL de *GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0* (*Applied Biosystems®*) e a mistura foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta.

Antes da realização da leitura dos fragmentos no sequenciador, os produtos foram desnaturados a 98°C por 5 minutos e em seguida postos no gelo para manter as fitas separadas (Figura 6).

Figura 6 - Sequenciador automático ABI 3500 *Genetic Analyzer* que realiza a visualização dos tamanhos de fragmentos pela eletroforese capilar

3.3.4 Análise dos resultados de MLPA

Os dados foram gerados pelo sequenciador automático ABI 3500 *Genetic Analyzer* contendo 8 capilares (*Applied Biosystems®*) e de acordo com os parâmetros específicos para as reações de MLPA, a partir da Rede de Equipamento Multiusuário do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina da USP (nos laboratórios de Imunologia do Instituto do Coração – INCor e Genômica Pediátrica – LIM 36).

Por se tratar de um teste citogenômico comparativo, em todas as reações de MLPA foram utilizadas pelo menos três amostras controles previamente testadas e consideradas normais (indivíduo saudável), tanto em relação ao fenótipo como em relação ao genótipo (ausência de deleções e/ou duplicações). Assim, cada corrida de MLPA apresentava além dos três controles normais, uma amostra positiva para cada *kit* de MLPA.

Para todos os *kits* da MLPA também temos os controles internos da reação, que são alguns fragmentos controles com tamanho variando entre 64 a 118 nt. Além dos controles, também foi utilizado um branco (tubo contendo H₂O ultra-pura ao invés da amostra de DNA) em cada reação feita. Dessa forma, foi possível verificar a presença de contaminantes na água, reagentes de MLPA, ou reagente da eletroforese e capilares. No branco, apenas os *Q-fragments* devem ter o sinal da sonda, pois os quatro fragmentos referentes não requerem a reação de ligação ou presença de um DNA para serem amplificados, e eles já apresentam ambas as sequências dos *primers* na sua molécula.

A análise dos resultados da reação de MLPA foi realizada utilizando o software *GeneMarker*® v2.2.0 (*Softgenetics, LLC, State College, PA* – www.softgenetics.com). Todos os resultados foram confirmados por um segundo software de análise, o *Coffalyser.NET*, específico para reações de MLPA e disponível gratuitamente pela empresa *MRC-Holland*.

As diferenças no número de cópias das amostras são detectadas por meio da comparação do padrão de picos (amostra e controle normal), visualizados por meio de *softwares* específicos. A análise foi feita considerando a altura do pico de cada produto amplificado, sendo que este reflete o número de cópias relativo de cada sequência-alvo. O resultado final da análise gerou um gráfico com todas as sondas do *kit* de MLPA juntamente com os valores limites para normalidade e uma tabela de número de cópias genômicas para o grupo de sondas utilizado no *kit* específico.

Na página da análise do programa, as alterações (deleções e/ou duplicações) puderam ser detectadas por quatro formas diferentes: a. *Sobreposição dos picos*: no eletroferograma é possível analisar a diminuição ou aumento do tamanho dos picos de cada amostra. Os picos referentes à média dos controles utilizados aparecem em vermelho atrás dos picos referente à amostra, que aparecem em azul; b. *Histograma de dosagem*: exibe, na forma de barras, a relação das intensidades dos picos normalizados entre a referência e a amostra. Sondas das amostras são representadas pelas barras azuis e as sondas controles pelas barras pretas; c. *Tabela de relatório dos picos*: lista em colunas as informações sobre nome ou região de interesse e o número de cópias de cada sonda; d. *Razão de plotagem*: gráfico representativo da relação da intensidade do pico normalizado entre a amostra e os controles. Cada ponto representa um pico da amostra ou a sonda específica, sendo que os pontos que estão entre as linhas verdes (limites de normalidade) referem-se ao número normal de cópias, acima deste limite

estão os pontos correspondentes às regiões/sondas duplicadas e a baixo às deletadas.

O relatório de análise da MLPA gerado pelo software *GeneMarker*® demonstrando a deleção na região 22q11.2 pode ser visto de forma detalhada na figura 7.

Figura 7 - Relatório de análise da MLPA gerado pelo software *GeneMarker*®. (A) refere-se à análise da sobreposição dos picos e histograma de dosagem, no qual o pico azul corresponde à amostra e o vermelho ao controle; (B) refere-se à tabela com as descrições das sondas e números de cópias; e a (C) a razão de plotagem, na qual cada ponto corresponde a uma sonda e as linhas os limites de duas cópias

Os resultados foram considerados alterados quando o tamanho do pico relativo foi menor do que 0,75 (deleção) ou maior do que 1,25 (duplicação) quando comparado a amostras normais (Bunyan et al., 2004; Vorstman et al., 2006; Shen e Wu, 2009). As reações com um resultado duvidoso em relação à qualidade da corrida foram repetidas para confirmação dos resultados.

Todos os resultados foram confirmados por um segundo software de análise, o Coffalyser.Net, específico para reações de MLPA e disponível gratuitamente pela empresa MRC-Holland (www.mlpa.com) (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática do *software* de análise Coffalyser.Net

Resultados alterados foram checados por reações independentes e comparados aos bancos de dados de variação genômica DGV (*Database of Genomic Variants* – (<http://projects.tcag.ca/variation/>) e DECIPHER (www.decipher.com). Essa consulta aos bancos de dados foi realizada devido a possíveis regiões polimórficas presentes nas sequências próximas às sondas, regiões estas conhecidas como CNVs de significado clínico incerto.

3.4 Delineamento do estudo

3.5 Análise estatística

As características quantitativas pessoais e clínicas do RN foram descritas com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e as características qualitativas foram descritas com uso de frequências absolutas e relativas.

3.6 Aprovação por Comissão de Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do ICrHCFMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) em 06 de fevereiro de 2012 com Protocolo de pesquisa de número 0911/11.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

No período de março de 2012 a junho de 2014, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, foram analisados 118 pacientes. O gênero masculino foi mais prevalente, na proporção de 1,4: 1 casos para o gênero masculino e feminino, respectivamente. A idade variou entre um dia a 11 meses, com média de idade de 41,4 dias e a idade ao diagnóstico da SD22q11.2 variou de um dia a 330 dias, com mediana de 55 dias (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização da amostra de pacientes do estudo

Variável	Casos N (118)	Frequência (%)
Sexo		
Masculino	69	58,4
Feminino	49	41,5
Idade		
0-28 d	79	66,9
29 d – 3 m	21	17,8
3 m 1 d – 6 m	12	10,2
6 m 1 d – 12 m	6	5,1
Sexo pela faixa etária		
0-28 d		
Masculino	48	40,7
Feminino	31	26,2
29 d – 3 m		
Masculino	10	8,5
Feminino	11	9,3
3 m 1 d – 6 m		
Masculino	7	5,9
Feminino	5	4,3
6 m 1 d – 12 m		
Masculino	4	3,4
Feminino	2	1,7

*N: Número de pacientes analisados; D: Dias; M: Meses

4.1 Cardiopatias congênitas encontradas nos pacientes do estudo

As CC mais frequentes nesses pacientes foram: TGA (11,9%), CoAo (10,2%), TOF (9,3%) e CIV (9,3%). Na figura 9 são apresentadas também as outras cardiopatias frequentemente diagnosticadas nos pacientes do estudo.

Figura 9 – Distribuição das principais cardiopatias congênitas em 118 pacientes

Na tabela 2 há a descrição de todas as cardiopatias diagnosticadas no presente estudo.

Tabela 2 - Cardiopatias encontradas nos 118 pacientes do estudo

Cardiopatias	N	(%)
Átrios e grandes veias		
- Drenagem anômala parcial de veias pulmonares	3	2,6
- Drenagem anômala total de veias pulmonares	3	2,6
- Isomerismo atrial direito	3	2,6
- Comunicação interatrial	2	1,7
Conexão atrioventricular		
- Atresia mitral	2	1,7
- Atresia tricúspide	2	1,7
Conexão ventrículo-arterial		
- Transposição dos grandes vasos da base	14	11,9
- Dupla via de saída do ventrículo direito	8	6,8
- Dupla via de saída do ventrículo esquerdo	5	4,2
- Truncus arteriosus	5	4,2
- Dupla via de entrada do ventrículo esquerdo	1	0,8
Ventrículos		
- Síndrome de hipoplasia do ventrículo esquerdo	5	4,2
Septo ventricular		
- Comunicação interventricular	11	9,3
Via de saída do ventrículo direito		
- Estenose pulmonar valvar	9	7,6
- Atresia pulmonar com septo ventricular íntegro	6	5,2
- Estenose pulmonar infundibular	3	2,6
Tetralogia de Fallot e variantes		
- Tetralogia de Fallot	11	9,3
- Atresia pulmonar com comunicação interventricular	4	3,4
Via de saída do ventrículo esquerdo		
- Estenose aórtica valvar	1	0,8
Coronárias		
- Origem anômala da coronária esquerda	2	1,7
Conexão ventrículo-arterial		
- Coarctação de aorta	12	10,2
- Interrupção do arco aórtico	4	3,4
- Estenose do tronco pulmonar	2	1,7
Total	118	

Considerou-se cardiopatia complexa um conjunto de malformações associadas, necessárias para a manutenção da vida do paciente; cada uma delas recebendo denominação específica na literatura: DATVP, SHVE, ventrículo único, AM, AP com septo interventricular íntegro, atresia tricúspide (AT), DVSVD, DVSVE, TOF, TA e TGA, confirmadas pelo ecocardiograma com Doppler colorido. Por isso, a PCA, a CIA, a CIV e a EP, não foram consideradas independentemente, quando pertencentes às alterações de uma cardiopatia complexa e fossem necessárias para a sobrevivência do paciente.

Quando o conjunto das alterações não tinha denominação específica, e as suas associações não eram obrigatórias para a vida do paciente, as malformações foram consideradas doenças associadas e computadas isoladamente.

4.2. Alterações genômicas diagnosticadas

A deleção 22q11.2 foi detectada em 10/118 pacientes (8,5%). Todos os pacientes tiveram a forma típica da doença. As outras alterações genômicas foram diagnosticadas em 6/118 pacientes (5%), como se pode observar na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma das alterações genômicas encontradas no estudo pela técnica de MLPA

4.2.1 Diagnóstico da deleção 22q11.2

Na tabela 3, é possível visualizar os pacientes em que foi detectada a deleção 22q11.2 pelos *kits* de MLPA disponíveis para o estudo.

Tabela 3 – Dados clínicos e análise molecular dos 10 pacientes com deleção típica de 22q11.2

Nº do paciente	Sexo	Idade ao diagnóstico (meses)	Kits
IPMS	M	6,7	P064/ P250/ P356
EKPS	M	11	P064/ P250/ P356
GMS	M	0,1	P064/ P250/ P356
EDBP	M	0,5	P064/ P250/ P036
EAGS	F	4	P064/ P250/ P356
GSO	M	1,1	P064/ P250/ P356
RPG	M	0,4	P064/ P250/ P356
JHPD	M	1	P064/ P250/ P356
HSP	M	9	P064/ P250/ P356
RS	F	2,5	P064/ P250/ P356

A idade ao diagnóstico da deleção 22q11.2 nesses 10 pacientes (8 masculinos), variou de um dia a 330 dias (mediana de 55 dias) e em todos foi detectada a forma típica da doença. As cardiopatias encontradas nesses pacientes estão demonstradas na Figura 11.

Figura 11 – Cardiopatias encontradas nos pacientes com a deleção 22q11.2

4.2.2 Diagnóstico das outras alterações genômicas

Ao pesquisarmos a deleção 22q11.2 nos pacientes cardiopatas, a técnica de MLPA também detectou outras microdeleções e/ou microduplicações como podemos observar na Figura 12. Nesses pacientes a idade ao diagnóstico variou de um dia a 44 dias (mediana de 5 dias) e todos do sexo masculino (Tabela 4).

Tabela 4 – Dados clínicos e análise molecular dos 6 pacientes com outras alterações genômicas

Nº do paciente	Sexo	Idade ao diagnóstico (dias)	Alteração genômica	Região cromossômica	Kits
MM	M	4	Deleção	8p23	P250
TGOR	M	7	Duplicação	7q11.2	P036/ P070
VSS	M	13	Deleção	1p36	P064/ P070
DBG	M	44	Duplicação	12p	P036
EBO	M	1	Duplicação	8q24	P070
EABG	M	1	Deleção	8p23	P250

Figura 12 – Cardiopatias dos pacientes com outras alterações genômicas

Os pacientes em que foram detectadas essas outras alterações genômicas, a tabela 4 demonstra os *kits* de MLPA que realizaram esse diagnóstico.

A deleção em 8p23 pode ser confirmada pelo *kit* 250, que é específico para a região crítica da síndrome de deleção em 22q11.2, mas também permite o diagnóstico molecular em outras posições genômicas, como em 4q35.2, 8p23.1, 9q34.3, 10p12.31, 10p14, 10p15.1 e 17p13.3.

A detecção de alterações subteloméricas utilizando os *kits* P036 e P070 ocorreu em um caso, o paciente apresentava duplicação em 7q. Foram observadas, também, alterações presentes em apenas um dos *kits* subteloméricos. A análise molecular revelou que em um caso foi observada a duplicação de 12p pelo *kit* P036 e no outro a duplicação de 8q24 pelo *kit* P070.

Entre os casos deste estudo, o *kit* P064 permitiu a identificação de alterações em outras regiões susceptíveis a rearranjos, como a microdeleção em 1p36. O *kit* P070 revelou uma deleção subtelomérica atípica em 1p36 que incluiu os genes *TNFRSF4* e *TNFRSF18*.

Vale ressaltar que não foi possível o acompanhamento clínico de todos os pacientes com alterações genômicas, sendo que no período do estudo apenas um paciente evoluiu para óbito.

b. Paciente E.K.P.S

- **Idade ao diagnóstico:** 11 meses
- **Diagnóstico:** Estenose pulmonar
- **Evolução clínica:** Sepses, fenda palatina e malformação renal
- **Evolução laboratorial:** Hipocalcemia e linfopenia
- **Rx de tórax:** Estreitamento do mediastino superior
- **Evolução:** Alta

Kit – P356

P064	P250	P356	P036	P070
	del	del	Normal	Normal
	22q11.2	22q11.2		

c. Paciente E.D.B.P

- **Idade ao diagnóstico:** 14 dias
- **Diagnóstico:** Truncus arteriosus
- **Evolução clínica:** Convulsão de difícil controle, sepse de repetição e choque séptico refratário
- **Evolução laboratorial:** Hipocalcemia e linfopenia mantidas
- **Rx de tórax:** Aplasia tímica
- **Evolução:** Óbito com 3 meses de vida

Kit - P250

P064	P250	P356	P036	P070
	del 22q11.2	del 22q11.2	del 7p	Normal

d. Paciente E.A.G.S

- **Idade ao diagnóstico:** 4 meses
- **Diagnóstico:** Estenose pulmonar
- **Evolução clínica:** Sepses
- **Evolução laboratorial:** Linfopenia
- **Rx de tórax:** Estreitamento do mediastino superior
- **Evolução:** Alta

P064	P250	P356	P036	P070
	del	del	del 7p	Normal
	22q11.2	22q11.2		

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Apesar dos avanços recentes e de ser considerada a microdeleção cromossômica mais comum em seres humanos, com frequência de 1:2000-6000 nascidos vivos, a SD22q11.2 ainda permanece subdiagnosticada no Brasil, devido ao seu desconhecimento por parte dos médicos e à dificuldade em conseguir a realização do exame específico pelo Sistema Único de Saúde (SUS). No Brasil não há estudos sobre a pesquisa da deleção 22q11.2 pela técnica de MLPA exclusivamente na faixa etária que nós abordamos. Nesse período o fenótipo nem sempre é tão evidente, o que dificulta muito o diagnóstico precoce nesses pacientes (Kobrynski et al., 2007; Gennery, 2012; Grassi et al., 2014; McDonald-McGinn, 2018).

Porém, há perspectiva de melhora num futuro próximo, pois recentemente o Brasil passou por modificações em suas políticas na área de genética. Em janeiro de 2014, o Diário Oficial da União publicou portaria do Ministério da Saúde, que instituiu a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras e aprovou as Diretrizes para Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras no âmbito do SUS, viabilizando incentivos financeiros de custeio.

Como as anormalidades cromossômicas são mais frequentes em pacientes com malformações cardíacas do que na população geral, torna-se fundamental ressaltar a importância da investigação genética na gênese de

CC. O diagnóstico molecular específico de uma síndrome genética permitirá o acompanhamento multidisciplinar adequado, avaliação do prognóstico e informação aos familiares sobre os riscos de recorrência (Ionita-Laza et al., 2009; Molck et al., 2017; McDonald-McGinn, 2018; Palmer et al., 2018).).

A cada ano nascem no Brasil cerca de 29,8 mil cardiopatas e estima-se que 80% do total (mais de 23,8 mil crianças) precisarão de intervenção cirúrgica em algum momento do seu desenvolvimento, sendo que a metade deve ser operada ainda no primeiro ano de vida (Pinto Júnior et al., 2009). É importante destacar que a mortalidade neonatal precoce representa cerca de 60% a 70% da mortalidade infantil, e 25% dos óbitos ocorrem no primeiro dia de vida. As CC correspondem a cerca de 10% dos óbitos infantis e 20% a 40% dos óbitos decorrentes de malformações (Portaria Nº 1.727, de 11 de julho de 2017. Plano Nacional de Assistência à Criança com Cardiopatia Congênita).

Vale ressaltar que algumas síndromes apresentam tipos distintos de defeitos cardíacos que muitas vezes as caracterizam, com a Síndrome de Down (DSAV), Síndrome de Edward (DSV, EP), Síndrome de Patau (DAS, TGA), Síndrome de Turner (CoAo, CA) e Síndrome de Klinefelter (Anomalia de Ebstein, TOF). No entanto, isso acontece também em pacientes com a SD22q11.2, sendo que as malformações cardíacas constituem a manifestação mais crítica dessa síndrome, acometendo entre 49% a 95% dos pacientes e estima-se que 5% dos cardiopatas apresentam a deleção do 22q11.2 (Goldmuntz, 2005; Fomim et al., 2010; Gennery, 2012; Costain et al.,

2016; Mlynarski et al., 2016; Guo et al., 2017; McDonald-McGinn, 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

Realizaremos a discussão na ordem da apresentação dos resultados.

