UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

ROSANA MARIA CANDIDO DE SOUZA SANDRI

**Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com
fissura de palato**

BAURU
2011

ROSANA MARIA CANDIDO DE SOUZA SANDRI

**Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com
fissura de palato**

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

BAURU

2011

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

S57i Sandri, Rosana Maria Candido de Souza
Investigação de alterações na região 22q11 em
indivíduos com fissura de palato / Rosana Maria Candido
de Souza Sandri, 2011.
197 p. il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado – Área de Concentração:
Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas) –
Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais,
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

1. Fissura palatina. 2. Deleção cromossômica.
3. Cromossomos humanos par 22. 4. Biologia molecular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rosana Maria Candido de Souza Sandri

Dissertação apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Área de concentração: Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo (Orientadora)

HRAC-USP

Prof. Dra. Daniela Gamba Garib Carreira

Presidente da Comissão de Pós-Graduação do HRAC-USP

Data de depósito da dissertação junto à SPG: __/__/2011

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por ser a fonte de tudo o que sou e de tudo que tenho, força nos meus momentos de fraqueza e luz no meu caminho.

Aos meus pais, **Adelone e Irma**, meus exemplos de amor, honestidade, humildade, competência e disciplina na minha formação como ser humano.

Ao meu marido **Wagner**, meu maior incentivador, por compartilhar minhas dificuldades e realizações.

Aos meus filhos **Maria Clara e João Gabriel**, a maior dádiva de Deus na minha vida e que, embora ainda tão pequeninos, já conseguem compreender a importância do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por conceder-me a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso e sabedoria para distinguir umas das outras.

À minha orientadora **Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo**, por me propor este grande desafio, confiar e acreditar que eu seria capaz de concretizá-lo.

Aos biólogos e amigos, **Rubens Matias Rodrigues** e **Tânia Yoshico Kamiya**, do Laboratório de Genética e Citogenética Humana, pela amizade, colaboração, incentivo, compreensão, por me ensinarem a observar e entender cada detalhe da citogenética humana.

Às amigas e funcionárias **Tereza Cristina Marquez da Silva** e **Cibele Nazaré Alves Pereira Pires**, pelas palavras, amizade e colaboração.

À **Dra. Naila Cristina Vilaça Lourenço**, do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP/SP), pelo carinho e atenção com que sempre me recebeu, pela disponibilidade, gentileza, por atender tão prontamente minhas solicitações e colaborar com suas explicações na implantação da técnica de MLPA.

À **Dra. Claudia Irene Emilio Castro**, do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP/SP), pela colaboração e atenção.

Aos Profissionais do Setor de Genética Clínica por toda colaboração e apoio nesse trabalho.

Ao **Dr. Antonio Richieri Costa** pelas valiosas observações e orientações e por sempre me receber com atenção, respeito e simpatia.

À **Dra. Maria Leine Guion de Almeida**, por incentivar meu crescimento profissional.

À **Dra. Roseli Maria Zechi Ceide** pela colaboração e sugestões desde o projeto inicial até a conclusão desse estudo.

À **Dra. Nancy Mizue Kokitsu Nakata, Dra. Ana Cristina Victorino Krepschi dos Santos e Dra. Luciana Maximino de Paula** pela leitura cuidadosa, críticas, orientações e sugestões no momento da qualificação que contribuíram grandemente para esse estudo.

À **Dra. Giovana Rinaldi Brandão e Dra. Renata Pacciolo Yamashita** pelas orientações e sugestões.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação **Andréia Cristina da Silva, Rogério da Silveira e Maria José Bento Lopes** por todo apoio, auxílio e amizade.

Aos funcionários da Unidade de Ensino e Pesquisa, em especial, a **Rose Botelho** pelo apoio, atenção, orientação e colaboração e **Denise Giacheti** pela gentileza, disponibilidade e criteriosa correção das referências desse estudo.

À funcionária **Ana Lídia Camargo** do setor de Caso Novo pela colaboração durante a seleção dos pacientes.

Aos funcionários da Seção de Arquivo de Prontuário pela atenção e colaboração.

Aos amigos e alunos do Laboratório de Genética Molecular **Rodrigo Queizi, Bruno Gamba e Chiara Legnaro** pela amizade e colaboração.

Aos amigos de pós-graduação **Daniela Vera Cruz do Santos e Armando Trettene**, por compartilharmos as dificuldades desse período e darmos boas risadas.

À colega de pós-graduação **Fernanda Ribeiro Pinto de Carvalho** pela revisão da língua inglesa.

A todos os colegas do Centrinho, que contribuíram de alguma forma, com este trabalho.

Aos pacientes e seus familiares, pela colaboração, sem a qual seria impossível concretizar esse trabalho.

Ao meu pai **Adelone**, por sua incansável luta para nos educar, por me ensinar, com seu exemplo, que um bom profissional é aquele que realiza seu trabalho com amor, responsabilidade, humildade e honestidade.

À minha mãe **Irma**, por seu amor e dedicação incondicional, com que aprendi a exercer a mais importante função da minha vida.

Aos meus irmãos **Marlon**, **Marcos**, **Ellen** e **Lilian**, pela companhia, pelas palavras de incentivo, pelos momentos descontração.

Ao meu marido **Wagner**, por acreditar nos meus sonhos, compreender minhas angústias, pelo apoio, respeito e palavras que transformam momentos difíceis em momentos de paz e alegria e por sempre caminhar ao meu lado.

Aos meus filhos, **Maria Clara** e **João Gabriel**, por compreenderem minha ausência nesse período, por seus sorrisos, beijos e abraços que me fazem sorrir e chorar e por serem a maior e melhor obra da minha vida.

“Cada escolha, por menor que seja, é uma forma de semente que lançamos sobre o canteiro que somos. Um dia, tudo o que agora silenciosamente plantamos, ou deixamos plantar em nós, será plantação que poderá ser vista de longe...”

Padre Fábio de Melo

“Qualquer que seja o trabalho, sendo honesto, é belo aos olhos de Deus. O que mais importa é a intensidade do amor com que cada trabalho é realizado.”

Felipe Aquino

RESUMO

Sandri RMCS. Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2011.

Objetivo: Investigar a presença de alterações (deleção e/ou duplicação) na região 22q11 em indivíduos até 02 anos de idade com fissura de palato, com o intuito de realizar diagnóstico precoce da síndrome da deleção 22q11 (SD22q11).

Local: Laboratório de Genética e Citogenética Humana, HRAC/USP, Bauru-SP.

Casuística e metodologia: Foram selecionados 55 indivíduos, de ambos os sexos, com idade até 2 anos e com fissura de palato, cadastrados e em tratamento no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais/USP. Todos os indivíduos foram analisados utilizando citogenética convencional por bandamento G e pela técnica de MLPA.

Resultados e discussão: Foram analisados 55 indivíduos, dos quais 46 apresentaram fissura de palato isolada, 6 apresentaram fissura de palato e cardiopatia, 1 fissura de palato e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, 1 caso apresentou fissura de palato submucosa e 1 caso com fissura de palato submucosa e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. Não foram observadas anomalias cromossômicas numéricas ou estruturais por meio da análise citogenética. Embora não tenhamos encontrado nenhuma alteração, a análise citogenética inicial foi importante para detectar possíveis alterações em outras regiões cromossômicas que pudessem resultar em um fenótipo semelhante ao da SD22q11. Também não foram detectadas deleção ou duplicação na região 22q11 pela técnica de MLPA, a qual se mostrou um método rápido, sensível, eficaz e com um custo relativamente baixo em comparação a outras técnicas, para a investigação de alterações na região 22q11. Nossos resultados, associados aos da literatura, demonstram que a prevalência da deleção 22q11 nos casos de fissura de palato isolada é muito baixa. Mesmo sendo considerada como sugestiva da SD22q11, não detectamos nenhuma alteração na região 22q11 nos 6 indivíduos com cardiopatia. Somente foi possível identificar atraso no desenvolvimento em 2 indivíduos, ambos

com dois anos de idade. Isso demonstra a dificuldade de realizar diagnóstico em idade precoce.

Conclusão: O teste de rotina para investigação da deleção/duplicação da região 22q11 não se justifica em crianças com idade até dois anos que apresentam fissura de palato como principal achado clínico. Esses indivíduos devem ter um acompanhamento clínico criterioso, porque um comprometimento comportamental ou mental, bem como as características dismórficas da SD22q11 podem evoluir com o tempo. Devido ao tamanho relativamente pequeno desse estudo, e os dados inconsistentes da literatura atual, mais estudos são necessários para estabelecer critérios para indicação da rotina de investigação de deleção/duplicação 22q11 em indivíduos com anomalias palatinas.

Descritores: Fissura palatina. Deleção cromossômica. Cromossomos humanos par 22. Biologia molecular.

ABSTRACT

Sandri RMCS. Investigation of the alterations in the region 22q11 in individuals with cleft palate [dissertation]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2011.

Purpose: To investigate alterations (deletions/duplications) in the 22q11 region in individuals with cleft palate aged 0-2 years, in order to perform early diagnosis of 22q11 deletion syndrome (SD22q11).

Local: Genetics and Human Cytogenetics Laboratory, HRAC/USP, Bauru-SP.

Methods: We selected 55 individuals with cleft palate, both genders, registered and in treatment at Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais/USP. All individuals were investigated by cytogenetics and MLPA techniques.

Results and Discussion: 46 out of 55 individuals, presented isolated cleft palate, 6 cleft palate and heart malformations, 1 cleft palate and developmental delay, 1 submucous cleft, and 1 submucous cleft and developmental delay. G karyotype did not show any chromosomal abnormalities. Although we did not detect any alterations, the initial cytogenetics analysis was important to exclude alteration in other chromosomal region that could result in a similar phenotype. Deletion or duplication in 22q11 region by MLPA was not detected, which shown to be a rapid, sensitive, and low cost method in comparison with other methods to investigate 22q11 region. Results, associated with the literature, have shown that the prevalence of the 22q11 alteration is very low in cleft palate. The presence of heart malformation is suggestive of 22q11DS. Besides, there were no alterations in 22q11 region in 6 patients with cleft palate and heart malformations. We were able to identify developmental delay in only 2 individual, both aged 2 years which demonstrates the difficulty of making early diagnosis.

Conclusion: There is no justification for routine screening for 22q11 region deletion/duplication in children aged 0-2 years with cleft palate as main feature. These individuals should be carefully followed because behavioral or mental

impairments as well as dysmorphic features characteristic of 22q11DS may evolve with time.

Keywords: Cleft palate. Chromosome deletion. Chromosomes human, pair 22. Molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cromossomo 22, em destaque a banda 22q11.....	39
Figura 2 -	Região 22q11.....	40
Figura 3 -	Rearranjos na região 22q11.....	41
Figura 4 -	Modelo para eventos envolvendo a recombinação homóloga LCR22s levando a deleção e duplicação recíproca típica de 3 Mb.....	42
Figura 5 -	Representação esquemática do mapa físico da região 22q11.2.....	45
Figura 6 -	Aspectos clínicos de indivíduos com SD22q11 distal.....	53
Figura 7 -	Aspectos clínicos de indivíduo com SD22q11 aos 2 (A), 6 (B) e 12 anos (C).....	56
Figura 8 -	Aspectos clínicos de indivíduos com SD22q11 (A-H).....	56
Figura 9 -	Exemplos de anomalias esqueléticas em indivíduos com SD22q11.....	69
Figura 10 -	Aspectos clínicos de indivíduos com síndrome da deleção22q11.....	72
Figura 11 -	Cromossomo 22, em destaque a banda 22q11.....	73
Figura 12 -	Indivíduos com diagnóstico clínico da SD22q11, mas com alterações em outros cromossomos.....	82
Figura 13 -	Representação esquemática das fases de reação da MLPA.....	89
Figura 14 -	Padrão de eletroforese capilar de uma amostra de aproximadamente 50 ng de DNA humano controle do sexo masculino analisado com kit SALSA MLPA DiGeorge P250-B1 (lote 0210).....	90
Figura 15 -	Eletroferogramas dos picos do produto de amplificação da sequência de sondas MLPA da região 22q11.....	91