5.1 Características dos pacientes estudados

Em relação às características das 118 crianças portadoras de CC no primeiro ano de vida do presente estudo, podemos observar a predominância de acometimento no sexo masculino e a maioria dos pacientes encontra-se na faixa etária de neonatos (Tabela 1). É importante destacar que o período neonatal para o paciente portador de CC pode ser crítico, fundamentalmente, devido a dois fatores: a gravidade de alguns defeitos comumente presentes e as modificações fisiológicas que normalmente ocorrem nessa fase. Deve-se considerar que, nessa faixa etária a morbidade e mortalidade são mais elevadas.

5.2 Cardiopatias congênitas presentes nos pacientes do estudo

Entre os pacientes avaliados observou-se predomínio das cardiopatias cianóticas, a TGA, CoAo e TOF (Figura 9 e Tabela 2). Portanto, é importante destacar que na literatura as CC mais frequentes são as acianóticas, menos sintomáticas e de diagnóstico mais difícil, a menos que ocorram em associação com outras malformações cardiovasculares, o que é frequente na CIV e na CIA (Kobinger, 2003; Momma, 2007).

No estudo aqui descrito, a TGA foi a cardiopatia mais frequente, correspondendo a 11,9% do total de CC do estudo. No entanto, essas doenças complexas que apresentam sintomatologia já nos primeiros dias de vida, como a TGA e a Síndrome do coração esquerdo hipoplásico (SHCE), mostram-se com menor frequência em nosso meio. Como evoluem ao óbito precocemente, pode-se supor que muitos não conseguem receber atendimento especializado no devido tempo ou mesmo falecem sem ter o seu diagnóstico realizado (Samanek et al., 1999). Observamos que isso não ocorreu no presente estudo, devido aos pacientes se encontrarem internados em um serviço especializado, que necessariamente sofre influência de padrões de referência e contra referência, com a seleção de pacientes com cardiopatias menos graves. Além disso, é importante ressaltar que o serviço recebe RN cardiopatas de gestantes de alto risco do Hospital das Clínicas e outros hospitais de diversos estados do Brasil.

Dados de literatura demonstram que a TGA é uma das malformações cardíacas mais prevalentes, com incidência de 1 a cada 3.000 nascidos vivos e corresponde aproximadamente a 8% de todas as CC. Devido à gravidade do quadro, essa cardiopatia cursa com mortalidade elevada, a qual sem tratamento cirúrgico leva ao óbito na primeira semana de vida em 28,7% dos RN. (Farah & Villela, 2001; Gontijo et al., 2001).

Em relação a segunda CC mais frequente do nosso estudo, encontra-se a CoAo, correspondendo a 10,2% dos pacientes. Podemos observar que na literatura, essa cardiopatia também é comum e responsável por 5 a 8% das CC (Rao, 2005). Vale ressaltar que o reconhecimento clínico é relativamente

simples, caracterizado pela ausência ou diminuição da amplitude dos pulsos arteriais nos membros inferiores associado a presença de pulsos amplos e hipertensão arterial nos membros superiores (Hager et al., 2007; Baumgartner et al., 2010).

Este trabalho demonstra que a TOF correspondeu a 9,3% das CC dos nossos pacientes estudados. Essa cardiopatia é geralmente reconhecida como a malformação cardíaca cianótica mais comum e com incidência de 7 a 10% do total das CC (Pinsky & Arciniegas, 1990). Nesses pacientes a hipóxia é encontrada com frequência, predispondo-os a acidentes cerebrovasculares. Quando não tratada, a maioria dos pacientes evolui a óbito ainda na infância, sendo, portanto, indicada a cirurgia cardíaca o mais precoce possível, preferencialmente entre 18 e 24 meses de idade (Spivack, 2001).

Nos pacientes desta casuística, identificamos a CIV isolada em 9,3%. É importante destacar que a CIV é a cardiopatia mais frequente, acometendo 20 a 30% das CC. Geralmente está associada a AP, sendo encontrada essa associação em 3,4% na nossa casuística. Os pacientes com AP/CIV podem evoluir com quadro grave, sendo necessária rápida identificação e intervenção para possibilitar a realização de medidas eficazes a tempo de se obter um melhor prognóstico (Croti et al., 2005).

Na avaliação realizada neste estudo, observamos que o TA e a IAA foram pouco prevalentes, sendo diagnosticados em 3,4% dos pacientes, porém, semelhante a outros trabalhos (Moller et al., 1995; Mendes S et al., 2015). Cabe salientar que o TA é uma malformação cardíaca rara, com incidência de 1,5% no total das CC (Croti et al., 2005).

Apesar do progresso considerável na abordagem clínica e cirúrgica desses pacientes, ainda representa uma importante causa de morbimortalidade no primeiro ano de vida (Momma, 2010; Khoshnood et al., 2012; Hussain et al., 2014; Ta-Shma et al., 2014).

5.3 Visão geral dos estudos sobre a deleção 22q11.2 no Brasil

No Brasil, o nosso estudo é o primeiro a realizar o diagnóstico da deleção 22q11.2 pela técnica de MLPA, durante a internação hospitalar no CTI Neonatal ou Cardiológico, em pacientes cardiopatas no primeiro ano de vida sem características clínicas da síndrome. Cabe salientar que nessa faixa etária o fenótipo nem sempre é facilmente detectado. No entanto, as mudanças fenotípicas associadas ao crescimento são bem conhecidas, sendo que a aparência facial dos pacientes com a síndrome tende a ficar mais distinta com a idade.

A divulgação da suspeição da SD22q11.2 é de grande importância, pois a maioria dos pacientes com CC é usualmente avaliada por um especialista em uma idade precoce, sendo fundamental que a doença não passe despercebida nessa avaliação médica. No entanto, esta provavelmente ainda não é uma conduta habitual em nosso meio, pois o número de casos submetidos à cirurgia cardíaca para correção de defeitos conotruncais é bastante significativo e o número de relatos de casuística com SD22q11.2 ainda é escasso no Brasil. Por esta razão, devemos promover o diagnóstico precoce da deleção 22q11.2, visando a realização do acompanhamento multidisciplinar, do aconselhamento genético e da identificação de outras

anomalias que podem estar associadas (Rosa et al., 2008; Rosa et al., 2009; Grassi et al., 2014).

É importante destacar que a grande maioria dos estudos brasileiros avaliou pacientes em diferentes faixas etárias durante o acompanhamento ambulatorial ou internação pelas técnicas de FISH, PCR-RFLP, *microarray* cromossômico e não exclusivamente pela técnica de MLPA. Cabe salientar que vários estudos incluíram pacientes já com alterações clínicas da SD22q11.2 (Gioli et al., 2008; Rosa et al., 2008; Belanger et al., 2009; Koshiyama et al., 2009; Rosa et al., 2011; Carneiro-Sampaio et al., 2013; Monteiro et al., 2013; Vieira et al., 2013; Huber et al., 2014; Campos et al., 2015; Sgardioli et al., 2015; Leite et al., 2016; Molck et al., 2017; Monteiro et al., 2017).

Gioli et al. (2008), em São Paulo, analisaram a frequência da deleção 22q11.2 em 123 pacientes não sindrômicos com TOF durante o acompanhamento ambulatorial num período de cinco anos. A média de idade desses pacientes foi $13,26 \pm 6,85$ anos. A alteração genômica foi detectada em oito pacientes (6,5%) pela técnica de PCR-RFLP e a idade ao diagnóstico variou de 5 a 16 anos. Vale ressaltar que esse estudo foi realizado em um grupo de pacientes com uma cardiopatia específica e a idade variou do período neonatal a fase escolar.

No mesmo ano Rosa et al., em Porto Alegre, realizaram um estudo prospectivo e consecutivo em 207 crianças com CC internadas no CTI Pediátrico, durante o período de 11 meses. Diferentemente do nosso estudo,

a técnica de FISH foi a utilizada e a idade dos pacientes variou de um dia a 13 anos. A deleção 22q11.2 foi detectada em quatro pacientes (2%) e as cardiopatias encontradas foram DSV, TOF e DSAT. A idade ao diagnóstico variou do período neonatal a adolescência.

Belangero et al. (2009), estudaram a frequência da deleção 22q11.2 em 29 pacientes provenientes do berçário, e do Centro de Genética do Hospital São Paulo e de outros hospitais de São Paulo através da citogenética clássica, FISH e técnicas moleculares (estudo por marcadores polimórficos de DNA) em três grupos: (I) malformação cardíaca conotruncal isolada (6 pacientes); (II) malformação cardíaca conotruncal associada a aspectos clínicos da SD22q11.2 (13 pacientes); e fenótipo característico as SD22q11.2, sem cardiopatia (10 pacientes). A análise do cariótipo foi realizada em 28 dos 29 pacientes. Entre os pacientes com cariótipo normal, a deleção 22q11.2 foi observada em 25% (7/28). Portanto, quando os autores analisaram os grupos separadamente, a deleção estava presente em aproximadamente 42% (5/12) dos pacientes com fenótipo da síndrome associado a cardiopatia. Vale ressaltar que alguns dados diferem do nosso estudo, principalmente a idade dos pacientes da casuística (um dia a 28 anos e 11 meses) e a técnica utilizada.

Koshiyama et al. (2009), em Porto Alegre, avaliaram 30 pacientes com suspeita clínica da SD22q11.2, sendo incluídos no estudo somente aqueles que apresentavam cariótipo com banda G normal e pelo menos dois achados clínicos sugestivos da deleção 22q11.2, como anormalidades de palato; malformações cardiovasculares (especialmente do tipo conotruncal); déficit

de aprendizagem ou de fala; transtornos comportamentais; anormalidades oftalmológicas; alterações imunológicas ou hipoplasia/ agenesia de timo e hipocalcemia. A idade variou de um dia de vida a 16 anos, sendo 53% dos casos na faixa etária do primeiro ano de vida. Destes, 18 (60%) eram do sexo masculino e 12 (40%) do feminino. A técnica utilizada foi o FISH e, a deleção 22q11,2 foi identificada em três pacientes (10%), com idade de 23 dias a 12 anos.

Novamente, Rosa et al. (2011), em Porto Alegre, verificaram a prevalência da SD22q1.2 em 66 pacientes com CC complexas do tipo conotruncal internados no CTI Cardiológico. A idade variou de um dia a 10 anos (51% possuíam idade inferior a um mês). Dos 66 pacientes com CC complexa, 52 eram portadores de defeitos cardíacos do tipo conotruncal, sendo que a pesquisa para a deleção 2q11.2 foi realizada pela técnica de FISH e identificada em dois casos (3,1%).

Carneiro-Sampaio et al., em 2013, no estudo realizado no Hospital das Clínicas de São Paulo, avaliaram 1.008 pacientes com imunodeficiência primária em um período de 33 anos, sendo a SD22q11.2 identificada em apenas 32 pacientes. Estes dados nos levaram a uma busca ativa da deleção 22q11.2 através da técnica de MLPA na Unidade de Cardiologia Pediátrica do INCOR, resultando em um aumento significativo do número de casos identificados no período do estudo (Grassi et al. 2014).

Monteiro et al. (2013), em Campinas, avaliaram 194 pacientes com características da SD22q11.2, a idade variou de 10 dias a 33 anos (média =

10,28 anos) e foram distribuídos em quatro grupos: Grupo I: suspeita clínica da SD 22q11.2 com anomalia do palato; Grupo II: somente suspeita clínica da deleção; Grupo III: malformações cardíacas associadas a deleção 22q11.2, como TOF com EP, IAA, TA e outras anomalias da artéria pulmonar; Grupo IV: pacientes com quadro de esquizofrenia com início antes da segunda década de vida. A técnica de MLPA detectou a deleção 22q11.2 em 45 pacientes (23,2%), assim distribuídos: Grupo I, 35/101 (34,7%); Grupo II, 4/18 (22,2%); Grupo III, 6/52 (11,5%); Grupo IV, 0/23 (0%).

Vieira et al. (2013) estudaram pacientes com alterações palatais e suspeita da SD22q11.2 em 11 Centros de Genética em três regiões do nosso país. Dos 11 centros, três estavam localizados no Nordeste, quatro no Sudeste e quatro no Sul. Foram realizados cariótipo com análise de bandeamento G, FISH e MLPA. O centro de referência recebeu 100 amostras durante o período de 30 meses e as idades dos pacientes variaram entre um mês a 33 anos de idade. MLPA e FISH foram realizadas em 78 casos e só MLPA em 22 casos, sendo a microdeleção 22q11.2 detectada em 35 pacientes (35%).

Huber et al. (2014), em Porto Alegre, realizaram um estudo transversal que incluiu 392 pacientes com CC em seguimento ambulatorial. Estes pacientes foram selecionados por amostragem aleatória num período de 16 meses. A idade variou de 14 dias a 66 anos (mediana 10,9 anos). A técnica PCR-RFLP foi utilizada como *screening* inicial para excluir a presença de deleção 22q11.2, com a análise do polimorfismo rm rs4819523, rs5748411 e rs4680loci. Dos 72 casos (18,4%) para os quais não foi possível descartar a

presença dessa deleção utilizando a técnica PCR-RFLP, 65 pacientes foram submetidos a técnica de MLPA e o diagnóstico foi realizado em cinco pacientes. Em seus resultados, a prevalência da SD 22q11.2 foi de 1,27% (5 de 392 pacientes). Apresentavam cardiopatias comumente encontradas na SD22q11.2 (IAA, TA tipo I, TOF e defeito do septo ventricular). Desses cinco pacientes, apenas um teve o diagnóstico realizado no primeiro ano de vida.

Campos et al. (2015), em Cuiabá, elaboraram num período de 8 meses, um estudo prospectivo e descritivo em 39 pacientes portadores de CC do tipo conotruncal e CoAo para avaliar a variação no número de cópias gênicas pela técnica de MLPA. A idade variou de dois dias a 19 anos. Os pacientes eram provenientes do ambulatório de cardiologia pediátrica e do CTI neonatal do Hospital Universitário Júlio Müller e de outros hospitais localizados em Cuiabá, Mato Grosso. Entre as cardiopatias observadas, a maioria dos pacientes apresentava TOF (56%). As outras cardiopatias foram: TGA (23%), CoAo (10,3%), DVSVSD (7,7%), AP/CIV (2,6%). As alterações detectadas em 7/39 casos foram a deleção 22q11.2, duplicação 22q11.2, duplicação 15q11.2, duplicação 20p12.2, deleção 19p, duplicação 15q e duplicação 8p23.2 concomitante com duplicação 10p12.31.

Sgardioli et al. (2015), em Campinas, avaliaram 109 pacientes com suspeita da SD22q11.2 que foram selecionados prospectivamente de um estudo multicêntrico, o Projeto Craniofacial do Brasil. As técnicas utilizadas foram cariótipo com banda G, MLPA e / ou FISH, de acordo com a disponibilidade da amostra. A deleção 22q11.2 foi detectada em 30 (27,5%)

dos 109 pacientes. Além disso, a análise MLPA revelou em um caso a duplicação 8p23.

Leite et al. (2016), em Goiás, descreveram cinco pacientes com variabilidade fenotípica que apresentavam deleções ou duplicações recíprocas em 22q11.2 detectadas pela técnica de Análise Cromossômica por Microarranjo. A tecnologia *CytoScan* HD foi usada para detectar CNVs dos pacientes que tiveram indicação clínica de atraso global no desenvolvimento com cariótipo normal. Em seus resultados, foi observado no estudo três microdeleções e duas microduplicações na região 22q11.2.

Molck et al. (2017), em Campinas, analisaram por *microarray* cromossômico (CMA) 78 pacientes em que a deleção 22q11.2 não foi detectada pelas técnicas de FISH e/ou MLPA. Dentre as CC, foi observada a TOF em 40%, DSV em 22% e DAS em 8% dos casos. Em 9% dos pacientes foram observados dois desses três defeitos. O restante dos 21% dos casos apresentou outros defeitos cardíacos como TA, válvula aórtica bicúspide e PCA, dentre outros. Os autores identificaram CNVs clinicamente significativas (≥ 300 kb) em 10% dos casos, além de CNVs potencialmente relevantes em dois casos (duplicação de 993 kb em 15q21.1 e duplicação de 706 kb em 2p23.3).

Monteiro et al. (2017), em Belo Horizonte estudaram através da técnica de MLPA e SNP-*array*, 47 pacientes com idade variando entre dois meses a 19 anos (média 5,2 meses), portadores de CC sindrômica, que estavam internados na clínica pediátrica, CTI Neonatal e CTI Pediátrico. As alterações genômicas foram identificadas em 25,5% dos casos, sendo mais

frequentemente encontradas a deleção 22q11.2 e a deleção 7q11,23 (Síndrome de Williams-Beuren). As outras alterações mais raras associadas a CC sindrômica foram a deleção 14q32.33 e as duplicações 17q25.3, 15q11.2, 22q13.31,12p13.31. Os autores concluíram que o uso de MLPA como primeiro teste de triagem foi apropriado, pois essa técnica menos onerosa detectou 11 das 12 anormalidades genômicas (91,6%).

5.4 Características dos pacientes com a deleção 22q11.2 estudados

Podemos observar que nos pacientes desta casuística com deleção 22q11.2, não ocorreu uma distribuição semelhante entre os sexos, como descrito na literatura. Houve predomínio do sexo masculino (Tabela 3). Cabe salientar que, na maioria das imunodeficiências primárias, há uma predominância de acometimento no sexo masculino, devido ao tipo de herança genética, diferentemente do que ocorre na SD22q11.2 (Gennery et al., 2002; Kobrinsky & Sullivan, 2007).

Quanto a idade ao diagnóstico da deleção 22q11.2 entre os pacientes avaliados, observamos que variou de um dia a 330 dias (mediana de 55 dias) (Tabela 3). Isso evidencia a necessidade da investigação e elaboração de diretrizes para os sinais de alerta que detectam precocemente a síndrome, pois o óbito pode ocorrer nos primeiros meses de vida em decorrência de complicações relacionadas às CC e pela imunodeficiência (hipoplasia ou aplasia tímica), tornando-se fundamental o diagnóstico precoce por métodos citogenômicos.