Figura 16 -	Representação esquemática da posição relativa das regiões de repetições de pequeno número de cópias (<i>Low Copy Repeats–LCRs</i>).....	93
Figura 17 -	Indivíduo 1 – Cariótipo 46,XX, 9qh+,9qh- mat.....	123
Figura 18 -	Indivíduo 6 – Cariótipo 46,XX, 1qh+,1qh-, 21ps+.....	123
Figura 19 -	Indivíduo 15 – Cariótipo 46,XY, 22ps+.....	124
Figura 20 -	Indivíduo 55 – Cariótipo 46,XY,16qh-.....	124
Figura 21 -	Aspectos clínicos da criança com fissura de lábio e palato e deleção 22q11 aos 6 meses de idade.....	133
Figura 22 -	Aspectos clínicos da mãe.....	133
Figura 23 -	Análise MLPA pelo software Genemarker® (SoftGenetics®, State College, Pensilvânia, EUA).....	134
Figura 24 -	Ideograma do cromossomo 22, em destaque a região 22q11 e as sondas MLPA do kit P250-B1 DiGeorge, envolvendo as LCR22 A, B e C, deletadas na criança e na mãe.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sondas do kit SALSA MLPA P250-B1 DiGeorge probemix® organizadas de acordo com localização cromossômica.....	110
Tabela 2 -	Caracterização da casuística estudada.....	118
Tabela 3 -	Heteromorfismos encontrados no cariótipo dos indivíduos estudados.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNPM	atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
F	feminino
G	técnica de bandamento G usando tampão borato
M	masculino
SVAPEPE	Seção de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

LISTA DE SIGLAS

ACF	Abnormal Cayler facial syndrome (síndrome cardiofacial de Cayler)
ARSA	Símbolo do nome oficial do gene <i>Arylsulfatase A</i>
CATCH22	<i>Conotruncal heart defect, Abnormal face, T-cell deficiency, Clefting, e Hypocalcemia</i> (defeito cardíaco conotruncal, face anormal, células T deficientes, fissura e hipocalcemia, decorrentes de uma anormalidade no cromossomo 22)
CDC45L	símbolo do nome oficial do gene <i>Cell Division Cycle 45, S. Cerevisiae, Homolog-Like, CDC45-like</i>
CES	do inglês <i>Cat Eye Syndrome</i> (Síndrome do olho-de-gato)
CGHa	Comparative Genomic Hybridization array (hibridização comparativa de genomas de array)
CHARGE	<u>C</u> oloboma of the eye, <u>H</u> ear defects, <u>A</u> tresia of the choanae, <u>R</u> etardation of growth and/or development, <u>G</u> enital and/or urinary abnormalities, and <u>E</u> ar abnormalities and deafness (Coloboma de íris, cardiopatia congênita, atresia de coanas, retardo de crescimento e/ou desenvolvimento, anomalias genitais e/ou urinárias e do pavilhão auricular e/ou surdez)
CLTCL1	símbolo do nome oficial do gene <i>Clathrin, Heavy Polypeptide-Like1 Isoform 1</i>
CLDN5	símbolo do nome oficial do gene <i>Claudin 5</i>
COMT	símbolo do nome oficial do gene <i>Catecol-O-Metiltransferase</i>
CRKL	Símbolo do nome oficial do gene <i>V-CRK Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog (Avian)-Like</i>
CROMHU	Sistema Computacional para Análise de Cromossomo Humano
del	deleção
de novo	anomalia cromossômica não herdada

der (22)	cromossomo derivado do cromossomo 22
DGRC	Região Crítica DiGeorge
DGCR8	símbolo do nome oficial do gene <i>DiGeorge Syndrome Critical Region gene 8</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dup	duplicação
DVF	disfunção velofaríngea
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EHMT1	símbolo do nome oficial do gene <i>Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase</i>
Fgf8	Fator de crescimento fibroblástico 8
Fgf10	Fator de crescimento fibroblástico 10
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization (hibridização <i>in situ</i> com fluorescência)
GBW	técnica de bandamento G usando Giemsa, tampão borato e Wright-Giemsa
GTG	técnica de bandamento G usando Giemsa, tripsina e Giemsa
GNB1L	símbolo do nome oficial do gene Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Beta Polypeptide 1-like
GP1BB	símbolo do nome oficial do gene <i>Glycoprotein Ib, Beta Polypeptide Precursor</i>
GTG	técnica de bandamento G usando tripsina
h	heterocromatina constitutiva
HIRA	símbolo do nome oficial do gene <i>HIR Histone Cell Cycle Regulation Defective Homolog A (S. cerevisiae)</i>
HRAC	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais
ISCN	International System Cytogenetic Nomenclature (Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética)

IVF	insuficiência velofaríngea
Kb	kilobase(s) = mil (milhares) pares de bases
KCL	cloreto de potássio
KLHL22	símbolo do nome oficial do gene <i>Kelch-like</i>
LCRs	<i>Low Copy Repeats</i> (repetições de pequeno número de cópias)
Mb	megabase(s) = 1 milhão(ões) de pares de bases
mer(s)	determinado(s) número(s) de subunidade(s), um número na frente do sufixo mer significa um determinado número de subunidades, quando aplicado ao DNA, especifica o número de bases na molécula
ml	mililitro(s)
mat	origem materna
MED15	símbolo do nome oficial do gene <i>Mediator Complex Subunit 15; PCQAP</i>
miRNAs	micro RNAs
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação)
NOR(s)	região(ões) organizadora(s) de nucléolo
nt	nucleotídeo(s)
OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man (Herança Mendeliana no Homem Online)
OAV	Espectro ocular-auricular-vertebral
p	braço curto do cromossomo
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
qPCR	Real Time PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real)
PRODH	símbolo do nome oficial do gene <i>Prolina Desidrogenase (oxidase) 1</i>

q	braço longo do cromossomo
RHNA	Recombinação Homóloga Não Alélica
s	satélite
SD22q11	Síndrome da deleção vinte e dois q um um
SDG	Síndrome de DiGeorge
SNP(s)	Polimorfismo(s) de Nucleotídeo Único
SNPa	Polimorfismo de Nucleotídeo Único de array
SR	Sequência de Robin
SVCF	Síndrome Velocardiofacial
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TBX1	símbolo do nome oficial do gene <i>T-box transcription factor TBX1</i> , <i>T-box 1</i>
TDR	<i>Typically Deleted Region</i> , região tipicamente deletada
TXNRD2	símbolo do nome oficial do gene <i>Thioredoxin reductase 2</i>
TUPLE1	símbolo do nome oficial do gene <i>TUP-Like Enhancer of split gene-1</i>
UFD1L	símbolo do nome oficial do gene <i>Ubiquitin Fusion Degradation 1-Like</i>
USP	Universidade de São Paulo
X	cromossomo sexual feminino
Y	cromossomo sexual masculino
ZNF74	símbolo do nome oficial do gene <i>Zinc Finger Protein 74</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

- , separa o número de cromossomos, cromossomos sexuais e anomalias cromossômicas
- . indica sub-bandas
- perda
- + ganho

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1	MICRODELEÇÃO NA REGIÃO 22q11	41
2.2	MICRODUPLICAÇÕES NA REGIÃO 22q11	44
2.3	SÍNDROME DA DELEÇÃO 22q11 (SD22q11)	48
2.3.1	Sinais clínicos	53
2.3.1.1	<i>Anomalias craniofaciais</i>	55
2.3.1.2	<i>Anomalias palatinas</i>	57
2.3.1.3	<i>Anomalias cardíacas</i>	62
2.3.1.4	<i>Atraso no desenvolvimento e distúrbios de comportamento</i>	64
2.3.1.5	<i>Anomalias imunológicas</i>	67
2.3.1.6	<i>Anomalias esqueléticas</i>	68
2.3.1.7	<i>Anomalias oftalmológicas</i>	70
2.3.1.8	<i>Anomalias congênitas menores</i>	71
2.3.1.9	<i>Dificuldades de alimentação</i>	72
2.4	GENES DA REGIÃO 22q11	72
2.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	79
2.5.1	Cariótipo com bandamento G	80
2.5.2	Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência (FISH)	83
2.5.3	Hibridização comparativa de genomas de array (<i>comparative genomic hybridization array</i>, CGHa)	84
2.5.4	PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	86
2.5.5	Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA)	87
3	OBJETIVOS	95
3.1	OBJETIVO GERAL	97
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	97
4	INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA	99
4.1	CASUÍSTICA	101
4.2	METODOLOGIA	103
4.2.1	Coleta da amostra biológica	103

4.2.2	Cultura de linfócitos.....	103
4.2.3	Análise citogenética por bandamento G.....	105
4.2.3.1	<i>Técnicas de bandamento G</i>	105
4.2.3.2	<i>Cariótipo.....</i>	106
4.2.4	Análise molecular.....	107
4.2.4.1	<i>Extração de DNA.....</i>	107
4.2.4.2	<i>Técnica de MLPA.....</i>	108
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
6	CONCLUSÕES	139
7	REFERÊNCIAS.....	143
	ANEXOS	175
	APÊNDICES	185

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Microdeleções na banda 22q11 têm uma frequência estimada em 1:4000 nascidos vivos, com ambos os sexos igualmente afetados (Shaikh et al 2000, Ruotollo et al 2006 e Basset e Chow 2008).

Os efeitos da deleção do cromossomo 22q11 são reconhecidos clinicamente há muito tempo, no entanto, antes do reconhecimento da deleção vários termos diferentes, incluindo Velocardiofacial (SVCF; OMIM#192430) (Johns Hopkins University 2009a), DiGeorge (SDG; OMIM#188400) (Johns Hopkins University 2009b) e do olho do gato (CES; OMIM#115470) (Johns Hopkins University 2009d) (Yamagishi et al 2000, Berends et al 2001, Beauchesne et al 2005, Binenbaum et al 2008, Brunet et al 2008, Casteels et al 2008, Goldmuntz et al 2009, Hu et al 2009, Campbell et al 2010, Goldmuntz et al 2009 e Verhoeven et al 2011), entre outros foram utilizados, dependendo das características clínicas apresentadas.

Com o avanço dos testes genéticos, tornou-se claro que a deleção é a principal causa na maioria dos casos dessas síndromes e que hoje são denominadas coletivamente como síndromes da deleção 22q11 (SD22q11).

O fenótipo é variável, com mais de 180 sinais clínicos descritos, dos quais se destacam as anomalias palatinas e cardíacas e os distúrbios de comportamento e aprendizagem. Os casos graves podem resultar em morte neonatal, enquanto que indivíduos levemente afetados podem permanecer sem diagnóstico, mesmo quando adultos (Bassett et al 2009 e Bales, Zaleski e McPherson 2010).

Atualmente, a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) tem se mostrado uma ferramenta eficiente, rápida e de excelente relação custo benefício para a investigação de alterações (deleções e duplicações)

na região 22q11 em indivíduos com suspeita da SD22q11 (Schouten et al 2002, Fernández et al 2005a e Yang et al 2009a).

Considerando-se a alta prevalência dessa síndrome na população, o fato de que 60% dos indivíduos com a SD22q11 apresentam anomalias palatinas, tornou-se oportuno investigar uma amostra do universo de indivíduos do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo (HRAC/USP) com anomalias palatinas numa tentativa de diagnosticar precocemente a SD22q11. Acredita-se que o diagnóstico precoce seja fundamental para a adequada avaliação e ajudaria a equipe multidisciplinar a delinear necessidades futuras desses indivíduos e coordenar eficientemente um plano de tratamento.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Rearranjos cromossômicos podem resultar em deleções ou duplicações intersticiais ou terminais, bem como translocações não balanceadas, e todos eles, subsequentemente, em um desbalanço da dosagem gênica. Embora cada rearranjo individual seja raro na população, quando combinados, são responsáveis por uma proporção substancial dos defeitos do nascimento (Borgaonkar 1989 e McDermid e Morrow 2002).

Microdeleções e duplicações recorrentes ocorrem por meio de recombinação homóloga não alélica (RHNA), inter ou intracromossômica, causada por desalinhamento de duplicações segmentares ou devido à presença de várias regiões de repetições de pequeno número de cópias denominadas LCRs (*Low Copy Repeats – LCRs*) (Blennow et al 2008, Coppinger et al 2009 e Tan et al 2011).