5.5 Cardiopatias congênicas presentes nos pacientes com a deleção 22q11.2 estudados

No estudo aqui descrito, os resultados estão de acordo com a literatura, que constata a presença dos defeitos conotruncais na grande maioria dos pacientes em que foi detectada a deleção 22q11.2 (Gráfico 2). (Fomin et al., 2010; Gennery, 2012; Zhang et al., 2015; Campbell et al., 2018; Cohen et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Sullivan, 2019). Portanto, observamos em dois pacientes do estudo, cardiopatias não comumente descritas na SD22q11.2, como a DVSVD e drenagem anômala total de veias pulmonares (DATVP).

Conforme já descrito em vários estudos, os tipos anatômicos de defeitos cardíacos mais associados à SD22q11.2 pertencem ao subgrupo das alterações conotruncais. É importante destacar que as malformações cardíacas frequentemente associadas à deleção incluem a TOF (observada em 20 a 45% dos pacientes com a SD22q11), a IAA (em especial do tipo B, cuja interrupção se localiza entre as artérias subclávia e a carótida esquerdas (5 a 20%), a AP/CIV (10 a 25%) e o TA (5 a 10%). A CIV, usualmente perimembranosa ou subarterial, ocorre em 10 a 50% dos pacientes com a SD22q11 (Fomin et al., 2010; Gennery, 2012; Mlynarski et al., 2016; Guo et al., 2017; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018; Sullivan, 2019 Unolt et al., 2018).

Na pesquisa realizada por Belangero et al. (2009), os autores sugerem que a deleção 22q11.2 é mais frequente em pacientes portadores do quadro

clínico da síndrome, do que em pacientes portadores de cardiopatia conotruncal isolada. De acordo com a literatura, a frequência da deleção 22q11.2 em pacientes com cardiopatia conotruncal isolada é de cerca de 29%, bem menor do que a frequência de deleção entre os pacientes com cardiopatia associada a outros sinais clínicos (80-90%) (Goldmuntz et al., 1998; Matsuoka et al., 1998).

Cabe salientar que as CC mais encontradas na SD22q11.2, tais como a TOF, a TGA e o TA constituem a principal causa de óbito no primeiro ano de vida, correspondendo a 20% dos óbitos neonatais. Tal situação se agrava em locais onde há falta de assistência médica clínica e cirúrgica precoce, pois cerca de 50% dos portadores de CC precisam ser operados ainda no primeiro ano de vida (Acharya et al., 2004; McDonald-McGinn, 2018; Morrow et al., 2018).

Na avaliação realizada nesta casuística observamos que a CC mais relacionada a deleção 22q11.2 foi a AP/CIV (30%), sendo que os nossos dados são semelhantes ao que é descrito na literatura, em que a SD22q11.2 ocorre em aproximadamente 10 a 25% dos pacientes com AP/CIV. A EP foi a segunda malformação cardíaca mais encontrada, correspondendo a 20% dos pacientes com a deleção 22q11.2. Vale ressaltar que essa patologia pode ser valvar ou localizar-se logo abaixo da valva na via de saída (infundibular) e comumente é um componente da TOF (Hofbeck et al., 1999; Marino & Digilio, 2000; Carotti et al., 2003; Mahle et al., 2003; Ros et al., 2011; McDonald-McGinn, 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

Dados de literatura demonstram que os pacientes portadores de AP possuem ecocardiograma com achados semelhantes da TOF, como o cavalgamento da valva aórtica sobre o septo trabecular, desvio ântero-superior do septo infundibular e o aumento do calibre da aorta ascendente. Dessa forma, se diferenciam pela presença de uma via de saída do ventrículo direito fechada, sem fluxo anterógrado e sem a detecção de uma valva pulmonar (Zielinsky, 1997).

Na casuística aqui estudada, a detecção da deleção 22q11.2 ocorreu em um paciente com TOF. A prevalência da deleção 22q11.2 entre os pacientes com TOF pode variar de 20 a 45%. Há três tipos clinicamente distinguíveis de TOF, ou seja, com EP, AP com canal arterial patente e AP com colaterais aortopulmonares. Vale ressaltar que a deleção 22q11.2 está associada com todos os tipos de TOF (Gioli et al., 2008; McDonald-McGinn, 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

Este trabalho demonstra que os diagnósticos anatômicos que apresentaram maior frequência dentre as cardiopatias congênitas acianogênicas nos pacientes em que foi detectada a deleção 22q11.2 foram a EP, CoAo, DVSVD e DATVP (Gráfico 2).

O único paciente com TA e portador da SD 22q11.2 evoluiu à óbito com três meses de vida após sepse de repetição e choque séptico refratário. Vale ressaltar que a deleção 22q11.2 está frequentemente presente nos pacientes com TA, em 5 a 10% (Marino et al., 1999; Byrne et al., 2014; McDonald-McGinn, 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

É interessante destacar que não tivemos a IAA associada a deleção 22q11.2, visto que a síndrome é descrita em 5 a 20% dos pacientes com a síndrome. A associação entre a SD22q11.2 e a IAA tipo B está bem documentada na literatura. Embora uma pequena série de casos tenha levantado a questão de se a deleção 22q11.2 estava associada a um risco aumentado de válvula troncral displásica (Marino et al., 1999). Portanto, um estudo observacional de base populacional não encontrou uma associação entre a deleção 22q11.2 com displasia, estenose ou insuficiência da valva troncular (McElhinney et al., 2003; McDonald-McGinn, 2018; Unolt et al., 2018; Sullivan, 2019).

5.6 Importância do diagnóstico precoce da SD22q11.2 pela técnica de MLPA

É importante salientar a ocorrência do aumento do diagnóstico precoce das CC, através do aperfeiçoamento do diagnóstico pré-natal. Na literatura internacional, 43,6% dos cardiopatas são diagnosticados durante a primeira semana de vida, 70% até os 6 meses de idade, e até 86% até os dois anos de idade (Stephensen et al., 2004).

No estudo aqui apresentado, foi demonstrada a importância da realização da técnica de MLPA para o diagnóstico precoce da SD22q11.2 em pacientes com CC no primeiro ano de vida. Podemos observar que a detecção dessa deleção ocorreu em 8,5% dos pacientes, superando as taxas descritas na literatura. Este achado possivelmente deve-se às características dos pacientes incluídos na casuística, a maioria atendida em um hospital terciário

de referência nacional (Goldmuntz, 2005; Fomim et al., 2010; Gennery, 2012; Zhang et al., 2015; Mlynarski et al., 2016; Guo et al., 2017, Kruszka et al., 2018; McDonald-McGinn, 2018; Mutlu et al., 2018; Sullivan, 2019).

Nosso propósito é destacar que a suspeita da SD22q11.2 deve ser levantada em portadores de CC, especialmente com defeitos conotruncais, na presença de hipocalcemia e dismorfismos faciais. No entanto, ainda representa um grande desafio a sua grande variabilidade de características clínicas e comportamentais, isso muitas vezes, pode retardar o diagnóstico, o tratamento adequado, o aconselhamento genético, o acompanhamento multidisciplinar e a identificação de outras anomalias associadas (Matsuoka et al., 1998; McDonald-McGinn et al., 1999; Goldmuntz, 2005, Karayiorgou et al., 2010; Maggadottir et al., 2013; Grassi et al., 2014; McDonald-McGinn, 2018; Mutlu et al., 2018; Sullivan, 2019).

Os pacientes com SD22Q11.2 portadores de CC grave têm falecido antes de ter acesso a um hospital terciário, levando à subestimativa de sua frequência. É importante salientar que, no Brasil, ao contrário de alguns países desenvolvidos, o aborto seletivo para malformações não é permitido por lei. Isso justificaria também a diferença encontrada ao compararmos a nossa casuística com as taxas de detecção da deleção 22q11.2 descritas na literatura (Goldmuntz, 2005; Fomim et al., 2010; Gennery, 2012; Mlynarski et al., 2016; Guo et al., 2017).

Os neonatologistas, cardiologistas pediátricos e cirurgiões cardíacos devem estar cientes das peculiaridades e dos cuidados associados à

SD22q11.2. Como podemos observar, os pacientes afetados frequentemente apresentam alterações envolvendo vários sistemas e necessitam de um número elevado de intervenções clínicas e de hospitalização ao longo de sua vida. Cabe salientar que os pacientes com a SD22q11 apresentam os mais altos índices de mortalidade, quando comparados a outras síndromes genéticas (como a síndrome de Down) e a casos não sindrômicos de CC (Carotti et al., 2008; Formigari et al., 2009; McDonald-McGinn, 2018; Palmer et al., 2018; Sullivan, 2019).

Como demonstrado, a identificação da SD22q11.2 depende diretamente de técnicas laboratoriais de citogenômica que não são realizadas de rotina no Brasil devido ao seu alto custo, o que leva a subdiagnóstico da doença. Frente à importância dessa síndrome de alta complexidade, torna-se imprescindível realizar a triagem para a sua detecção precoce numa faixa etária distinta, no primeiro ano de vida, baseando-se em um conjunto de características clínicas e laboratoriais (Grassi et al., 2014). Cabe salientar que nessa faixa etária a morbimortalidade é elevada, principalmente pelo quadro de infecções de repetição, decorrentes da aplasia ou hipoplasia tímica e pela CC (Rosa et al., 2008; Rosa et al., 2011; Grassi et al., 2014)

Os trabalhos mostram a necessidade da implantação de mais centros com capacidade de desenvolver essas técnicas, visando elevar o índice de detecção dos pacientes com a SD22q11.2 (Rosa et al., 2008; Rosa et al., 2011; Grassi et al., 2014).

5.7 Detecção de outras alterações e/ou duplicações durante a investigação da deleção 22q11.2

Neste estudo é importante destacar também, a detecção de outras deleções e/ou duplicações durante a investigação da deleção 22q11.2 em seis pacientes, e assim demonstrando a elevada taxa de síndromes gênicas subdiagnosticadas que podem estar associadas a CC (Tabela 4). A idade ao diagnóstico variou de um dia a 44 dias (mediana de 5 dias) e todos são do sexo masculino (Tabela 4). As CC associadas à essas alterações genômicas foram a TOF (deleção 1p36), DVSVD e hipoplasia de VD (deleção 8p23), CoAo (duplicação de 7p), AP (duplicação de 8q24) e IAA (duplicação de 12p) (Gráfico 3).

Identificamos um paciente com a deleção 1p36, portador de TOF. Este achado demonstra a importância da investigação da deleção 1p36 nos portadores desta CC. Como esses pacientes podem evoluir com quadro clínico grave, o diagnóstico precoce torna-se fundamental visando à redução da morbidade e mortalidade.

Na literatura a deleção 1p36 é descrita como a síndrome de microdeleção terminal mais comum, com incidência estimada em 1:5000 indivíduos. O fenótipo consiste em atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual em graus variáveis (100%), hipotonia (95%), convulsões (44-58%), malformação cerebral (88%), microcefalia (65%), malformações cardíacas (71%), alterações visuais (52%) e diminuição da acuidade auditiva (41%) (Gajecka et al., 2007; Nicoulaz et al., 2011; DiDonato et al., 2014). Os defeitos cardíacos congênitos estruturais são comuns na deleção distal de 1p36. A

TOF é a cardiopatia mais frequente nesses pacientes, ocorrendo em aproximadamente 8% dos casos (Nicoulaz et al., 2011).

Os pacientes podem apresentar também características faciais como sobrelance estreitas, olhos fundos, hipoplasia de face média, ponte nasal alargada e achatada, além do filtro nasal longo com queixo proeminente. É comum a presença de alterações cerebrais: ventriculomegalia, hidrocefalia, agenesia do corpo caloso, leucoencefalomalácia, atrofia cortical (Gajecka et al., 2007; Nicoulaz et al., 2011).

Essas alterações genômicas são altamente diversificadas, compreendendo deleções terminais simples, intersticiais e rearranjos complexos. Os principais genes localizados nessa região são o *Matrix metalloproteinase-23 (MMP23B)*, responsável pelo retardo do fechamento da sutura craniana; *Gamma-aminobutyric acid receptor subunit delta (GABRD)*, que está relacionado à presença de anomalias envolvendo o desenvolvimento neurológico; *Skywalker (SKY)*, possivelmente responsável pelos dismorfismos faciais, hipotonia, atraso motor e atraso mental; *KCBNAB2* relacionado às convulsões que podem ocorrer nesses pacientes (Nicoulaz et al., 2011).

Entre os pacientes avaliados observou-se a deleção 8p23 em dois pacientes do estudo. As cardiopatias encontradas foram DVSVD com duplo infundíbulo e atresia tricúspide com hipoplasia de ventrículo direito. O diagnóstico foi realizado na primeira semana de vida, sendo importante

destacar que esses pacientes não apresentavam anomalias clínicas características.

Atualmente sabe-se que vários autores têm sugerido que a deleção 8p pode ser mais frequente do que o número relativamente baixo de casos descritos na literatura. Os resultados de estudos de correlação genótipo-fenótipo de indivíduos com defeitos cardíacos congênitos destacaram a região cromossômica 8p23.1 como uma região crítica para a morfogênese cardíaca. A porção proximal da banda p23.1 contém o gene *GATA Binding Protein 4* (GATA4) que codifica um fator de transcrição que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do coração em seres humanos. As CC nas deleções deste tipo podem ser explicadas pela haploinsuficiência do gene GATA4 (Hutchinson et al. 1992; Bhatia et al., 1999; Paez et al., 2008; Ozgen et al., 2009; Ballarati et al., 2011).

A deleção 8p23.1 pode estar associada a um espectro de anomalias clínicas que incluem dismorfismo facial, microcefalia, atraso do crescimento intrauterino, alterações neuropsiquiátricas, déficit intelectual e CC, sendo as mais frequentes: defeitos do septo atrioventricular, defeitos septais atriais, defeitos do septo ventricular, EP e TOF (Hutchinson et al., 1992; Wu et al., 1996; Paez et al., 2008). Há relatos de deleções intersticiais e terminais do braço curto do cromossomo 8 (mais frequentemente com quebras nas bandas 8p21 a 8p23), bem como deleções ocorrendo em associação com duplicações. O quadro clínico variável deve-se à extensão da deleção ou à localização da região do ponto de quebra (Paez et al., 2008).

Um estudo recente sugere que outro gene, *SRY-Box 7 (SOX7)*, expresso no coração e que funciona na mesma via que o *GATA4*, tem também um papel importante no desenvolvimento cardíaco. Este gene está localizado na porção distal do braço curto do cromossomo 8, e nos casos de deleção 8p23, a haploinsuficiência deste gene tem também sido implicada nas anomalias cardíacas (Long et al., 2013).

O déficit intelectual é o achado mais frequentemente descrito neste tipo de deleções. Parece existir uma relação entre o tamanho da região deletada no cromossomo 8 e o grau de comprometimento intelectual, sendo que as deleções terminais mais distais à banda 23.1 estão associadas a um menor comprometimento intelectual (Hutchinson et al. 1992; Gilmore et al., 2001).

Podemos observar também, a presença de déficits motores, atraso da linguagem e alterações comportamentais (hiperatividade, déficit de atenção e agressividade). As deleções do gene *SOX7* também têm sido propostas como tendo um papel no atraso do desenvolvimento e, possivelmente, nas características dismórficas presentes nos indivíduos com deleção 8p23 (Digilio et al., 1993; Paez et al., 2008; Long et al., 2013).

Vários estudos têm tentado encontrar uma região crítica para os problemas de comportamento associados com deleções 8p23 e propôs um gene, *TNKS* (Tankyrase 1), como o responsável pelos problemas de comportamento e dificuldades de aprendizagem. O gene *MCPH1* (microcefalina 1) tem sido implicado no autismo, microcefalia e atraso do

desenvolvimento, e também está localizado na banda p23 do cromossoma 8 (Ozgen et al., 2009).

No presente estudo, foi detectada em um paciente a duplicação em 7q11.2. Ao contrário da deleção de 1p36 e 8p23, nesse tipo de alteração genômica não existe uma maior correlação com CC. O paciente incluído no estudo tem CoAo, sendo o diagnóstico realizado com sete dias de vida e ele não apresentava malformações aparentes.

Os autores relatam que as duplicações em 7q11.2 ocorrem em menor frequência quando comparado às deleções na mesma região. Embora as duplicações do braço longo do cromossomo 7 sejam bem conhecidas, essas alterações genômicas são raras e a sua presença geralmente resulta na aparição de múltiplas anormalidades congênitas e déficit cognitivo. As características clínicas dependerão do tamanho do segmento duplicado e da possível presença de deleções cromossômicas concomitantes, secundária a rearranjos cromossômicos (Shojaei et al., 2013; Ruiz-Botero & Pachajoa, 2016).

É importante destacar que é uma patologia rara, onde há aproximadamente 54 casos descritos na literatura. As duplicações parciais 7q foram classificadas em quatro grupos de acordo com a região cromossômica afetada (Ruiz-Botero & Pachajoa, 2016).

O grupo 1 inclui aqueles pacientes com duplicação completa do braço longo, cujas características clínicas incluem: hipertelorismo, orelhas baixas,

micrognatia, pescoço curto, anormalidades do trato geniturinário e morte precoce (Scelsa et al., 2008; Alfonsi et al., 2012).

No grupo 2 há a presença de duplicações de grandes segmentos, começando em bandas proximais até chegar ao telômero. A expressão clínica e a gravidade são altamente variáveis. Os achados mais comuns incluem fissura palatina, retrognatia, e anormalidades do trato urinário (Scelsa et al., 2008; Alfonsi et al., 2012).

O grupo 3 é composto por duplicações intersticiais de tamanho variado. As alterações clínicas descritas são macrocefalia, testa proeminente, hipertelorismo, baixa implantação das orelhas, pescoço curto e baixo peso ao nascer (Scelsa et al., 2008; Alfonsi et al., 2012).

No grupo 4 ocorre uma duplicação distal, sendo as características fenotípicas mais comuns a macrocefalia, testa proeminente, nariz pequeno, baixa implantação das orelhas e atraso importante do desenvolvimento neuropsicomotor (Scelsa et al., 2008; Alfonsi et al., 2012).

No estudo aqui descrito, no paciente em que foi detectada a duplicação 8q24, será realizado acompanhamento neurológico conforme a sua evolução clínica, pois na região 8q24 estão presentes genes relacionados à epilepsia, sendo que alterações nessa região do genoma podem ser responsáveis pela evolução com crises tônicas, por vezes seguidas pela fase clônica generalizada. Um dos genes envolvidos é o KCNQ3 (Potassium Channel, Voltage Gated KQT – Like Subfamily Q. Member 3). A evolução geralmente é benigna, com remissão no primeiro ano de vida. É importante destacar, que

nesse tipo de alteração genômica, não há uma correlação maior com alguns tipos específicos de CC. O paciente da nossa casuística tem AP e sem outros achados clínicos (Hu et al., 2015).