As LCRs compõem aproximadamente 5% do genoma humano e têm homologia de 95-99%, o que as tornam propensas a interagir e facilitar a RHNA levando ao ganho, perda ou inversão da sequência de DNA (ácido desoxirribonucleico), dando origem a uma série de síndromes, os assim chamados distúrbios genômicos. Para a maioria das regiões de microdeleção, a duplicação recíproca tem sido identificada com uma frequência menor em comparação a deleção (Blennow et al 2008, Coppinger et al 2009 e Guo et al 2011a).

Embora o cromossomo 22 represente apenas 2% do genoma humano, rearranjos recorrentes em sua estrutura estão associados a múltiplas doenças malignas e anormalidades do desenvolvimento. A maioria desses rearranjos ocorre na região 22q11, sugerindo instabilidade genômica relacionada à estrutura dessa região devido a um elevado número de LCRs, e, consequentemente, muitos

distúrbios envolvendo essa região genômica têm sido descritos (Shaikh et al 2000, Blenow et al 2008, Guo et al 2011a e Yu et al 2011).

Esse arranjo peculiar no braço longo do cromossomo 22 (Figura 1) predispõe a região 22q11 a rearranjos genômicos, como deleções e duplicações, devido à presença de oito LCRs conhecidas como LCRs22 (Edelman et al 1999, Nogueira et al 2007, Brunet et al 2006, Jalali et al 2008, Ogilvie et al 2009, Rosa et al 2009, Draaken et al 2010 e Sorensen et al 2010).

Evidências recentes indicam que esses elementos repetitivos são compostos por grandes blocos de sequências específicas do cromossomo 22 duplicadas (>100Kb). Cópias de LCRs 22 têm sido descritas próximas ou no ponto de quebra da deleção típica de 3Mb em 22q11.2 e dos pontos de quebra da duplicação da síndrome do olho do gato (CES). Isso levou a hipótese que recombinações homólogas entre cópias de LCRs 22 mediam deleções e duplicações associadas a essas síndromes bem como outros rearranjos do cromossomo 22 (Shaikh et al 2000).

LCRs22= repetições de pequeno número de cópias no cromossomo 22.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=22>

Figura 1 - Cromossomo 22, em destaque a banda 22q11.

Todos os rearranjos em indivíduos com SD22q11 ocorrem dentro dessas LCRs22 e o tamanho das deleções 22q11 são variáveis. Acredita-se que aproximadamente 90% das deleções que ocorrem na SD22q11 apresentem um tamanho de 3Mb estendendo-se da LCR22-A a LCR22-D (Figura 2) (Edelmann et al 1999, Lee et al 2009, Draaken et al 2010, Rosa et al 2010 e Sorensen et al 2010). Apesar dos extensivos estudos moleculares, a posição precisa dos pontos de quebra das duas LCRs (B e D) associadas com a maioria dessas síndromes, permanece em grande parte obscura, devido a sua alta similaridade e por haver oito

LCRs22q11, o que compreende 11% da região, dificultando a identificação das sequências (Bittel et al 2009 e Guo et al 2011a).

Esses rearranjos explicam não somente os pontos de quebra e a existência de um rearranjo recorrente comum entre os indivíduos com deleção 22q11, mas também a alta prevalência de novas deleções (Wilson et al 1992, Ben-Sachar et al 2008 e Lee et al 2009).

LCRs22=repetições de pequeno número de cópias no cromossomo 22; CEN=centrômero; Mb=megabases; SD=síndrome da deleção.

Fonte: Adaptado de: 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.

Nota: Oito LCRs22 (1-8) foram mapeadas nessa região. A região tipicamente deletada (TDR) de aproximadamente 3 Mb está presente na maioria dos indivíduos com as síndromes Velocardiofacial/DiGeorge e a deleção de 1,5 Mb em 8%. As deleções atípicas não são mostradas.

Figura 2 - Região 22q11.

Essa susceptibilidade da banda 22q11 a rearranjos cromossômicos leva a diferentes síndromes com anomalias congênitas: Velocardiofacial (SVCF; OMIM#192430) (Johns Hopkins University 2009a) e DiGeorge (SDG; OMIM#188400) (Johns Hopkins University 2009b), do olho de gato (CES; OMIM#115470) (Johns Hopkins University 2009d) e der (22) (Zackai e Emanuel 1980, Driscoll et al 1992, Edelmann et al 1999, McDermid e Morrow 2002 e Emanuel 2008) (Draaken et al 2010) (Figura 3).

VCFS/DSG=Síndrome Velocardiofacial/Síndrome de DiGeorge; Dup=duplicação; Síndrome der (22); CES=Síndrome do olho do gato.

Fonte: McDermid HE, Morrow BE. Genomic disorders on 22q11. Am J Hum Genet. 2002; 70(5):1077-88.

Nota: Uma grande variedade de rearranjos na região 22q11 na linha germinativa estão associados com anomalias congênitas. As síndromes Velocardiofacial/DiGeorge (SVCF/SDG) estão associadas com deleção intersticial hemizigota e há relatos de duplicação intersticial do mesmo intervalo que está deletado nos indivíduos com as SVCF/SDG. Indivíduos com a síndrome der (22) têm uma trissomia parcial da região 22pter-q11. Indivíduos com a síndrome do olho do gato (CES) têm um cromossomo 22 supranumerário bisatélite que resulta em uma tetrassomia parcial.

Figura 3 - Rearranjos na região 22q11.

2.1 MICRODELEÇÃO NA REGIÃO 22q11

O primeiro relato da microdeleção 22q11 foi descrito por Scambler et al (1992) e outros estudos subsequentes definiram a região crítica e a deleção típica utilizando cariótipo de alta resolução e a técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) (Swillen et al 1998, e Fomin 2009).

A deleção é causada por um evento de recombinação homóloga durante o primeiro estágio da prófase da meiose, na maioria das vezes secundária a um erro de pareamento das sequências de DNA entre dois cromossomos 22 (inter ou intracromossômica), de forma que a *LCR* proximal de um deles reconhece a distal do outro. Como os cromossomos estão muito próximos e alinhados, acontece um

crossing-over desigual, fazendo com que um dos cromossomos 22 sofra deleção e o outro receba material cromossômico extra (duplicação) (Swillen et al 2000, Kobrynski e Sullivan 2007 e Rosa et al 2009).

Dessa forma, a deleção em um cromossomo deveria resultar na duplicação do outro. Como esperado, a duplicação da região cromossômica que está deletada em indivíduos com a SD22q11 tem sido relatada, o que expande a lista genômica de síndromes de duplicação/deleção (Portnoi 2009) (Figura 4).

LCR22=repetições de pequeno número de cópias no cromossomo 22; cen=centrômero; Mb=megabase.

Fonte: Portnoi MF. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Europ J Med Genet.* 2009; 52(2/3):88-93.

Figura 4 - Modelo para eventos envolvendo a recombinação homóloga LCR22s levando a deleção e duplicação recíproca típica de 3 Mb.

Para determinar as bases moleculares das deleções na região 22q11, foi desenvolvido um mapa físico e foi realizada análise de haplótipos em indivíduos com a SD22q11. Três classes de deleções foram identificadas: de 3 Mb em 90% dos indivíduos, conhecida como a região tipicamente deletada (*typically deleted region*, TDR); de 1,5 Mb em 7% a 8% dos indivíduos, identificada como região crítica DiGeorge (DGRC) e, em 2 a 3%, rearranjos menores dentro da região crítica de 3

Mb (Augusseau et al 1986, Lindsay et al 1995, Carlson et al 1997, Edelman et al 1999, Reish et al 2003, Ruiter et al 2003, D'Antoni et al 2004, Shaikh et al 2007, Stachon et al 2007, Bashir et al 2008, Blennow et al 2008, Brunet et al 2006, Emanuel 2008, Nogueira et al 2008, Rosa et al 2009, Yang 2009 e Draaken et al 2010).

Recentemente, um pequeno número de indivíduos com deleções atípicas, que não se sobrepõem a região típica de 3 Mb tem sido relatados (Verhoeven et al 2011). Assim, testes moleculares que identifiquem variantes e o tamanho das deleções atípicas são relevantes não apenas para o aumento das taxas de diagnósticos, mas também para identificação de genes específicos que poderiam estar envolvidos em diferentes fenótipos da SD22q11 (Stachon et al 2007).

Deleções são, geralmente, esporádicas (eventos *de novo*), mas, uma vez que ocorram podem ser transmitidas (Barisic et al 2008 e Kyburz et al 2008). A microdeleção 22q11 *de novo* ocorre em, aproximadamente, 90% dos casos. O risco de recorrência para um casal com um filho afetado pela SD22q11, devido a uma mutação *de novo*, é baixo (1% a 3%), pois existe a possibilidade (pequena, mas ao mesmo tempo indeterminada) de que um dos pais apresente um mosaicismos para a deleção na sua linhagem germinativa. Quando herdada de um dos pais, segue um padrão autossômico dominante (10% dos casos), ou seja, indivíduos com a deleção apresentam um risco de 50% de a transmitirem a seus filhos (Cuneo 2001, Nogueira et al 2007, Halder et al 2008, Kyburz et al 2008, Umlauf 2008, Belangero et al 2009, De Smedt et al 2009, Rosa et al 2009, Van Engelen et al 2010 e Tao et al 2010).

Ambos os pais de um indivíduo com a SD22q11 devem ser testados para excluir a possibilidade de que um deles apresente a deleção. Se um indivíduo apresenta sinais clínicos da deleção 22q11 e cariótipo normal, recomenda-se o

estudo do indivíduo e dos pais pelas técnicas de FISH ou amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) (Rosa et al 2009).

Recentemente, mais atenção tem sido dirigida ao diagnóstico precoce da SD22q11. A presença de uma microdeleção 22q11 pode ser suspeitada no período pré-natal. Dados de imagens de exame de ultrasonografia fetal, como o valor da medida da translucência nuchal, no primeiro e segundo trimestre da gestação, uma malformação cardíaca conotruncal e uma ausência ou hipoplasia do timo, podem facilitar o diagnóstico pré-natal desta síndrome (Kyburz et al 2008). Deve-se enfatizar, no entanto, que o diagnóstico preciso é difícil em alguns casos, devido à ausência de características clássicas ou história familiar. Portanto, diagnóstico genético é essencial (Tao et al 2010).

2.2 MICRODUPLICAÇÕES NA REGIÃO 22q11

Duplicações na região 22q11 incluindo a DGCR também têm sido relatadas, mas em uma frequência muito menor que a deleção (Blennow et al 2008 e Portnoi 2009).

A síndrome da duplicação 22q11 (dup22q11) é uma condição recentemente descrita, com o primeiro relato na literatura de Edelman et al (1999), de uma menina de quatro anos de idade que apresentava face estreita e fendas palpebrais inclinadas para baixo, e apresentava microduplicação 22q11, correspondente a mesma região tipicamente deletada de 3 Mb em indivíduos com a SD22q11. A mãe e a avó, aparentemente normais, tinham apêndices pré-auriculares e a microduplicação.

A procura sistemática da microduplicação 22q11 foi empreendida por Ensenauer et al (2003), que analisaram 653 indivíduos suspeitos da deleção 22q11 e identificaram 1,5% desses indivíduos com a presença de um segmento proximal de 1,5 Mb a 3 Mb, envolvendo a mesma região e os mesmos genes que estão deletados na SD22q11 (Hassed et al 2004, Yobb et al 2005, Brunet et al 2006, Ou et al 2008 e Portnoï 2009).

A caracterização molecular das microduplicações 22q11 mostrou que a maioria dos indivíduos apresenta duplicação de aproximadamente 3 Mb (LCR-A a LCR-D), abrangendo aproximadamente 40 genes, e é recíproca a região tipicamente deletada em indivíduos com a SD22q11, enquanto poucos indivíduos apresentam duplicações de 1,5 Mb (LCR-A a LCR-B). Duplicações atípicas e duplicações maiores de 4 Mb (LCR-A a LCR-E) e de 6 Mb (LCR-A a LCR-G) também têm sido relatadas (Portnoï 2009) (Figura 5).