A outra alteração genômica detectada em um paciente com IAA foi a duplicação de 12p. Dados de literatura demonstram que esta alteração genômica está relacionada à Síndrome de Pallister-Killian (PKS), na qual os pacientes exibem alterações craniofaciais características, defeitos cardíacos congênitos, atraso de desenvolvimento variável, comprometimento intelectual, convulsões, hipotonia, surdez, orelhas largas com lóbulos espessos protusos, pescoço curto, mãos largas com dedos curtos, encurtamento desproporcional de braços e pernas, presença de diferenças cutâneas pigmentares, hérnia diafragmática congênita e outras anormalidades sistêmicas. O PKS é relacionado à trissomia ou à tetrassomia de genes específicos presentes na região duplicada. O fenótipo PKS é frequentemente observado em indivíduos com duplicações completas ou parciais de 12p (trissomia 12p em vez de tetrassomia 12p), como resultado de uma duplicação intersticial ou translocação desequilibrada (Izumi et al., 2012).

Em todos os 6 casos com outras alterações genômicas, a correlação fenótipo-genótipo é de grande importância para a abordagem clínica, diagnóstica e terapêutica. Todavia, certos fenótipos parecem estar associados a duplicações de regiões cromossômicas particulares.

Atualmente sabe-se que os avanços da medicina genômica tem permitido uma correlação cada vez mais acurada entre a estrutura do DNA e

o fenótipo clínico. Como podemos observar no presente estudo, as técnicas citogenômicas permitem o diagnóstico precoce de diferentes síndromes envolvendo deleções e duplicações em cardiopatas. Cabe salientar que o conhecimento dos testes citogenômicos e a sua aplicação nas diversas áreas da medicina permitirão a escolha apropriada para o exame que será solicitado: MLPA, genotipagem por *array*, sequenciamento por painel ou exoma.

Estudos da literatura recomendam que todos os RN ou crianças que apresentem CC e dismorfismo ou outras anomalias congênitas sejam avaliados para deleção 22q11.2. Além disso, desequilíbrios genômicos de outras regiões cromossômicas, inclusive 10p12-p15, 4q21-q35, 8p21-p23, 17p13 e 18q21, podem ser encontrados em pacientes com suspeita clínica da SD22q11.2 e sem deleção 22q11.2 (Ziolkowska et al., 2008; Molck et al., 2015).

A investigação das anormalidades genômicas associadas a CC nesses pacientes é imprescindível para obter um perfil inequívoco e precoce da etiologia além de permitir uma melhor compreensão da alta variabilidade fenotípica nesses pacientes.

Como a amostra desse estudo apenas incluiu pacientes internados em serviços de cardiologia pré cirúrgicos, acreditamos que o percentual encontrado de alterações genômicas possa ser maior, explicando a diferença do encontrado na literatura.

Para finalizar, acreditamos que este estudo sirva para demonstrar a importância da investigação citogenômica precoce em pacientes com CC para avaliar o prognóstico, os riscos de recorrência e ao mesmo tempo, permitir tratamento, seguimento e aconselhamento familiar adequado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A proposta inicial deste estudo foi a realização da triagem citogenômica em recém-nascidos e lactentes com CC utilizando a técnica de MLPA. Ao longo da pesquisa, foi observada a presença de outras alterações genômicas nesses pacientes cardiopatas e tal fato demonstrou o subdiagnóstico de deleções e/ou duplicações que podem estar associadas às CC. Dessa forma, o nosso objetivo foi ampliado para a investigação dessas outras alterações citogenômicas, além da deleção 22q11.2.

O avanço rápido da aplicação dos testes citogenômicos na clínica torna imperioso que médicos envolvidos na abordagem das cardiopatias congênitas considerem que muitos pacientes podem ser portadores de anomalias cromossômicas ou mesmo gênicas.

Como a SD22q11.2 é uma doença subdiagnosticada no Brasil e com frequência elevada na literatura mundial, torna-se fundamental a divulgação dos sinais de alerta para a SDG, visando à redução da mortalidade e morbidade.

É importante destacar que as malformações cardíacas conotrunciais representam achado de grande importância clínica, pois são frequentemente associadas às síndromes genéticas.

Conhecer a causa genética destas condições é fundamental para a adequada avaliação e manejo clínico, tanto deles como de suas famílias, pois irá permitir um diagnóstico, que em contrapartida poderá trazer conforto para a família. Além de contribuir para prever a evolução clínica com relativa segurança e delinear um plano de tratamento adequado, com o objetivo de melhorar o estado geral desta criança e a sua qualidade de vida e da sua família. Assim o reconhecimento da síndrome não apenas permite identificar e tratar anormalidades associadas, mas também influencia no aconselhamento genético aos familiares.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O estudo da detecção da deleção do 22q11.2 em RN e lactentes no primeiro ano de vida portadores de cardiopatia congênita nos permitiu chegar à seguinte conclusão:

- Foi possível investigar e detectar alterações genômicas presentes em RN e lactentes portadores de CC com a técnica MLPA em um número maior do que a literatura aponta. Isso demonstra a importância da investigação citogenômica precoce em pacientes com CC grave para avaliar o prognóstico, os riscos de recorrência e, ao mesmo tempo, permitir seguimento e terapêuticas adequados, visando melhora na qualidade de vida dessas crianças.

8 ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO CAPPesq

1041

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0911/11

Título: DETECÇÃO PRECOCE DE IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS EM RECÉM-NASCIDOS E LACTENTES COM CARDIOPATIA

Pesquisador Responsável: Magda Carneiro-Sampaio

Pesquisador Executante: Marcília Sierro Grassi

Co-autores: Ângela Midori Matuhara, Cláudia Augusta Zago, Cristina Miuki Abe Jacob, Chong Ae Kim, Jerusa Marilda Arantes, Leslie D Kulikowski, Maria Esther Jurfest Ceccon, Vera Lúcia Jornada Krebs, Werther Brunow De Carvalho

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: PEDIATRIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 01/02/2012, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 06 de Fevereiro de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Leme
15/2/12

ANEXO B – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A CRIANÇA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Deteção Precoce de Imunodeficiências Primárias em Recém-Nascidos e Lactentes com Cardiopatia**

PESQUISADOR: Magda Carneiro- Sampaio

CARGO/FUNÇÃO: Professora Titular INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 21327

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO x☒

RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

1 REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO RESPONSÁVEL LEGAL DO PACIENTE, SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e objetivos da pesquisa

O objetivo da pesquisa é fazer o diagnóstico precoce de doenças que podem diminuir as defesas do organismo dos bebês, fazendo com que ocorra maior chance do seu filho (a) ter infecções graves. Os bebês que têm estas doenças podem nascer com problema no coração, alterações na face, atraso no desenvolvimento e alterações neurológicas. O tratamento adequado e o aconselhamento genético dos pais são fundamentais, sendo por este motivo que solicitamos a sua permissão para ele fazer parte desta pesquisa.

2. Procedimentos que serão utilizados, incluindo a identificação dos procedimentos experimentais.

O que a senhora (ou senhor) tem que autorizar é a coleta de uma amostra de sangue do seu filho (a), a qual será coletada de uma veia do braço por uma enfermeira experiente.

Se o resultado do exame confirmar alguma das doenças que diminuem as defesas, os pais também serão convocados para realizar o mesmo exame do bebê, uma vez que estas doenças são hereditárias. A análise do sangue será realizada no Laboratório de Investigação Médica de Pediatria Clínica (LIM-36), HC-FMUSP.

3. Desconfortos e riscos esperados. Quais são os possíveis efeitos colaterais, riscos e desconfortos decorrentes da participação?

O procedimento que é a coleta de uma amostra de sangue de uma veia do braço do seu filho (a) será realizado por enfermeira experiente e o bebê poderá sentir um pouco de dor na hora da punção, porém depois esta dor passa.

4. Benefícios que poderão ser obtidos

O benefício será realizar o diagnóstico precoce no bebê e tratar as alterações passíveis de tratamento e realizar o aconselhamento genético da família com médicos especializados.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Nenhum.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Nenhum.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas

O principal investigador é a Professora Magda Carneiro Sampaio, que pode ser encontrada no endereço Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 647 Telefone (s):26618606. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16,17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Sim e isso não irá afetar o tratamento que o seu filho (a) deve receber

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente

Sim

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Sim

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Sim

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Deteção Precoce de Imunodeficiências Primárias em Recém-Nascidos e Lactentes com Cardiopatia**”

Eu conversei com a Professora Magda Carneiro-Sampaio sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS RESPONSÁVEIS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS RESPONSÁVEIS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Deteção Precoce de Imunodeficiências Primárias em Recém-Nascidos e Lactentes com Cardiopatia**

PESQUISADOR: Magda Carneiro- Sampaio

CARGO/FUNÇÃO: Professora Titular INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 21327

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☒RISCO MAIOR ☐

3.DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

1 REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO RESPONSÁVEL LEGAL DO PACIENTE, SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e objetivos da pesquisa

O objetivo da pesquisa é o diagnóstico precoce de doenças que podem diminuir as defesas do organismo dos bebês, fazendo com que eles tenham predisposição para ter infecções. Como os bebês que tem estas doenças podem nascer com problema no coração, é por este motivo que solicitamos a sua permissão para ele fazer parte desta pesquisa.

2. Procedimentos que serão utilizados, incluindo a identificação dos procedimentos experimentais.

O que a senhora (ou senhor) tem que autorizar é a coleta de uma amostra de sangue sua, a qual será coletada de uma veia do braço por uma enfermeira experiente. A análise do sangue será realizada no Laboratório de Investigação Médica de Pediatria Clínica (LIM-36), HC-FMUSP.

3. Desconfortos e riscos esperados. Quais são os possíveis efeitos colaterais, riscos e desconfortos decorrentes da participação?

O procedimento que é a coleta de uma amostra de sangue de uma veia do braço do seu filho (a) será realizado por enfermeira experiente e o bebê poderá sentir um pouco de dor na hora da punção, porém depois esta dor passa.

4. Benefícios que poderão ser obtidos

O benefício será realizar o diagnóstico precoce no bebê e tratar as alterações passíveis de tratamento e realizar o aconselhamento genético da família com médicos especializados.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

Nenhum.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Nenhum.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas

O principal investigador é a Professora Magda Carneiro- Sampaio, que pode ser encontrada no endereço Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 647 Telefone (s):26618606. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16,17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Sim e isso não irá afetar o tratamento que o seu filho (a) deve receber

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente

Sim

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Sim

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Sim

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Detecção Precoce de**

Imunodeficiências Primárias em Recém-Nascidos e Lactentes com Cardiopatia”

Eu conversei com a Professora Magda Carneiro-Sampaio sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO D – PROTOCOLO: DETECÇÃO PRECOCE DE IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS EM RECÉM-NASCIDOS E LACTENTES COM CARDIOPATIA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP

Instituto da Criança
Prof. Pedro de Alcântara

Coordenação: Prof^a Dr^a Magda Carneiro Sampaio

Aluna: Marcília Sierro Grassi

Participantes: Cristina Miuki Abe Jacob, Leslie Domenici Kulikowski, Maria Esther Jurfest Ceccon, Vera Lúcia Jornada Krebs, Chong Ae Kim, Werther Brunow de Carvalho

I- IDENTIFICAÇÃO:

Nome:

Pront:

Data de nasc: / /

Sexo: M ☐ F ☐

Data de admissão: / / Idade: dias

Procedência:

Endereço: _____

Telefone: _____

II- ANTECEDENTES:

a) Maternos, obstétricos e paternos:

Idade: _____

Gesta: _____ Para: _____ Aborto: _____ Idade

Gest.: _____

Pré-Natal: S ☐ N ☐ nº consultas: _____

IG (DUM): _____ IG (USG): _____

Alcoolismo: S ☐ N ☐ Tabagismo: S ☐ N ☐
 _____ cigarros/dia

Drogas ilícitas: S ☐ N ☐

Interc.: S ☐ N ☐ tipo: DHEG ☐

Hipertensão art. crônica ☐

Pré-eclâmpsia ☐ sulfato de magnésio ☐

Diabetes gestacional ☐

Diabetes pré-gestacional ☐

Patologias placentárias ☐

Outra doença materna crônica ☐ _____

Gravidez: Simples ☐ Múltipla ☐ _____

Parto: Local de nascimento: Domicílio ☐ Hospital ☐

Tipo: N ☐ C ☐ F ☐ Interc.: S ☐ _____ N ☐

Rupt. membr.: no ato ☐ Precoce ☐ tempo: _____

Idade do pai: _____

b) Antecedentes familiares:

Consaguinidade entre os pais: S ☐ N ☐

Origem geográfica da família materna:

Origem geográfica da família paterna:

História de cardiopatia na família: S ☐ N ☐

História de imunodeficiência: S ☐ N ☐

História de mortes precoces por infecção: S ☐ N ☐

c) Recém-nascido:

Reanimação na sala de parto: S ☐ N ☐

O₂ inalatório ☐

VPP com AMBU e máscara ☐

VPP com intubação traqueal ☐

Massagem cardíaca ☐

Uso de medicações ☐

Peso nasc.: _____ Compr.: _____ P.C.: _____

Apgar: _____

Capurro: _____
GIG ☐

Classif: AIG ☐ PIG ☐

New Ballard: _____

III - EXAME FÍSICO INICIAL:

Peso: _____ Compr.: _____ PC: _____

Temp. axilar: _____ FC: _____
FR: _____

PA: _____ PAM: _____

Estado geral: BEG ☐ REG ☐ MEG ☐

Estado de hidratação: Hidratado: ☐ Desidratado: ☐

Cianose: S ☐ N ☐

Palidez cutânea: S ☐ N ☐

Icterícia: S ☐ N ☐

Pletora: S ☐ N ☐

Petéquias: S ☐ N ☐

Hemangioma: S ☐ N ☐

Choro: Fraco ☐ Forte ☐ IOT ☐

Edema: S ☐ N ☐ Escleredema ☐

Apnéia: S ☐ N ☐

Perfusão periférica: Boa ☐ Reg. ☐ Má ☐

III-A) AVALIAÇÃO CARDIOLÓGICA:

Sopro cardíaco: S ☐ N ☐ Sistólico ☐ Diastólico ☐ Contínuo ☐

Taquipnéia: S ☐ N ☐

Cianose: S ☐ N ☐

Sudorese: S ☐ N ☐

Pulsos simétricos e amplitude normal nos 4 membros: S ☐ N ☐

Hepatomegalia: S ☐ N ☐

Arritmia: S ☐ N ☐
 Estalido: S ☐ N ☐
 Abaulamento precordial: S ☐ N ☐
 Turgência jugular: S ☐ N ☐
 Ictus visível: S ☐ N ☐
 RX de tórax: Normal ☐ Aumentada ☐ Outras alterações ☐
 ECG: Normal ☐ Alterado ☐ _____
 ECO: Normal ☐ Alterado ☐ _____
 Cirurgia paliativa: S ☐ N ☐ _____ dias de vida
 Cirurgia corretiva: S ☐ N ☐ _____ dias de vida
 Tetralogia de Fallot: S ☐ N ☐
 Defeito no septo: S ☐ N ☐
 Tronco arterial: S ☐ N ☐
 Interrupção do arco aórtico: S ☐ N ☐
 Outra cardiopatia: _____
 Diurético ☐ _____ Drogas vasoativas ☐ _____
 Cardiotônico ☐ _____

III-B) AVALIAÇÃO PULMONAR:

MV: Normal ☐ Aumentada ☐ Ausente ☐

III-C) AVALIAÇÃO ABDOMINAL:

Distensão abdominal: S ☐ N ☐
 Hepatomegalia: S ☐ N ☐
 Esplenomegalia: S ☐ N ☐
 Ascite: S ☐ N ☐
 Lojas renais: livres ☐ ocupadas ☐
 Coto umbilical: S ☐ N ☐ Queda (dias após o parto): _____

III-D) AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA:

Atividade: ativo ☐ letárgico ☐

Tônus: normal ☐ diminuído ☐ aumentado ☐

Reflexos arcaicos: normais ☐ alterados ☐

Reflexos profundos: normais ☐ alterados ☐

Fontanela bregmática: normal ☐ abaulada ☐ deprimida ☐

Convulsão: S ☐ N ☐

Tremores: S ☐ N ☐

Hipotonia cervical: S ☐ N ☐

Opistótono: S ☐ N ☐

USG de crânio: S ☐ N ☐

EEG: S ☐ N ☐

III-E) ALTERAÇÕES FACIAIS:

Estrabismo: S ☐ N ☐

Catarata: S ☐ N ☐

Hipertelorismo: S ☐ N ☐

Hipertelorismo: S ☐ N ☐

Defeito no palato: S ☐ N ☐

Micrognatia: S ☐ N ☐

Retrognatia: S ☐ N ☐

Protrusão da língua: S ☐ N ☐

Lábio leporino: S ☐ N ☐

Outras anormalidades da língua: S ☐ N ☐

Implantação das orelhas: normal ☐ baixa ☐

Apêndice pré-auriculares: S ☐ N ☐

Malformação mandibular: S ☐ N ☐

Outras malformações: _____

III-F) INFECÇÕES:

Sepse bacteriana: S ☐ N ☐ Nº de episódios ☐ Agentes etiológicos: _____

Sepse fúngica: S ☐ N ☐ Nº de episódios ☐ Agentes etiológicos: _____

Infecção viral: S ☐ N ☐ Nº de episódios ☐ Agentes etiológicos _____

Pneumonia: S ☐ N ☐

Meningite: S ☐ N ☐

Enterocolite: S ☐ N ☐

Infecção urinária: S ☐ N ☐

Infecção cutânea: persistente: S ☐ N ☐

Monilíase oral persistente: S ☐ N ☐

Outras infecções: _____

IV- DIAGNÓSTICOS:

RNT ☐ RNPT ☐ AIG ☐ PIG ☐
GIG ☐

Cardiopatias congênitas _____

Distúrbios metabólicos _____

V- PROCEDIMENTOS E TERAPÊUTICA:

Oxigenoterapia:

Incubadora com O₂ ☐ Halo ☐

CPAP Nasal ☐ Intubação oro-traqueal ☐

Vent. Mecânica ☐ Tempo: _____

Hemoderivados: S ☐ N ☐

Gamaglobulina: S ☐ N ☐

GMCSF: S ☐ N ☐

NPP: S ☐ N ☐ Tempo: _____

Cateteres: S ☐ N ☐ umbilical ☐ Periférico ☐ Central ☐
Tempo: _____

Drenos: S ☐ N ☐

Antibióticos: S ☐ N ☐

Nº: < 4 ☐ ≥ 4 ☐ Duração: _____

Drogas vasoativas: S ☐ N ☐

Sedativos: S ☐ N ☐

Antifúngicos: S ☐ N ☐ Duração: _____

Outros: _____

VI- EXAMES LABORATORIAIS:

DATA/ DIAS DE VIDA			
Hemograma			
Nº leucócitos			
Nº linfócitos absoluto			
Nº linfócitos %			
Plaquetas			
PCR			
Hemocultura			
Urocultura			
Cálcio total/ cálcio iônico			
Fósforo/ Magnésio			
T3/ T4/ TSH			
PTH			
Imunoglobulinas (se > 3 meses)			
IgG			
IgM			
IgA			
IgE			
Imunofenotipagem (se linfopenia)			

T totais (CD3)			
T auxiliares (CD4 ⁺)			
T citotóxicos (CD8 ⁺)			
B (CD19 ⁺)			
NK (CD16 ⁺ CD56 ⁺)			

VI- EXAMES CITOGENÉTICOS:

DATA	
TREC (Thymic recent emigrant cells)	
Triagem genômica quantitativa por MLPA	
FISH	

VII- EXAMES RADIOLÓGICOS:

DATA			
RX de tórax			
Presença do timo			
USG de crânio			
USG cervical			
F.O.			
E.E.G.			
Outros			

IX- EVOLUÇÃO:**ALTA**

Data:
Internação:

Idade:

Duração

ÓBITO:

Data:
Internação:

Idade:

Duração

Necrópsia:

ANEXO E - AUTORIZAÇÃO PARA O USO DE FOTOGRAFIAS

Eu, abaixo assinado, responsável legal pelo paciente

R.G. nº _____, conforme reza a Lei nº 5.988/73 dos Direitos Autorais, concedo permissão à Unidade de Neonatologia, Unidade de Alergia e Imunologia e a Unidade de Genética do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, para utilizar as minhas fotografias e/ou de meus parentes para:

a) Fins de ensino Sim () Não ()

a) Publicação em revistas científicas e/ou livros Sim () Não ()

Nome completo do responsável

R.G. n° _____

Assinatura

Data ____/____/____

ANEXO F – NOME (INICIAIS), REGISTRO (RG), IDADE, SEXO E *KITS* DE MLPA UTILIZADOS NAS 118 CRIANÇAS DO ESTUDO

Caso	Nome	RG/HC	Idade (dias)	Sexo M=1 F=2	P064	P036	P070	P250	P356	Procedência
1	RN M.M.	6187275D	0	1	NI	NI	NI	Del 8p23	NI	CTIN1
2	L.G.S.S.S.	55526491D	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
3	R.V.M.C.	55526655D	14	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
4	J.L.S.L.	55526740H	5	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
5	G.A.R.D.	55526181H	4	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
6	RN J.L.B.	55526960E	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
7	G.M.R.S.	55527080H	51	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
8	RN T.G.O.R.	6187733I	7	1	NI	Dup 7q	Dup 7q	NI	NI	CTIN1
9	F.R.B.	55524321F	109	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
10	RN A.M.S.	55527179I	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
11	I.P.M.S.	55519383K	209	1	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
12	M.P.P.	55527398G	20	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
13	S.G.S.	55528172K	56	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
14	D.D.M.G.R.	55528607G	14	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
15	V.S.S.	55528440J	13	1	Del 1p36	NI	Del 1p36	NI	NI	InCor
16	M.E.C.D.	55528602A	150	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
17	A.L.M.B.	55528765I	4	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
18	J.L.M.S.	55528157A	2	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
19	RN E.F.B.	6189547K	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN1
20	RN A.S.C.	6190177B	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN1
21	RN J.M.P.C.P.	6190105C	13	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN1
22	RN Z.A.P.	6190381H	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
23	RN G.C.S.	6190419F	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN1
24	M.E.R.S.	55529893D	3	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
25	T.V.A.S. B.	6182820C	267	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
26	RN R.A.M.	6190489G	2	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
27	J.G.A.O.	6190331A	2	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
28	K.R.T.A.	55530371E	60	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
29	J.M.R.	55530597G	113	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor

Caso	Nome	RG/HC	Idade (dias)	Sexo M=1 F=2	P064	P036	P070	P250	P356	Procedência
30	I.A.S.	55530201H	10	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
31	E.O.S.R.	55531400G	78	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
32	V.F.P.	55531453K	80	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
33	D.B.G.	55531605E	44	1	NI	Dup 12p	NI	NI	NI	InCor
34	K.H.G.A.	55531999F	6	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
35	A.R.C.S.	55742877D	65	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
36	E.G.S.F.	55740092A	180	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
37	L.L.C.	6192699H	30	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
38	RN P.R.S.M.	55532663F	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
39	Y.E.S.	55532762C	8	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
40	D.S.J.	55743465I	150	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
41	RN A.C.P.S.	6193583E	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
42	A.M.V.A.	55533847C	10	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
43	D.B.S.	55533750C	103	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
44	I.A.S.S.	6194167G	7	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
45	RN I.B.C.	55534308J	5	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
46	E.K.P.S.	55739393D	330	1	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
47	RN A.G.B.	55535148A	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
48	RN M.D.A.S.	55535181G	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
49	I.R.O.A.	55744579D	16	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
50	RN E.B.O.	55535252K	1	1	NI	NI	Dup 8q24	NI	NI	InCor
51	M.V.B.	55739513I	300	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
52	RN G.M.S.	6195493G	1	1	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	CTIN2
53	E.S.D.S.	6195585D	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
54	T.P.	6196041B	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
55	M.V.T.A.	55744169A	180	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
56	J.V.M.P.	55536014B	191	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
57	RN R.R.A.	6196457J	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
58	RN G.A.R.	55536208D	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
59	RN E.C.P.	6196433I	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
60	RN E.A.B.G.	6196637H	1	1	NI	NI	NI	Del 8p23		CTIN2
61	K.V.C.S.	55536378A	32	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor

Caso	Nome	RG/HC	Idade (dias)	Sexo M=1 F=2	P064	P036	P070	P250	P356	Procedência
62	M.B.G.F.	55536592D	30	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
63	L.W.S.S.B.	55537381K	28	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
64	M.C.R.V.	55535496I	27	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
65	E.D.B.P.	55537129G	14	1	Del 22q11	Del 7p	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor - ÓBITO
66	RN G.A.R.T.	14045466K	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
67	RN N.S.G.	55537471J	4	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
68	L.A.M.	55537597E	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
69	M.J.S.	55538339B	11	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
70	M.V.N.S.	14046134G	28	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
71	D.M.C.D.	55537513K	126	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
72	RN R.A.H.M.	55538529H	8	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
73	L.A.F.	55538722G	42	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
74	V.R.M.A.	55538681E	2	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
75	C.C.S.	14050537A	29	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
76	E.A.G.S.	55538033I	120	2	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
77	A.V.A.S.	14050820J	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
78	Y.V.S.B.	55539243D	2	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
79	D.P.O.	55539300D	25	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
80	J.S.B.	6198470A	3	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2 - ÓBITO
81	RN L.C.M.	14053908K	10	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
82	G.S.O.	14049328E	32	1	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
83	A.J.S.	55539038J	22	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
84	C.F.L.	6198320I	5	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
85	R.M.C.	55539580E	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
86	S.S.O.	55539690I	21	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
87	L.C.L.	55540695J	60	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
88	I.P.Q.	55747980A	90	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
89	RN E.O.P.	14061986D	6	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
90	RN J.F.S.	14063714C	17	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
91	D.A.F.	55541917D	27	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
92	A.J.F.M.	55541998A	45	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
93	G.G.J.	6179818B	120	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor

Caso	Nome	RG/HC	Idade (dias)	Sexo M=1 F=2	P064	P036	P070	P250	P356	Procedência
94	RN A.C.	6181910G	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
95	RN D.T.S.	6187725J	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
96	RN D.S.M.	6193041F	15	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
97	RN A.C.P.G.	6193515B	2	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN1
98	RN I.M.S.J.	6194677F	5	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
99	G.B.L.	6196785B	35	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
100	R.P.G.	55539067B	13	2	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
101	M.S.C.	55747040E	180	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
102	B.S.V.	6198702H	25	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
103	J.H.P.D.	55542530E	31	1	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
104	H.R.C.	55542616A	64	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
105	L.V.C.	55542173F	1	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
106	R.C.S.	6496741	21	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
107	RN R.B.S.	6113025A	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
108	J.V.O.R.	55544532D	16	2	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
109	D.S.C.	55525676B	120	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
110	S.R.S.	6873120	35	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
111	L.J.A.S.	14076681A	24	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor
112	H.S.P.	55540875H	270	1	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
113	R.C.S.	6122899I	10	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
114	I.D.C.S.	6122637D	26	2	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
115	RN E.S.	14085549H	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
116	RN M.E.L.S.	6125425B	19	1	NI	NI	NI	NI	NI	CTIN2
117	R.S.	14078457B	74	2	Del 22q11	NI	NI	Del 22q11	Del 22q11	InCor
118	RN F.C.T.	55548468F	1	1	NI	NI	NI	NI	NI	InCor

ANEXO G - GENES E SONDAS CORRESPONDENTES PRESENTES NO KIT P064 –B2 OU B3 DA MLPA, COM A EXATA POSIÇÃO GENÔMICA E O COMPRIMENTO DAS SONDAS

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P064	<i>TNFRSF18</i>	4	1p36.33	03050-L01762	382
P064	<i>TNFRSF4</i>	5	1p36.33	02269-L01761	130
P064	<i>SCNN1D</i>	6	1p36.33	06778-L06730	135
P064	<i>GNB1</i>	3	1p36.33	02890-L07968	178
P064	<i>SKI</i>	6	1p36.33	02891-L02359	436
P064	<i>PANK4</i>	2	1p36.32	01122-L00680	247
P064	<i>TP73</i>	1	1p36.32	01682L02331	336
P064	<i>NSD1</i>	5	5q35.2	02589-L11228	142
P064	<i>NSD1</i>	13	5q35.3	02594-L02065	445
P064	<i>NSD1</i>	18	5q35.3	01303-L00855	211
P064	<i>TWIST1</i>	1	7p21.1	01969-L02364	319
P064	<i>TWISTNB</i>	1	7p21.1	02146-L01642	202
P064	<i>FZD9</i>	1	7q11.23	01330-L00881	256
P064	<i>STX1A</i>	8	7q11.23	01332-L00883	292
P064	<i>ELN</i>	1	7q11.23	01333-L00876	310
P064	<i>LIMK1</i>	5	7q11.23	01337-L02333	391
P064	* <i>CYLN2</i>	3	7q11.23	01561-L01133	229
P064	* <i>CYLN2</i>	13	7q11.23	01339-L00885	418
P064	* <i>CLIP2</i>	3	7q11.23	01561-L01133	229
P064	* <i>CLIP2</i>	14	7q11.23	01339-L00885	418
P064	<i>MKRN3</i>	1	15q11.2	02020-L01539	172
P064	<i>NDN</i>	1	15q11.2	02024-L01542	220
P064	<i>UBE3A</i>	13	15q11.2	09669-L00864	400
P064	<i>UBE3A</i>	7	15q11.2	04620-L00863	160
P064	<i>GABRB3</i>	3	15q12	02038-L02330	409
P064	<i>HIC1</i>	1	17p13.3	01444-L02367	364
P064	<i>HIC1</i>	3	17p13.3	01435-L00945	184
P064	* <i>METT10D</i>	1	17p13.3	01924-L08393	427
P064	* <i>METTL16</i>	1	17p13.3	01924-L08393	427
P064	<i>PAFAH1B1</i>	5	17p13.3	01443-L08394	238
P064	<i>PAFAH1B1</i>	11	17p13.3	01925-L01477	283

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P064	<i>ASPA</i>	6	17p13.2	01325L07456	265
P064	<i>TRPV1</i>	19	17p13.2	01472-L00946	148
P064	<i>TNFRSF13B</i>	3	17p11.2	01448-L00932	166
P064	<i>LRRC48</i>	6	17p11.2	01452-L00936	274
P064	<i>LLGL1</i>	4	17p11.2	01453-L00937	301
P064	<i>PRPSAP2</i>	3	17p11.2	01454-L00938	329
P064	<i>MFAP4</i>	6	17p11.2	01455-L00939	355
P064	<i>JAG1</i>	22	20p12.2	01697-L02329	346
P064	<i>JAG1</i>	1	20p12.2	03072-L02472	472
P064	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	05462-L05809	191
P064	<i>CDC45</i>	1	22q11.21	05463-L05808	465
P064	<i>CLDN5</i>	1	22q11.21	01218-L06270	196
P064	<i>ARVCF</i>	3	22q11.21	05465-L06731	154
P064	<i>KLHL22</i>	2	22q11.21	03069-L05815	454
P064	<i>SNAP29</i>	5	22q11.21	01235-L00773	373

ANEXO H – GENES E SONDAS CORRESPONDENTES PRESENTES NO KIT P036 – E1 DA MLPA, COM A EXATA POSIÇÃO GENÔMICA E O COMPRIMENTO DAS SONDAS

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P036	<i>TNFRSF4</i>	5	1p36.33	02269-L01761	130
P036	<i>SH3BP5L</i>	5	1q44	02392-L02149	307
P036	<i>ACP1</i>	1	2p25.3	02274-L08758	136
P036	<i>CAPN10</i>	3	2q37.3	01742-L01308	313
P036	<i>CHL1</i>	5	3p26.3	01721-L01329	142
P036	<i>BDH1</i>	4	3q29	02013-L02052	322
P036	<i>PIGG</i>	7b	4p16.3	02005-L02047	151
P036	<i>TRIML2</i>	2	4q35.2	12050-L11446	330
P036	<i>PDCD6</i>	6	5p15.33	01723-L01327	158
P036	<i>GNB2L1</i>	6	5q35.3	03319-L02737	337
P036	<i>IRF4</i>	2	6p25.3	01724-L02048	166
P036	<i>PSMB1</i>	5	6q27	01746-L01304	346
P036	<i>ADAP1</i>	4	7p22.3	02275-L02049	172
P036	<i>VIPR2</i>	3	7q36.3	01747-L01303	355
P036	<i>FBX025</i>	9	8p23.3	02397-L01845	179
P036	<i>ZC3H3</i>	2	8q24.3	01748-L01302	361
P036	<i>DMRT1</i>	2	9p24.3	01727-L02050	186
P036	<i>EHMT1</i>	23	9q34.3	08205-L08170	372
P036	<i>DIP2C</i>	4	10p15.3	02277-L01768	193
P036	<i>PAOX</i>	3	10q26.3	09142-L09953	379
P036	<i>RIC8A</i>	3	11p15.5	03315-L02733	202
P036	<i>NCAPD3</i>	2	11q25	01751-L01299	386
P036	<i>SLC6A12</i>	19	12p13.33	02276-L01767	208
P036	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33	02687-L02154	395
P036	<i>PSPC1</i>	2	13q11	02399-L01847	219
P036	<i>F7</i>	6	13q34	01753-L01297	402
P036	<i>CCNB1IP1</i>	4	14q11.2	01732-L01318	227
P036	<i>MTA1</i>	8	14q32.33	02778-L02201	411
P036	<i>MKRN3</i>	1	15q11.2	07291-L08858	235
P036	<i>ALDH1A3</i>	11	15q26.3	01755-L01295	418
P036	<i>POLR3K</i>	1	16p13.3	01734-L01316	242

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P036	<i>GAS8</i>	6	16q24.3	03201-L02669	426
P036	<i>RPH3AL</i>	5	17p13.3	01735-L01315	250
P036	<i>TBCD</i>	18	17q25.3	01757-L01293	434
P036	<i>USP14</i>	7	18p11.32	01736-L02051	258
P036	<i>RBFA</i>	4	18q23	01758-L01292	441
P036	<i>CDC34</i>	5	19p13.3	01737-L01313	265
P036	<i>CHMP2A</i>	6	19q13.43	09143-L10626	450
P036	<i>SOX12</i>	1	20p13	02396-L01844	274
P036	<i>OPRL1</i>	3	20q13.33	02688-L02884	458
P036	<i>RBM11</i>	1	21q11.2	01739-L01311	283
P036	<i>PRMT2</i>	4	21q22.3	02586-L02059	466
P036	<i>BID</i>	4	22q11.21	01740-L01310	289
P036	<i>RABL2B</i>	9	22q13.33	01762-L08761	475
P036	<i>SHOX</i>	4	Xp22.33PAR	01148-L01331	298
P036	<i>VAMP7</i>	4	Xq28PAR	01763-L02150	483

ANEXO I - GENES E SONDAS CORRESPONDENTES PRESENTES NO KIT P070 –B2 DA MLPA, COM A EXATA POSIÇÃO GENÔMICA E O COMPRIMENTO DAS SONDAS