LCRs: repetições de pequeno número de cópias; del= deleção; dup= duplicação; Mb= megabases.

Fonte: Portnoï MF. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Europ J Med Genet.* 2009; 52(2/3):88-93.

Nota: Em destaque os locais das LCR22s, e a maioria dos pontos de quebra das síndromes de deleção e duplicação 22q11.2. Barras sólidas acima do mapa retratam a maioria das deleções/duplicações nessas síndromes.

Figura 5 - Representação esquemática do mapa físico da região 22q11.2.

Esses achados mostram que não há uma correlação entre o tamanho da duplicação e a gravidade da apresentação fenotípica. Isto sugere que, além de dosagem gênica, outros mecanismos, tais como interações genéticas e/ou ambientais podem ser importantes na determinação do resultado fenotípico de indivíduos com duplicação 22q11 (Portnoï 2009).

Yobb et al (2005) relataram o primeiro indivíduo com uma triplicação 22q11 cuja mãe apresentava uma duplicação 22q11. Blennow et al (2008) descreveram um indivíduo com deleção e duplicação da região 22q11 de 3 Mb, simultâneas, e com algumas características da síndrome SD22q11. A mesma duplicação, sem deleção e não incluindo a DGCR, foi encontrada em vários membros desta mesma família.

Dados recentes sugerem que a frequência das duplicações é aproximadamente metade das deleções. A escassez de duplicações pode ser explicada pelo viés de averiguação com um fenótipo mais leve em casos de duplicação ou viés de detecção devido à resolução do método utilizado. Outra possibilidade é que a frequência de duplicações, por alguma razão, seja verdadeiramente menor do que a frequência de deleções (Blennow et al 2008 e Portnoï 2009). Em um estudo com 7000 indivíduos encaminhados para análise genômica de microarray para a investigação de atraso do desenvolvimento e mental, a duplicação de 3 Mb foi identificada em 10 indivíduos, dando uma prevalência, nesse estudo, de aproximadamente 1:700 (Ou et al 2008). Uma vez que poucas duplicações têm sido relatadas, suspeita-se que o diagnóstico dessa condição também seja subestimado, fato apoiado pela diversidade clínica, apresentando desde fenótipo moderado a fenótipo aparentemente normal nesses indivíduos (Brunet et al 2006, Courtens, Schramme e Laridon 2008, Ou et al 2008 e Shimojima, Imai e Yamamoto 2010).

A dup22q11 tem sido caracterizada como uma entidade clínica diferente, com características que se sobrepõem à SD22q11 (Portnoï et al 2005), embora alguns indivíduos não apresentem anomalias fenotípicas (Wentzel et al 2008). O fenótipo é geralmente leve e extremamente variável, desde morte intra-uterina devido a defeitos cardíacos congênitos, a pais portadores não afetados (De La Rochebrochard et al 2006) e quadros aparentemente normais ao atraso mental, atraso de linguagem, no desenvolvimento psicomotor e de crescimento e/ou hipotonia (Cotter et al 2005, Courtens, Schramme e Laridon 2008, Ou et al 2008 e Berg, Potocki e Bacino 2010).

A dup22q11 pode ser herdada de forma autossômica dominante ou ocorrer como um evento *de novo* e, como apresenta penetrância incompleta, os pais devem ser testados para distinguir os casos *de novo* e os herdados. A prole de indivíduos com a dup22q11 tem probabilidade de 50% de herdar a duplicação (Courtens et al 2008). A maioria dos indivíduos diagnosticados com dup22q11 a herdaram de um dos pais (Yu et al 2008). Wentzel et al (2008) observaram transmissão familiar em 70% dos casos analisados. Isto está em contraste marcante com SD22q11, onde aproximadamente 90% ocorre como um evento *de novo*. A duplicação pode ser herdada por várias gerações (Yu et al 2008). No entanto, não é possível prever o fenótipo, uma vez que muitos indivíduos que têm essa alteração genômica são clinicamente normais (Courtens et al 2008).

Um pai que tem a dup22q11 pode ter um fenótipo normal ou quase normal, embora a alteração do genoma pareça ser idêntica à do filho e este apresente características clínicas (Yu et al 2008).

Se os pais de um indivíduo com a dup22q11 forem submetidos a estudos por meio de FISH/MLPA /CGHa com resultados normais, o risco para os irmãos é

baixo, porém maior do que o da população geral, porque a mãe pode ter o mosaicismo germinal ou baixo nível de mosaicismo somático que também inclui as gônadas (Courtens et al 2008).

Duplicações envolvendo cromossomo 22 podem ser mais difíceis de identificar do que as deleções usando a tecnologia padrão. Duplicações são, muitas vezes, perdidas na técnica FISH porque os sinais são duplicados em estreita proximidade um com o outro e não podem ser distinguidos em cromossomos metafásicos. Elas têm sido mais facilmente identificadas na intérfase. Essas limitações técnicas da FISH podem impedir a identificação de um número muito maior de indivíduos com microduplicação (Jalali et al 2008 e Portnoï 2009). Com a aplicação clínica de MLPA ou de CGHa, o número de indivíduos detectados com duplicação 22q11 certamente aumentará e poderá levar ao reconhecimento de um espectro mais amplo do fenótipo (Portnoï 2009).

2.3 SÍNDROME DA DELEÇÃO 22q11 (SD22q11)

Síndromes de microdeleção estão definidas como anomalias cromossômicas constitucionais viáveis para o ser humano, resultantes da perda de pequena parte de DNA em heterizigose, devido à presença de sequências de DNA repetidas que são propensas a deleção (aproximadamente 1–5Mb) em regiões particulares do genoma humano meioticamente instáveis (Lupski 1998, Kosaki et al 2009 e Yeshaya et al 2009).

Síndromes de microdeleções/microduplicações e desequilíbrios subteloméricos submicroscópicos são conhecidos por estarem associados com atraso mental e malformações (Kjaergaard et al 2010). A síndrome da deleção

22q11 (SD22q11) é a síndrome de microdeleção mais frequente em seres humanos (Kokitsu-Nakata, Guion-Almeida e Richieri-Costa 2008 e Izco et al 2009).