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P070	<i>TNFRSF18</i>	4b	1p36.33	02270-L01762	306
P070	<i>SH3BP5L</i>	3	1q44	04084-L03605	132
P070	<i>ACP1</i>	5	2p25.3	02709-L02856	315
P070	<i>ATG4B</i>	7	2q37.3	02781-L03168	139
P070	<i>CHL1</i>	3	3p26.3	02896-L02363	323
P070	<i>KIAA0226</i>	22	3q29	02690-L02842	145
P070	<i>PIGG</i>	8	4p16.3	14440-L16146	329
P070	<i>FRG1</i>	1	4q35.2	02691-L02843	152
P070	<i>CCDC127</i>	3	5p15.33	02791-L02233	337
P070	<i>GNB2L1</i>	2	5q35.3	02790-L02232	160
P070	<i>IRF4</i>	3	6p25.3	04077-L03462	346
P070	<i>TBP</i>	2	6q27	02694-L02844	166
P070	<i>SUN1</i>	5	7p22.3	02780-L02857	355
P070	<i>VIPR2</i>	2	7q36.3	02793-L03167	172
P070	<i>FBX025</i>	8	8p23.3	02715-L00973	362
P070	<i>RECQL4</i>	17	8q24.3	02695-L00610	179
P070	<i>DOCK8</i>	23	9p24.3	02716-L00688	370
P070	<i>EHMT1</i>	10	9q34.3	02792-L02846	186
P070	<i>ZMYND11</i>	2 ^a	10p15.3	05180-L16343	379
P070	<i>ECHS1</i>	8	10q26.3	02696-L02847	193
P070	<i>BET1L</i>	3b	11p15.5	02784-L02226	387
P070	<i>IGSF9B</i>	20	11q25	02697-L02848	202
P070	<i>JARID1A</i>	23	12p13.33	02787-L02229	393
P070	<i>ZNF10</i>	5	12q24.33	02686-L02849	211
P070	<i>PSPC1</i>	1	13q11	02717-L03608	402
P070	<i>CDC16</i>	8	13q34	02698-L00753	218
P070	<i>PARP2</i>	16	14q11.2	02718-L00732	409
P070	<i>MTA1</i>	7	14q32.33	02699-L02850	226
P070	<i>NDN</i>	1	15q11.2	04026-L01542	418
P070	<i>TM2D3</i>	3	15q26.3	02701-L02851	233
P070	<i>DECR2</i>	9	16p13.3	02720-L00648	427

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P070	<i>GAS8</i>	11	16q24.3	02702-L00734	241
P070	<i>RPH3AL</i>	2	17p13.3	04081-L03465	436
P070	<i>SECTM1</i>	4	17q25.3	02703-L03169	250
P070	<i>THOC1</i>	21	18p11.32	02789-L02231	444
P070	<i>CTDP1</i>	9	18q23	02704-L03607	258
P070	<i>PPAP2C</i>	6	19p13.3	03501-L02880	450
P070	<i>CHMP2A</i>	3	19q13.43	02705-L02853	265
P070	<i>ZCCHC3</i>	1	20p13	02723-L00641	459
P070	<i>UCKL1</i>	6	20q13.33	02706-L00642	274
P070	<i>HSPA13</i>	2	21q11.2	02724-L00334	466
P070	<i>S100B</i>	2	21q22.3	02587-L02854	281
P070	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1	02725-L16344	478
P070	<i>ARSA</i>	1	22q13.33	02707-L00661	290
P070	<i>SHOX</i>	5	Xp22.33PAR	03714-L16345	484
P070	<i>VAMP7</i>	8	Xq28PAR02	02708-L02855	298

ANEXO J - GENES E SONDAS CORRESPONDENTES PRESENTES NO KIT P250 –B1 DA MLPA, COM A EXATA POSIÇÃO GENÔMICA E O COMPRIMENTO DAS SONDAS

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P250	<i>SLCA25A4</i>	2	4q35.1	12093-L15011	326
P250	<i>KLKB1</i>	3	4q35.2	01217-L00694	184
P250	<i>PPP1R3B</i>	2	8p23.1	01243-L07392	472
P250	<i>MSRA</i>	2	8p23.1	01240-L00787	427
P250	<i>GATA4</i>	7	8p23.1	01226-L03844	274
P250	<i>EHMT1</i>	2	9q34.3	05059-L07380	136
P250	<i>EHMT1</i>	15	9q34.3	05058-L07382	154
P250	<i>GATA3</i>	3	10p15.1	01225-L09140	267
P250	<i>GATA3</i>	6	10p15.1	07636-L07321	301
P250	<i>TECEB1P3</i>	3'UTR	10p14	01232-L17068	350
P250	<i>CUGBP2</i>	5'UTR	10p14	01234-L00781	364
P250	<i>CUGBP2</i>	2	10p14	01522-L00952	382
P250	<i>NEBL</i>	1	10p12.31	08480-L15878	487
P250	<i>RPH3AL</i>	5	17p13.3	01735-L07385	255
P250	<i>RPH3AL</i>	2	17p13.3	04081-L03465	436
P250	<i>GEMIN4</i>	2	17p13.3	01238-L07390	409
P250	<i>YWHAE</i>	4	17p13.3	13603-L03531	391
P250	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1	01082-L15012	335
P250	<i>SLC25A18</i>	1	22q11.21	05457-L07613	142
P250	<i>BID</i>	4	22q11.21	01767-L07389	357
P250	<i>MICAL3</i>	20	22q11.21	05458-L04861	178
P250	<i>USP18</i>	1	22q11.21	07528-L04863	226
P250	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	05462-L05809	191
P250	<i>HIRA</i>	1	22q11.21	01214-L02328	160
P250	<i>CDC45L</i>	1	22q11.21	05463-L05808	465
P250	<i>CLDN5</i>	1	22q11.21	01218-L06270	196
P250	<i>GP1BB</i>	2	22q11.21	05464-L10114	208
P250	<i>TBX1</i>	2	22q11.21	05408-L07614	172
P250	<i>TBX1</i>	7	22q11.21	10810-L14347	245
P250	<i>TXNRD2</i>	1	22q11.21	01223-L05814	238
P250	<i>DGCR8</i>	2	22q11.21	08475-L08486	148

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P250	<i>ZNF74</i>	Íntron 1-2	22q11.21	05927-L07395	202
P250	<i>KLHL22</i>	1	22q11.21	01227-L05815	283
P250	<i>MED15</i>	Íntron 8-9	22q11.21	01231-L15877	316
P250	<i>SNAP29</i>	1	22q11.21	01235-L00773	373
P250	<i>LZTR1</i>	2	22q11.21	01521-L00951	418
P250	<i>HIC2</i>	2	22q11.21	13302-L15009	308
P250	<i>PPIL2</i>	20	22q11.21	07529-L04870	130
P250	<i>TOP3B</i>	7	22q11.22	13299-L14649	292
P250	<i>RTDR1</i>	6	22q11.22	08484-L09139	261
P250	<i>GNAZ</i>	3	22q11.22	08478-L17067	215
P250	<i>RTDR1</i>	2	22q11.22	08479-L08490	454
P250	<i>RAB36</i>	1	22q11.22	05932-L04872	342
P250	<i>SMARCB1</i>	1	22q11.23	05928-L07969	220
P250	<i>SMARCB1</i>	9	22q11.23	05933-L05812	400
P250	<i>SNRPD3</i>	2	22q11.23	08481-L08492	166
P250	<i>ARSA</i>	1	22q11.33	01093-L00661	445
P250	<i>SHANK3</i>	22	22q11.33	06787-L07383	232

ANEXO K - GENES E SONDAS CORRESPONDENTES PRESENTES NO KIT P356 –A1 DA MLPA, COM A EXATA POSIÇÃO GENÔMICA E O COMPRIMENTO DAS SONDAS

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P356	<i>MTHFR</i>	1	1p36.22	04683-L04061	409
P356	<i>SCN5A</i>	24	3p21.3	07816-L07546	373
P356	<i>IL4</i>	1	5q31.1	00797-L00463	130
P356	<i>MYB</i>	15	6q23.3	12530-L15123	499
P356	<i>ETS1</i>	7	11q24.3	09495-L09752	274
P356	<i>RPGRIP1</i>	20	14q11.2	07030-L06641	238
P356	<i>TSHR</i>	5	14q31.1	10973-L11644	184
P356	<i>SPRED1</i>	6	15q14	11018-L11687	346
P356	<i>FLCN</i>	12	17p11.2	08599-L08602	172
P356	<i>CSNK2A1</i>	13	20p13	05116-L04971	457
P356	<i>GAB4</i>	10	22q11	13888-L15426	244
P356	<i>IL17RA</i>	4	22q11.1	01082-L00660	337
P356	<i>CECR5</i>	2	22q11.1	06251-L05757	448
P356	<i>CECR1</i>	2	22q11.1	05777-L10758	262
P356	<i>CECR2</i>	1	22q11.2	13953-L15492	391
P356	<i>SLC25A18</i>	1	22q11.21	05457-L05806	137
P356	<i>BCL2L13</i>	4	22q11.21	03193-L02546	202
P356	<i>BID</i>	5	22q11.2	13955-L15524	353
P356	<i>BID</i>	4	22q11.21	01767-L16426	362
P356	<i>MICAL3</i>	20	22q11.21	05458-L04861	178
P356	<i>PEX26</i>	3	22q11.2	13954-L15523	283
P356	<i>USP18</i>	1	22q11.21	07528-L04863	226
P356	<i>PRODH</i>	3	22q11.21	07486-L16427	428
P356	<i>PRODH</i>	1	22q11.21	07485-L07143	152
P356	<i>GSC2</i>	2	22q11.21	05461-L16422	166
P356	<i>CLTCL1</i>	3	22q11.21	05462-L05809	191
P356	<i>HIRA</i>	1	22q11.21	01214-L02328	160
P356	<i>CDC45L</i>	1	22q11.21	05463-L05808	465
P356	<i>CLDN5</i>	1	22q11.21	01218-L06270	196
P356	<i>GTSE1</i>	2	22q13.31	06080-L05535	220
P356	<i>GTSE1</i>	7	22q13.31	06097-L06370	418

Kit	Gene	Éxon	Posição cromossômica	Sonda	Comprimento de sonda (pb)
P356	<i>ALG12</i>	10	22q13.3	06733-L16568	208
P356	<i>MLC1</i>	13	22q13.3	06082-L16424	250
P356	<i>PLXNB2</i>	13	22q13.3	06083-L05538	256
P356	<i>SBF1</i>	4	22q13.3	06084-L16425	268
P356	<i>CPT1B</i>	19	22q13.3	06101-L16428	474
P356	<i>MAPK8IP2</i>	12	22q13.3	05111-L04495	290
P356	<i>ARSA</i>	1	22q13.3	02707-L14005	297
P356	<i>SHANK3</i>	2	22q13.3	06784-L06376	309
P356	<i>SHANK3</i>	9	22q13.3	06785-L06377	400
P356	<i>SHANK3</i>	16	22q13.3	06786-L16421	143
P356	<i>SHANK3</i>	20	22q13.3	06787-L07383	232
P356	<i>ACR</i>	1	22q13.3	09363-L05557	382
P356	<i>ACR</i>	2	22q13.3	05112-L16429	484
P356	<i>ACR</i>	3	22q13.3	06087-L05542	319
P356	<i>RABL2B</i>	9	22q13.3	06088-L05543	328

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Acharya G, Sitras V, Maltau JM, Dahl LB, Kaaresen PI, Hanssen TA, Lunde P. Major congenital heart disease in Northern Norway: shortcomings of pre- and postnatal diagnosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004;83(12):1124-9.

Aggarwal VS, Morrow BE. Genetic Modifiers of the physical Malformations in Velo-Cardio-Facial Syndrome/DiGeorge Syndrome. *Dev Disabil Res Rev*. 2008;14(1):19-25.

Ammann AJ, Wara DW, Cowan MJ, Barrett DJ, Stiehm ER. The DiGeorge syndrome and the fetal alcohol syndrome. *Am J Dis Child*. 1982;136(10):906-8.

Basset AS, Hodgkinson K, Chow EW, Correia S, Scutt LE, Weksberg R. 22q11 deletion syndrome in adults with schizophrenia. *Am J Med Genet*. 1998;81(4):328-37.

Basset AS, Chow EW, Weksberg R. Chromosomal abnormalities and schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2000;97(1):45-51.

Bastos LF, Araújo TM, Frota NM, Caetano JA. Perfil clínico e epidemiológico de crianças com cardiopatias congênitas submetidas à cirurgia cardíaca. *Rev Enferm UFPE On Line*. 2013;7(8):5299-304.

Baumgartner h, Bonhoeffer P, De Groot NM, de Haan F, Deanfield JE, Galie N, et al. European Society of Cardiology Guidelines for the management of grown up congenital heart disease. *Eur Heart J*. 2010;31(23):2915-57.

Belangero S, Bellucco F, Kulikowski L, Christofolini D, Cernach M, Melaragno M. 22q11.2 deletion in patients with conotruncal heart defect and del22q syndrome phenotype. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(4):307-11.

Butcher NJ, Boot E, Lang AE, Andrade D, Vorstman J, McDonald-McGinn D,

Bassett AS. Neuropsychiatric expression and catatonia in 22q11.2 deletion syndrome. An overview and case series. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2146-69.

Byrne ML, Yang W, Mercer-Rosa L, Parnell A, Oster ME, Levenbrown Y, Tanel RE, Goldmuntz E. 22q11.2 deletion syndrome is associated with increased perioperative events and more complicated postoperative course in infants undergoing infant operative correction of truncus arteriosus communis or interrupted aortic arch. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;148(4):1597-605.

Bobick BE, Thornhill TM, Kulyk WM. Fibroblast growth factors 2, 4, and 8 exert both negative and positive effects on limb, frontonasal, and mandibular chondrogenesis via MEK-ERK activation. *J Cell Physiol*. 2007;211(1):233-43.

Bove EL, Minich LI, Pridjian AK, Lupinetti FM, Snider AR, Dick M 2nd. The management of severe subaortic stenosis, ventricular septal defect and aortic arch obstruction in the neonate. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;105(2):289-95.

Breckpot J, Thienpont B, Bauters M, Tranchevent LC, Gewillig M, Allegaert K, Vermeesch JR, Moreau Y, Devriendt K. Congenital heart defects in a novel recurrent 22q11.2 deletion harboring the genes CRKL and MAPK1. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(3):574-80.

Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ, Curtis CE, Robinson DO, Harvey JF, Cross NCP. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer*. 2004;91(6):1155-9.

Campbell CD, Eichler EE. Properties and rates of germline mutations in humans. *Trends Genet*. 2013;29(10):575-84.

Campbell IM, Sheppard S, Crowley TB, McGinn D, Bailey A, McGinn MJ, Homans JF, Chen EY, Salmons HI, Gaynor JW, Goldmuntz E, Jackson OA, Katz LE, Mascarenhas MR, Deeney VFX, Castelein RM, Zur KB, Elden L, Kallish S, Kolon TF, Hopkins SE, Chadehumbe MA, Lambert MP, Forbes BJ,

Moldenhauer JS, Schindewolf EM, Solot CB, Moss EM, Gur RE, Sullivan KE, Emanuel BS, Zackai EH, McDonald-McGinn DM. What is new 22q? An update from the 22q and you Center at the Children`s Hospital of Philadelphia. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2058-69.

Campos CM, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigation of copy number variation in children with conotruncal heart defects. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(1):24-31.

Caneo LF, Jatene MB, Yatsuda N, Gomes WJ. Uma reflexão sobre o desempenho da cirurgia cardíaca pediátrica no Estado de São Paulo. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2012;27(3):457-62.

Carey AH, Kelly D, Halford S, Wadey R, Wilson D, Goodship J, Burn J, Paul T, Sharkey A, Dumanski J, et al. Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q 11 in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet*. 1992;51(5):964-70.

Carneiro-Sampaio M, Jacob CM, Leone CR. A proposal of warning signs for primary immunodeficiencies in the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(3):345-6.

Carneiro-Sampaio MM, Vasconcelos DM, Kokron CM, Jacob CM, Barros MT, Dorna MB, Watanabe LA, Marinho AK, Castro AP, Pastorino AC, Silva CA, Ferreira MD, Rizzo LV, Kalil JE, Duarte AJ. Primary Immunodeficiency Diseases in Diferente Age Groups: A Report on 1008 Cases from a Single Brazilian Reference Center. *J Clin Immunol*. 2013;33(4):716-24.

Carotti A, Marino B, Di Donato RM. Influence of chromosome 22q11.2 microdeletion on surgical outcome after treatment of tetralogy of fallot with pulmonary atresia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(5):1666-7.

Carotti A, Digilio MC, Piacentini G, Saffirio C, Di Donato RM, Marino B. Cardiac defects and results of cardiac surgery in 22q11.2 deletion syndrome. *Dev Disabil Res Rev*. 2008;14(1):35-42.

Carvalho JS, Araujo LML, Moraes AG, Pontes Júnior SC. Transposição das grandes artérias. Avaliação ecocardiográfica. *Arq Bras Cardiol.* 1984;43(5):345-54.

Cayler GG. Cardiofacial syndrome: Congenital heart disease and facial weakness, a hitherto unrecognized association. *Arch Dis Child.* 1969;44(233):69-75.

Celoria GC, Patton RB. Congenital absence of the aortic arch. *Am Heart J.* 1959;58(3):407-26.

Chang RK, Gurvitz M, Rodriguez S. Missed diagnosis of critical congenital heart disease. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2008;162(10):969-74.

Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet.* 1981;57(3):253-6.

Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML. Isolation and Characterization of a Gene from the DiGeorge Chromosomal Region Homologous to the Mouse BX Gene. *Genomics.* 1997;43(3):267-77.

Cirillo E, Giardino G, Gallo V, Puliafito P, Azzari C, Bacchetta R, Cardinale F, Cicalese MP, Consolini R, Martino S, Martire B, Molinatto C, Plebani A, Scarano G, Soresina A, Cancrini C, Rossi P, Digilio MC, Pignata C. Intergenerational and intrafamilial phenotypic variability in 22q11.2 Deletion syndrome subjects. *BMC Med Genet.* 2014;15:1-8.

Cohen JL, Crowlwy TB, McGinn DE, McDougall C, Unolt M, Lambert MP, Emanuel BS, Zackai EH, McDonald-McGinn DM. 22q and two: 22q11.2 deletion syndrome and coexisting conditions. *Am J Med Genet.* 2018; 176(10):2203-14.

Collett RW, Edwards JE. Persistent truncus arteriosus: a classification according to anatomic types. *Surg Clin North Am.* 1949;29(4):1245-70.

Cooper MD, Peterson RDA, Good RA. A new concept of the cellular basis of immunology. *J Pediatr.* 1965;67(5 Pt 2):907-8.

Costain G, Silversides CK, Bassett A. The importance of copy number variation in congenital heart disease. *NPJ Genom Med.* 2016;1:16031.

Croti UA, Barbero-Marcial M, Jateme MB, Riso AA, Tanamati C, Aiello VD, et al. Classificação anatômica e correção cirúrgica da atresia pulmonar com comunicação interventricular. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2001;16(4):321-36.

Croti UA, Barbero-Marcial M, Tanamati C, Jateme MB, Braile DM, Oliveira SA. Avaliação do suprimento sangüíneo vascular pulmonar nos portadores de atresia pulmonar com comunicação interventricular e artérias colaterais sistêmico-pulmonares. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(1):3-9.

Crowley B, Ruffner M, McDonald-McGinn DM, Sullivan KE. Variable immune deficiency related to deletion size in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018;176(10):2082-6.

DataSus. *Nascidos vivos – Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. [citado 04 mar 2019]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi.exe/sinaissc/cnv/nvuf.def>.

Daw SC, Taylor C, Kraman M, Call K, Mao J, Schuffenhauer S, Meitingner T, Lipson T, Goodship J, Scambler P. A common region of 10p deleted in DiGeorge and velocardiofacial syndromes. *Nat Genet.* 1996;13(4):458-60.

De la Chapelle A, Herva R, Koivisto M, Aula P. A deletion in chromosome 22 can cause DiGeorge syndrome. *Hum Genet.* 1981;57(3):253-6.

DiGeorge AM. Absence of the thymus. *Lancet.* 1967;1(7504):1387.

De-Wahl Granelli A, Wennergren M, Sandberg K, Mellander M, Bejlm C, Inganäs L, Eriksson M, Segerdahl N, Agren A, Ekman-Joelsson BM, Sunnegårdh J, Verdicchio M, Ostman-Smith I. Impact of pulse oximetry screening on the detection of duct dependent congenital heart disease: a Swedish prospective screening study in 39,821 newborns. *BMJ.* 2009;338:a3037.

Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet.* 1992;50(5):924-33.

Dutra RL, Honjo RS, Kulikowski LD, Fonseca FM, Pieri PC, Jehee FS, Bertola DR, Kim CA. Copy number variation in Williams-Beuren syndrome: suitable diagnostic strategy for developing countries. *BMC Res Notes.* 2012;5:13.

Dutra RL. *Investigação da variação no número de cópias genômicas (CNVs) em pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) pela técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014. 185p.

Duke SG, McGuirt WF Jr, Jewett T, Fasano MB. Velocardiofacial syndrome: incidence of immune cytopenias. Velocardiofacial syndrome: incidence of immune cytopenias. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126(9):1141-5.

Edelmann L, Pandita RK, Spiteri W, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorder on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet.* 1999;8(7):1157-67.

Farah MCK, Villela GC. Cardiopatia congênita. In: Borges ES, org. *Manual de Cardiologia: diagnóstico e tratamento* [Internet]. 2001 [citado 04 mar 2019]. Disponível em: http://geicpe.tripod.com/clin_manual.htm

Fiksinski AM, Schneider M, Murphy CM, Armando M, Vicari S, Canyelles JM, Gothelf D, Eliez S, Breetvelt EJ, Arango C, Vorstman JAS. Understanding the pediatric psychiatric phenotype of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018;176(10):2182-91.

Fomin AFB, Pastorino AC, Kim CA, Pereira CA, Carneiro-Sampaio M, Abe-Jacob CM. DiGeorge Syndrome: a not so rare disease. *Clinics(São Paulo).* 2010;65(9):865-9.

Formigari R, Michielon G, Digilio MC, Piacentini G, Carotti A, Giardini A et al. Genetic syndromes and congenital heart defects: how is surgical management affected? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009;35(4):606-14.

Frank DU, Fotheringham LK, Brewer JA, Muglia LJ, Tristanifirouzi M, Capecchi MR, Moon AM. An Fgf8 Mouse Mutant Phenocopies Human 22q11 Deletion Syndrome. *Development*. 2002;129(19):4591-603.

Fujimoto S, Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature*. 1987;327(6119):242-3.

Gao S, Li X, Amendt BA. Understanding the role of Tbx1 as a candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013;13(6):613-21.

Garcia-Miñaur S, Fantes J, Murray RS. A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *J Med Genet*. 2002;39(10):E62

Garg V, Yamagishi C, Hu T, Kathiriyia IS, Yamagishi H, Srivastava D. TBX1, a DiGeorge Syndrome Candidate Gene, Is Regulated by Sonic Hedgehog during Pharyngeal Arch Development. *Dev Biol*. 2001;235(1):62-73.

Gennery A, Barge D, O'Sullivan J, Flood T, Abinun M, Cant A. Antibody deficiency and autoimmunity in 22q11.2 deletion syndrome. *Arch Dis Child*. 2002;86(6):422-5.

Gennery AR. Immunological aspects of 22q 11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(1):17-27.

Gioli-Pereira L, Pereira AC, Bergara D, Mesquita S, Lopes AA, Krieger JE. Frequency of 22q11.2 microdeletion in sporadic non-syndromic tetralogy of Fallot cases. *Int J Cardiol*. 2008;126(3):374-8.

Goldmuntz E. DiGeorge Syndrome: New Insights. *Clin Perinatol*. 2005;32(4):963-78.

Goldmuntz E, Clark B, Mitchell L, Jawad AF, Cuneo BF, Reed L, McDonald-McGinn D, Chien P, Feuer J, Zackai EH, Emanuel BS, Driscoll DA. Frequency

of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(2):492-8.

Gontijo Filho B, Fantini FA, Lora HM, Martins C, Lopes RM, Hayden E, Vrandecic MO. Reconstrução da artéria pulmonar na operação de Jatene. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2001;16(3):236-43.

Grassi MS, Jacob CMA, Kulikowski L D, Pastorino AC, Dutra RL, Miura N, Jatene MB, Pegler SP, Kim CA, Carneiro-Sampaio M. Cardiopatias congênitas como um Sinal de Alerta para o diagnóstico da Deleção do 22q11.2. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(5):382-90.

Greenberg F, Crowder WE, Paschall V, Colon-Linares J, Lubianski B, Ledbetter DH. Familial DiGeorge syndrome and associated partial monosomy of chromosome 22. *Hum Genet*. 1984;65(4):317-9.

Greenberg F, Elder FF, Haffner P, Northrup H, Ledbetter DH. Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. *Am J Hum Genet*. 1988;43(5):605-11.

Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet*. 2001;27(3):293-8.

Hager A, Kanz S, Kaemmerer h, Schreiber C, Hess J. Coarctation long-term assessment (COALA): significance of arterial hypertension in a cohort of 404 patients up to 27 years after surgical repair of isolated coarctation of the aorta, even in the absence of restenosis and prosthetic material. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;134(3):738-45.

Hazenberg M, Otto S, Cohen Stuart J, Verschuren M, Borleffs J, Boucher C, Coutinho R, Lange J, Rinke de Wit T, Tsegaye A, van Dongen JJ, Hamann D, de Boer RJ, Miedema F. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med*. 2000;6(9):1036-42.

Hockenberry M. *Fundamentos Enfermagem pediátrica*. 8a ed. São Paulo: Elsevier; 2011.

Hofbeck M, Leipold G, Rauch A, Buheitel G, Singer H. Clinical relevance of monosomy 22q11.2 in children with pulmonary atresia and ventricular septal defect. *Eur J Pediatr*. 1999;158(4):302-7.

Hopkins SE, Chadehumbe M, Crowley TB, Zackai EH, Bilaniuk LT, McDonald-McGinn DM. Neurologic challenges in 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2140-5.

Hu T, Yamagishi H, Maeda J, MCanally J, Yamagishi C, Srivastava D. TBX1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development*. 2004 ;131(21):5491-502.

Huber J, Peres VC, Castro AL, Santos TJ, Beltrão LF, Baumont AC, Cossio SL, Dalberto TP, Riegel M, Cañedo AD, Schaan BD, Pellanda LC. Molecular screening for 22q11.2 deletion syndrome in patients with congenital heart disease. *Pediatr Cardiol*. 2014;35(8):1356-62.

Hussain S, Sabin UM, Afzal M, Asghar I. Incidence of congenital heart disease among neonates in a neonatal unit of a tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc*. 2014;64(2):175-8.

Ikari NM, Azeka E, Aiello VD, Atik E, Barbero-Marcial M, Ebaid M. Uhl's anomaly. Differential diagnosis and indication for cardiac transplantation in an infant. *Arq Bras Cardiol*. 2001;77(1):73-6.

Instituto da Criança HCFMUSP. Unidade de Alergia e Imunologia. *12 sinais de alerta para Imunodeficiências Primárias no 1º ano de vida*. [citado 26 ago 2013]. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2015/02/imuno12sinais1ano.pdf

Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. *Genomics*. 2009; 93(1):22-6.

Irwin ED, Braulin EA, Folker JE. Staged repair of interrupted aortic arch and ventricular septal defect in infancy. *Ann Thorac Surg*. 1991;52(3):632-9.

Jatene MB. Tratamento cirúrgico das cardiopatias congênitas acianogênicas e cianogênicas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2002;12(5):763-75.

Jennings LJ, Yu M, Fitzpatrick C, Smith FA. Validation of multiplex ligation-dependent probe amplification for confirmation of array comparative genomic hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 2011;20(3):166-74.

Jehee FS, Takamori JT, Medeiros PF, Pordeus AC, Latini FR, Bertola DR, Kim CA, Passos-Bueno MR. Using a combination of MLPA kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *Eur J Med Genet*. 2011;54(4):e425-32.

Karayiorgou M, Gogos JA. The molecular genetics of the 22q11- associated schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;132(2):95-104.

Karayiorgou M, Simon TJ, Gogos JA. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(6):402-16.

Kates WR, Antshel K, Roizen N, Fremont W, Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. In: Butler MG, Meaney FJ, editors. *Genetics of developmental disabilities*. New York: Marcel Dekker; 2004.

Kato Z, Kato T, Orii T. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 10: report of a case and review of the literature. *Jpn J Hum Genet*. 1996;41(3):333-8.

Kelley RI, Zackai EH, Emanuel BS, Kistenmacher M, Greenberg F, Punnett HH. The association of the DiGeorge anomaly with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr*. 1982;101(2):197-200.

Kelly RG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE. The del22q11.2 candidate gene *Tbx1* regulates branchiogenic myogenesis. *Hum Mol Genet*. 2004;13(22):2829-40.

Khoshnood B, Lelong N, Houyel L, Thieulin AC, Jouannic JM, Magnier S, Delezoide AL, Magny JF, Rambaud C, Bonnet D, Goffinet F; EPICARD Study Group. Prevalence, timing of diagnosis and mortality of newborns with congenital heart defects: a population-based study. *Heart*. 2012;98(22):1667-73.

Kinouchi A, Mori K, Ando M, Takao A. Facial appearance of patients with conotruncal anomalies. *Pediatr Jpn*. 1976;17(1):84-7.

Kobinger M. Avaliação do sopro cardíaco na infância. *J Pediatr(Rio J)*. 2003;79(1 Suppl 1):S87-96.

Kobrynski L, Sullivan K. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*. 2007;370(9596):1443-52.

Koshnood B, Lelong N, Houyel L, Thieulin AC, Jouannic JM, Magnier S, Delezoide AL, Magny JF, Rambaud C, Bonnet D, Goffinet F; EPICARD Study Group. Prevalence, timing of diagnosis and mortality of newborns with congenital heart defects: a population-based study. *Heart*. 2012;98(22):1667-73.

Koshiyama DB, Rosa RFM, Zen PRG, Pereira VLB, Graziadio C, Cósier VM et al. Síndrome de Deleção 22q11.2: Importância da avaliação clínica e Técnica de Fish. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(4):442-6.

Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008;29(23):4627-36.

Kruszka P, Addissie YA, McGinn DE, Porras AR, Biggs E, Share M, Crowley TB, Chung BH, Mok GT, Mak CC, Muthukumarasamy P, Thong MK, Sirisena ND, Dissanayake VH, Paththinige CS, Prabodha LB, Mishra R, Shotelersuk V, Ekure EN, Sokunbi OJ, Kalu N, Ferreira CR, Duncan JM, Patil SJ, Jones KL, Kaplan JD, Abdul-Rahman OA, Uwineza A, Mutesa L, Moresco A, Obregon MG, Richieri-Costa A, Gil-da-Silva-Lopes VL, Adeyemo AA, Summar M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Linguraru MG, Muenke M. 22q11.2 deletion syndrome in diverse populations. *Am J Med Genet A*. 2017;173(4):879-88.

Kuo CY, Signer R, Saitta SC. Immune and genetic features of the chromosome 22q11.2 deletion (DiGeorge Syndrome). *Current Allergy and Asthma Reports*. 2018;18:75.

Lai MMR, Scriven PN, Balln C, Berry AC. Simultaneous partial monosomy 10p and trisomy 5q in a case of hypoparathyroidism. *J Med Genet*. 1992;29(8):586-8.

Lam ACF, Lam STS, Lai KKS, Tong TMF, Chau TC. High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem*. 2006;39(3):196-202.

Lammer EJ, Opitz JM. The DiGeorge anomaly as a developmental field defect. *Am J Med Genet Suppl*. 1986;2:113-27.

Lee CH, Hsieh KS, Chen YL, Shiue YL. Identification of candidate genes for congenital ventricular septal defects with hsa22q11 loss of heterozygosity. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(3):263-72.

Lima AF, Santos KS, Oliveira SG, Rocha TACS, Fermoseli AFO. Incidência de malformações congênitas em recém-nascidos em maternidade pública da capital de Alagoas, Brasil. *Interfaces Cient Hum Soc*. 2018;6(3):103-14.

Lindstrand A, Malmgren H, Verri A, Benetti E, Eriksson M, Nordgren A, Anderlid BM, Golovleva I, Schoumans J, Blennow E. Molecular and clinical

characterization of patients with overlapping 10p deletions. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(5):1233-43.

Lipson A, Fagan K, Colley A, Colley P, Sholler G, Issacs D, Oates RK. Velo-Cardio-Facial and Partial DiGeorge Phenotype in a child With Interstitial Deletion at 10p13 - Implications for Cytogenetics and Molecular Biology. *Am J Med Genet*. 1996;65(4):304-8.

Liu S, Joseph KS, Rouleau J, Van den Hof M, Sauve R, Kramer MS; Canadian Perinatal Surveillance System (Public Health Agency of Canada). Association between maternal chronic conditions and congenital heart defects: a population-based cohort study. *Circulation*. 2013;128(6):583-9.

Lupski JR. Genomic disorders: recombination-based disease resulting from genome architecture. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):246-52.

Mahadevan NR, Horton AC, Gibson-Brown JJ. Developmental expression of the amphioxus Tbx1/10 gene illuminates the evolution of vertebrate brachial arches and sclerotome. *Dev Genes Evol*. 2004(11):559-66.

Mahle WT, Crisalli J, Coleman K, Campbell RM, Tam VK, Vincent RN, Kanter KR. Deletion of chromosome 22q11.2 and outcome in patients with pulmonary atresia and ventricular septal defect. *Ann Thorac Surg*. 2003;76(2):567-71.

Mandal K, Boggula VR, Borkar M, Agarwal S, Phadke S. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in screening of subtelomeric regions in children with idiopathic mental retardation. *Indian J Pediatr*. 2009;76(10):1027-31.

Marino B, Digilio MC, Persiani M, Di Donato R, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Deletion 22q11 in patients with interrupted aortic arch. *Am J Cardiol*. 1999;84(3):360-1.

Marino B, Digilio MC. Congenital heart disease and genetic syndromes: specific correlation between cardiac phenotype and genotype. *Cardiovasc Pathol*. 2000;9(6):303-15.

Maggadottir SM, Sullivan KE. The diverse clinical features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge Syndrome). *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2013;1(6):589-94.

Markert ML, Devlin BH, McCarthy EA. Thymus transplantation. *Clin Immunol.* 2010;135(2):236-46.

Marino B, Digilio MC, Persiani M, Di Donato R, Toscano A, Giannotti A, Dallapiccola B. Deletion 22q11 in patients with interrupted aortic arch. *Am J Cardiol.* 1999;84(3):360-1.

Marino B, Digilio MC, Dallapiccola B. Severe truncal valve dysplasia: association with DiGeorge syndrome? *Ann Thorac Surg.* 1998;66(3):980.

Matsuoka R, Kimura M, Scambler P, Morrow B, Imamura S, Minoshima S, Shimizu N, Yamagishi H, Joh-o K, Watanabe S, Oyama K, Saji T, Ando M, Takao A, Momma K. Molecular and clinical study of 183 patients with conotruncal anomaly face syndrome. *Hum Genet.* 1998;103(1):70-80.

McDonald-McGinn DM. 22q11.2 deletion syndrome: A tiny piece leading to a big picture. *Am J Med Genet A.* 2018;176(10):2055-7.

McDonald-McGinn DM, Kirschner R, Goldmuntz E, Sullivan K, Eicher P, Gerdes M, Moss E, Solot C, Wang P, Jacobs I, Handler S, Knightly C, Heher K, Wilson M, Ming JE, Grace K, Driscoll D, Pasquariello P, Randall P, Larossa D, Emanuel BS, Zackai EH. The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns.* 1999;10(1):11-24.

McDonald-McGinn DM, Reilly A, Wallgren-Pettersson C, Hoyme HE, Yang SP, Adam MP et al. Malignancy in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Am J Med Genet.* 2006; 140(8):906-9.

McElhinney DB, Driscoll DA, Emanuel BS, Goldmuntz E. Chromosome 22q11 deletion in patients with truncus arteriosus. *Pediatr Cardiol.* 2003;24(6):569-73.

McElhinney DB, McDonald-McGinn D, Zackai EH, Goldmuntz E. Cardiovascular anomalies in patients diagnosed with a chromosome 22q11 deletion beyond 6 months of age. *Pediatrics*. 2001;108(6):E104.

Mendes S, Araújo C, Carvalho R. Truncus arteriosus – echocardiographic findings. *Acta Obstet Port*. 2015;9(2):184-5.

Merscher S, Funke B, Epstein JA, Hever J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/ DiGeorge syndrome. *Cell*. 2001;104(4):619-29.

Michaelovsky E, Frisch A, Carmel M, Patya M, Zarchi O, Green T, Basel-Vanagaite L, Weizman A, Gothelf D. Genotype-phenotype correlation in 22q11.2 deletion syndrome. *BMC Med Genet*. 2012;17(13):122.

Mikhail FM, Burnside RD, Rush B. The recurrent distal 22q11.2 microdeletions are often de novo and do not represent a single clinical entity: a proposed categorization system. *Genet Med*. 2014;16(1):92-100.

Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP et al. Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am J Hum Genet*. 2010;86(5):749-64.

Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. *Síntese de evidências para políticas de saúde: Diagnóstico precoce de cardiopatas congênitas*. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

Mitchell SC, Korones SB, Berendes HW. Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history. *Circulation*. 1971;43(3):323-32.

Mlynarski EE, Xie M, Taylor D, Sheridan MB, Guo T, Racedo SE, McDonald-McGinn DM, Chow EW, Vorstman J, Swillen A, Devriendt K, Breckpot J, Digilio

MC, Marino B, Dallapiccola B, Philip N, Simon TJ, Roberts AE, Piotrowicz M, Bearden CE, Eliez S, Gothelf D, Coleman K, Kates WR, Devoto M, Zackai E, Heine-Suñer D, Goldmuntz E, Bassett AS, Morrow BE, Emanuel BS; International Chromosome 22q11.2 Consortium. Rare copy number variants and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Genet.* 2016;135(3):273-85.

Mohamed SA, Hanke T, Schlueter C, Bullerdiek J, Sievers HH. Ubiquitin fusion degradation 1-like gene dysregulation in bicuspid aortic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130(6):1531-6.

Molck MC, Monteiro FP, Simioni M, Gil-da-Siva-Lopes VL. 8p23.1 Interstitial deletion in a patient with congenital cardiopathy, neurobehavioral disorders, and minor signs suggesting 22q11.2 deletion syndrome. *J Dev Behav Pediatr.* 2015;36(7):544-8.

Molck MC, Simioni M, Vieira TP, Sgardioli IC, Monteiro FP, Souza J, Fett-Conte AC, Félix TM, Lopes Monlléo I, Gil-da-Silva-Lopes VL. Genomic imbalances in syndromic congenital heart disease. *J Pediatr(Rio J).* 2017;93(5):497-507.

Moller JH, Edwards JE. Interruption of aortic arch. Anatomic patterns and associated cardiac malformations. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med.* 1965;95(3):557-72.

Moller JH, Moodie DS, Blees M, Norton JB, Nouri S. Symptomatic heart disease in infants: comparison of three studies performed during 1969-1987. *Pediatr Cardiol.* 1995;16(5):216-22.

Molesky MG. Chromosome 22q 11.2 microdeletion syndrome. *Neonatal Netw.* 2011;30(5):304-11.

Momma K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion. *Int J Cardiol.* 2007;114(2):147-9.

Momma K. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol.* 2010;105(11):1617-24.

Monaco G, Pignata C, Rossi E, Mascellaro O, Cocozza S, Ciccimarra, F. DiGeorge anomaly associated with 10p deletion. *Am J Med Genet.* 1991;39(2):215-6.

Monteiro FP, Vieira TP, Sgardoli IC, Molck MC, Damiano, AP, Souza JS, Monlleó IL, Fontes MI, Fett-Conte AC, Félix TM, Leal GF, Ribeiro EM, Banzato CE, Dantas Cde R, Lopes-Cendes I, Gil-da-Silva-Lopes VL. Defining new guidelines for screening the 22q11.2 deletion based on a clinical and dysmorphic evaluation of 194 individuals and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2013;172(7):927-45.

Monteiro RAC, Freitas ML, Vianna GS, Oliveira JT, Pietra RX, Ferreira LCA, Rocha PPO, da S Gonçalves M, da C César G, de S Lima J, Medeiros PFV, Mazzeu JF, Jehee FS. Major contribution of genomic copy number variation in syndromic congenital heart disease: The use of MLPA as the first genetic test. *Mol Syndromol.* 2017;8(5):227-35.

Moon AM, Guris DL, Seo JH, Li L, Hammond J, Talbot A, Imamoto A. Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Dev Cell.* 2006;10(1):71-80.

Moraes F, Nóvoa A, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE, Mallo M. Tbx1 is required for proper neural crest migration and to stabilize spatial patterns during middle and inner ear development. *Mech Dev.* 2005;122(2):199-212.

Morrow BE, McDonald-McGinn D, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018;176(10):2070-81.

MRC-Holland®. *About MRC-Holland* [cited 20 mar 2009]. Disponível em: <http://www.mrc-holland.com>

Mutlu ET, Aykan HH, Karagoz T. Analysis of gene copy number variations in patients with congenital heart disease using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Anatol J Cardiol.* 2018;20(1):9-15.

Nevado J, Mergener R, Palomares-Bralo M, Souza KR, Vallespín E, Mena R, Martínez-Glez V, Mori MÁ, Santos F, García-Miñaur S, García-Santiago F, Mansilla E, Fernández L, de Torres ML, Riegel M, Lapunzina P. New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol.* 2014;37(1 Suppl):210-9.

Newbern J, Zhong J, Wickramasinghe RS, Li X, Wu Y, Samuels I, Cherosky N, Karlo JC, O'Loughlin B, Wikenheiser J, Gargasha M, Doughman YQ, Charron J, Ginty DD, Watanabe M, Saitta SC, Snider WD, Landreth GE. 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.

Novelli G, Mari A, Amati F, Colosimo A, Saniuolo F, Bengala M, Conti E, Ratti A, Bordoni R, Pizzuti A, Baldini A, Crinelli R, Pandolfi F, Magnani M, Dallapiccola B. Structure and expression. Of the human ubiquitin fusion-degradation gene (UFDL1). *Biochim Biophys Acta.* 1998;1396(2):158-62.

Nunes FHS. Comunicação interventricular, doença metabólica e nutrição: relato de caso. *Rev SOCERJ.* 2009;22(2):112-6.

Ogilvie CM, Ahn JW, Mann K, Roberts RG, Flinter F. Anovel deletion in proximal 22q associated with cardiac septal defects and microcephaly: A case report. *Mol Cytogenet.* 2009;2:9.

Oster ME, Riehle-Colarusso T, Alverson CJ, Correa A. Associations between maternal fever and influenza and congenital heart defects. *J Pediatr.* 2011;158(6):990-5.

Palmer LD, Butcher NJ, Boot E, Hodgkinson KA, Heung T, Chow EWC, Guna A, Crowley TB, Zackai E, McDonald-McGinn DM, Bassett AS. Elucidating the

diagnostic odyssey of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176(4):936-44.

Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, Martinez Bermejo A, Fernández L, López Pajares I. MLPA vs multiptobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet*. 2006;69(3):228-33.

Parker H, Conway E, Goldsberry J. Genetic and molecular aspects of DiGeorge syndrome. *Bio One, The Biologists' Forum*. 2015;86(2):109-117.

Patel K, Akhter J, Kobrynski L, Benjamin Gathmann MA, Davis O, Sullivan KE, International DiGeorge Syndrome Immunodeficiency Consortium. Immunoglobulin deficiencies: the B-lymphocyte side of DiGeorge Syndrome. *J Pediatr*. 2012;161(5):950-3.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(9):2934-8.

Pinto Júnior VC, Rodrigues LC, Muniz CR. Reflexões sobre a formulação de políticas de atenção cardiovascular pediátrica no Brasil. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2009;24(1):73-80.

Pinsky WW, Arciniegas E. Tetralogy of Fallot. *Pediatr Clin North Am*. 1990;37(1):179-92.

Portaria Nº 1.727, de 11 de julho de 2017. *Aprova o Plano Nacional de Assistência à Criança com Cardiopatia Congênita*. O Ministro de Estado da Saúde, no uso das atribuições que lhe conferem os incisos I e II do parágrafo único do art. 87 da Constituição.

Rao PS. Coarctation of the aorta. *Curr Cardio Rep*. 2005;7(6):425-34

Rayannawar A, Katz LEL, Crowley TB, Lessig M, Grand K, Goldmuntz E, Zackai EH, McDonald-McGinn DM. Association of hypocalcemia with

congenital heart disease in 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2099-103.

Roberts C, Daw SC, Halford S, Scambler PJ. Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge Syndrome. *Hum Mol Genet*. 1997;6(2):237-45.

Rosa RF, Pilla CB, Pereira VL, Flores JA, Golendziner E, Koshiyama DB, Hertz MT, Ricachinevsky CP, Roman T, Varella-Garcia M, Paskulin GA. 22q11.2 deletion syndrome in patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit in Brazil. *AM J Med Genet A*. 2008;146A(13):1655-61.

Rosa RF, Zen PR, Roman T, Graziadio C, Paskulin GA. 22q11.2 deletion syndrome: catching the CATCH22. *Rev Paul Pediatr*. 2009;27(2):211-20.

Rosa RFM, Trevisan P, Koshiyama DB, Pilla CB, Zens PRG, Varella-Garcia M, Paskulin GA. Síndrome de deleção 22q11 e cardiopatias congênitas complexas. *Rev Assoc Med Bras(1992)*. 2011;57(1):62-5.

Rosa RCM, Rosa RFM, Zen PRG, Paskulin GA. Cardiopatias congênitas e malformações extracardíacas. *Rev Paul Pediatr*. 2013;31(2):243-51.

Rump P, Leeuw N, Van Essen AJ. Central 22q11.2 Deletions. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(11):2707-23.

Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, Schuffenhauer S, Oechsler H, Belohradsky B, Prieur M, Aurias A, Raymond FL, Clayton-Smith J, Hatchwell E, McKeown C, Beemer FA, Dallapiccola B, Novelli G, Hurst JA, Ignatius J, Green AJ, Winter RM, Brueton L, Brøndum-Nielsen K, Scambler PJ, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*. 1997;34(10):798-804.

Samánek M, Vorísková M. Congenital heart disease among 815,569 children born between 1980 and 1990 and their 15-year survival: a prospective Bohemia survival study. *Pediatr Cardiol*. 1999;20(6):411-7.

Sandri RMCS. *Investigações de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato*. [Tese]. Bauru: Universidade de São Paulo- Hospital de reabilitação de anomalias craniofaciais; 2011. 197p.

Schouten JP, Mcelgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.

Schuffenhauer S, Seidel H, Oechsler H, Belohradsky B, Bernsau U, Murken J, Meitinger T. DiGeorge Syndrome and Partial Monosomy 10p: case report and review. *Ann Genet*. 1995;38(3):162-7.

Sediácková E. Velopharyngeal insufficiency as developmental disturbance (in Czech). *Cas Lek Cesk*. 1955;94(47-48):1304-7.

Sellner LN, Taylor GR. MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat*. 2004;23(5):413-9.

Sgardioli IC, Vieira TP, Simioni M, Monteiro FP, Gil-da-Silva-Lopes VL. 22q11.2 Deletion Syndrome: Laboratory Diagnosis and TBX1 and FGF8 Mutation Screening. *J Pediatr Genet*. 2015;4(1):17-22.

Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: An update and literature review. *Genet Med*. 2001;3(1):6-13.

Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC. 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.

Shaikh TH, O'Connor RJ, Pierpont ME, McGrath J, Hacker AM, Nimmakayalu M, Nimmakayalu M, Geiger E, Emanuel BS, Saitta SC. Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res*. 2007;17(4):482-91.

Shaw CJ, Lupski JR. Implications of human genome architecture for rearrangementbased disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* 2004;13(1):57-64.

Shen Y, Wu BL. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J Genet Genomics.* 2009;36(4):257-65.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2002;71(6):1296-302.

Shillen A, Vogels A, Devriendt K. Chromossome 22q11 deletion syndrome:update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet.* 2000;97(2):128-35.

Shin HD, Park BL, Bae JS, Park TJ, Chun JY, Park CS, Sohn JW, Kim BJ, Kang YH, Kim JW, Kim KH, Shin TM, Woo SI. Association of ZDHHC8 polymorphisms with smooth pursuit eye movement abnormality. *Am J Med Genet B Neuropsychiatry Genet.* 2010;153B(6):1167-72.

Shounten JP, Mc Elgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation - dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):1-13.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome (VCF). *Prog Pediatric Cardiol.* 2005;20:187-93.

Shprintzen RJ, Golberg RB, Lewin ML, Sidoti EJ, Berkman MD, Argamaso RV, Young D. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J.* 1978;15(1):56-62.

Shprintzen RJ, Golberg RB, Young D, Wolford L. The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics*. 1981;67(2):167-72.

Shprintzen RJ, Wang F, Golberg RB, Marion R. The expanded velo-cardio-facial syndrome (VCF): additional features of the most common clefting syndrome. *Am J Hum Genet*. 1985;37:A77.

Silva JMA. Doença de Graves e deficiência de IgA como manifestações da síndrome de deleção 22q11.2. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010;54(6):572-77.

Silva VG, Cavalcanti ACD, Guimarães TCF, Pereira JDMV, Veras RCC, Souza RO. Diagnósticos, intervenções e resultados de enfermagem para criança com cardiopatia congênita: revisão integrativa. *Rev Pesqui Cuid Fundam*. 2014;6(3):1276-87.

South SL, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med*. 2013;15(11):901-9.

Spivack E. Tetralogy of Fallot: an overview, case report, and discussion of dental implications. *Spec Care Dentist*. 2001;21(5):172-5.

Stachon AC, Baskin B, Smith AC. Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(24):2924-30.

Stephensen SS, Sigfusson G, Eiriksson H, Sverrisson JT, Torfason B, Haraldsson A, Helgason H. Congenital cardiac malformations in Iceland from 1990 through 1999. *Cardiol Young*. 2004;14(4):396-401.

Strong WB. Familial syndrome of the rightside aortic arch, mental deficiency, and facial dysmorphism. *J Pediatr*. 1968;73(6):882-8.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):3245-76.

Sullivan K, McDonald-McGinn D, Driscoll D, Zmijewski C, Ellabban A, Reed L, Emanuel B, Zackai EH, Athreya BH, Keenan G. Juvenile rheumatoid arthritis-like polyarthritis in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge anomalad/velocardiofacial syndrome/conotruncal anomaly face syndrome). *Arthritis Rheum.* 1997;40(3):430-6.

Sullivan K. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Immunol Rev.* 2019;287(1):186-201

Sullivan KE. Immunologic issues in VCFS/ chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Prog Pediatr Cardiol.* 2002;15:103-8.

Swillen A, Devriendt K, Vantrappen G, Voegels A, Rommel N, Fryns JP, Eyskens B, Gewillig M, Dumoulin M. Familial deletions of chromosome 22q11: the Leuven experience. *Am J Med Genet.* 1998;80(5):531-2.

Tam GW, Redon R, Carter NP, Grant SG. The role of DNA copy number variation in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2009;66(11):1005-12.

Tang SX, Gur RE. Longitudinal perspectives of the psychosis spectrum in 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018;176(10):2192-202.

Ta-Shma A, El-Lahham N, Edvardson S, Stepensky P, Nir A, Perles Z, Gavri S, Golender J, Yaakobi-Simhayoff N, Shaag A, Rein AJ, Elpeleg O. Conotruncal malformations and absent thymus due to a deleterious NKX2-6 mutation. *J Med Genet.* 2014;51(4):268-70.

Tison BE, Nicholas SK, Abramson SL, Hanson IC, Paul ME, Seeborg FO, Shearer WT, Perez MD, Noroski LM, Chinen J. Autoimmunity in a cohort of 130 pediatric patients with partial DiGeorge Syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(5):1115-7.

Unolt M, Versacci P, Anaclerio S, Lambiase C, Calcagni G, Trezzi M, Carotti A, Crowley TB, Zackai EH, Goldmuntz E, Gaynor JW, Digilio MC, McDonald-McGinn DM, Marino B. Congenital heart diseases and cardiovascular abnormalities in 22q11.2 deletion syndrome: From well-established knowledge to new frontiers. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2087-98.

Van Mierop LHS, Kutsche LM. Interruption of the aortic arch and coarctation of the aorta: pathogenetic relations. *Am J Cardiol*. 1984;54(7):829-34.

Van Praagh R, Van Praagh S. The anatomy of common aorticopulmonary trunk (truncus arteriosus communis) and its embryologic implications: a study of 57 necropsy cases. *Am J Cardiol*. 1965;16(3):406-25.

Vieira TP, Sgardioli IC, Gil-da-Silva-Lopes VL. Genetics and public health: the experience of a reference Center for diagnosis of 22q11.2 deletion in Brazil and suggestions for implementing genetic testing. *J Community Genet*. 2013;4(1):99-106.

Vitelli F, Zhang Z, Huynh T, Sobotka A, Mupo A, Baldini A. FGF8 expression in the TBX1 domain causes skeletal abnormalities and modifies the aortic arch but not the outflow tract phenotype of TBX1 mutants. *Dev Biol*. 2006;295(2):559-70.

Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat*. 2006;27(8):814-21.

Wilson DI, Burn J, Scambler P, Goodship J. DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet*. 1993;30(10):852-6.

Wilson DI, Cross IE, Goodship JA, Brown J, Scambler PJ, Bain HH, Burn J, et al. A prospective cytogenetic study of 36 cases of DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet*. 1992;51(5):957-63.

Yagi H, Yoshiyuki F, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa

M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*. 2003;362(9393):1366-73.

Yamagishi C, Hierck BP, Gittenberger-De Groot AC, Yamagishi H, Srivastava D. Functional attenuation of UDL1, a 22q11.2 deletion syndrome candidate gene, leads to cardiac outflow septation defects in chicken embryos. *Pediatr Res*. 2003;53(4):546-53.

Zanardo EA. *Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de pacientes com malformações congênitas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014. 134p.

Zhang L, Lewin S, Markowitz M, Lin H, Skulsky E, Karanickolas R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD. Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med*. 1999;190(5):725-32.

Zhang L, Zhong T, Wang Y, Jiang Q, Song H, Gui Y. TBX1, a DiGeorge syndrome candidate gene, is inhibited by retinoic acid. *Int J Dev Biol*. 2006;50(1):55-61.

Zhang X, Xu Y, Liu D, Geng J, Chen S, Jiang Z, Fu Q, Sun K. A modified multiplex ligation-dependent probe amplification method for the detection of 22q11.2 copy number variations in patients with congenital heart disease. *BMC Genomics*. 2015;16:364.

Zielinsky P. Malformações cardíacas fetais. Diagnóstico e conduta. *Arq Bras Cardiol*. 1997;69(3):209-18.

Ziolkowska L, Kawalec W, Turska-Kmiec A, Krajewska-Walasek M, Brzezinska-Rajszys G, Daszkowska J, Maruszewski B, Burczynski P. Chromosome 22q11.2 microdeletion in children with conotruncal heart defects:

frequency, associated cardiovascular anomalies, and outcome following cardiac surgery. *Eur J Pediatr.* 2008;167(10):1135-40.