As SD22q11 são um grupo de condições causadas por uma deleção submicroscópica no braço longo (q) na banda q11 do cromossomo 22, região que compreende aproximadamente 30 a 40 genes (Jalali et al 2008 e Lundin et al 2010), significando que um segmento de genes contíguos está ausente em um dos braços de um dos cromossomos do par 22 (Umlauf 2008) (Figura 6). Esse grupo de condições compartilha um espectro característico com diversas anomalias congênitas como anomalias cardíacas, deficiências imunológicas secundárias, aplasia ou hipoplasia do timo, hipocalcemia, devido a glândulas paratireóides pequenas ou ausentes, anomalias palatinas, anormalidades da fala, dificuldade cognitiva e transtornos psiquiátricos (Ziolkowska et al 2008 e Fomin et al 2010).

Os indivíduos com a SD22q11 podem apresentar achados clínicos que se sobrepõem ao de outras doenças genéticas conhecidas, como as síndromes de Noonan (Wilson et al 1993b e Rosa et al 2009), Kousseff (Forrester et al 2002 e Rosa et al 2009), Opitz G/BBB (McDonald-McGinn et al 1995, Rosa et al 2009 e Johns Hopkins University 2009c), Goldenhar (Derbent et al 2003 e Rosa et al 2009), associação CHARGE (Devriendt, Swillen e Fryns 1998, Jyonouchi et al 2009 e Rosa et al 2009) e a síndrome cardiofacial de Cayler (ACF; OMIM%125520) (Cuneo 2001, Rioja-Mazza et al 2005 e Johns Hopkins University 2009e).

A primeira descrição da SD22q11 na literatura médica foi realizada por Sedláčková (1955), uma fonoaudióloga que relatou um grupo de indivíduos com voz anasalada e diminuição da mímica facial.

Em 1968, o cardiologista pediátrico Robert Strong descreveu uma família na qual a mãe e seus três filhos apresentavam arco aórtico à direita, dismorfismo facial

e déficit cognitivo (Strong 1968). DiGeorge (1968), endocrinologista pediátrico, relatou três crianças com deficiência imune letal de células T associada à hipoplasia das paratireóides. Na época, ele atribuiu esses achados a uma anormalidade do desenvolvimento do terceiro e quarto arcos branquiais e, nos casos subsequentes, notou uma associação com anomalias do arco aórtico.

Cayler (1969) descreveu uma série de indivíduos com anomalias cardíacas conotruncais e face assimétrica ao choro. Em 1976, no Japão, Kinouchi et al, citados por Rosa et al 2009, relataram uma síndrome caracterizada por cardiopatia congênita e aparência facial típica à qual denominaram “síndrome da anomalia facial conotruncal”.

Shprintzen et al (1978) descreveram 12 indivíduos com um quadro de cardiopatia congênita, voz anasalada com anomalias de palato, aparência facial característica e dificuldades de aprendizagem. Na época, ele usou o termo “síndrome velocardiofacial” para caracterizar o quadro, que também ficou conhecido como síndrome de Shprintzen (Robin e Shprintzen 2005 e Rosa et al 2009).

De La Chapelle et al (1981) descreveram um rearranjo cromossômico não balanceado envolvendo os cromossomos 20 e 22 em quatro indivíduos de uma mesma família com a síndrome de DiGeorge (DG). Isto foi a base para identificar a microdeleção 22q11 nos anos subsequentes (Scambler et al 1992).

Para unificar esse grande número de distúrbios relacionados à deleção 22q11, foi proposto o acrônimo *CATCH22* (*Conotruncal heart defect, Abnormal face, T-cell deficiency, Clefting, e Hypocalcemia*, decorrentes de uma anormalidade no cromossomo 22) (Wilson et al 1993a), que foi rejeitado por muitos geneticistas clínicos devido à conotação negativa associada ao termo “*catch-22*” (traduzido para

o português como “ardil-22”), do romance de Heller (1962), que significava uma situação de perdedor (Robin e Shprintzen 2005, Shprintzen 2008 e Rosa et al 2009).

Dessa forma, optou-se inicialmente pelo uso do termo síndrome de DiGeorge/Velocardiofacial (DG/VCF), mas Basset et al (1998) sugeriram o termo síndrome da deleção 22q11 (SD22q11), um termo que unifica etiologicamente as nomenclaturas DG/VCF e utilizado até hoje (Hay 2007, Rosa et al 2009, Sorensen et al 2010 e Tan et al 2010). Portanto, essa designação foi a utilizada no presente estudo.

Estudos de casos familiares têm indicado que a herança da cópia do cromossomo 22q11 deletado é suficiente para produzir o fenótipo da síndrome, e pode-se concluir que haploinsuficiência de um ou mais genes a partir do intervalo que é comumente deletado nesses indivíduos seja a base etiológica para a maioria dos casos da síndrome (Sirotkin et al 1997).

Muito esforço tem sido canalizado para desvendar o desenvolvimento da patogênese de fenótipos complexos decorrentes de alterações do número de cópias na região 22q11. Cada vez mais evidências em estudos em humanos e em modelos animais sugerem que não apenas a sensibilidade às mudanças na dosagem gênica durante a embriogênese, mas também a existência de fatores modificadores afeta o resultado fenotípico (Tan et al 2010).

Algumas deleções atípicas foram encontradas distalmente à região comumente deletada. O primeiro relato da SD22q11 distal foi descrito pela primeira vez por Rauch et al (2005) e encontrada por acaso por Ravnan et al (2006) em oito indivíduos com atraso de desenvolvimento inexplicado testados por FISH.

Na síndrome da deleção 22q distal, a região deletada é tipicamente flanqueada pelas LCR22-4 (D) e LCR22-6 (F). Há poucos relatos de indivíduos com

a síndrome deleção 22q11 distal, caracterizada por microdeleções imediatamente teloméricas a deleção típica da região da SD22q11 (Fernández et al 2009 e Beddow et al 2011).

Em um grupo de indivíduos com cardiopatias congênitas conotruncal analisados por FISH, 7,8% dos casos apresentaram deleção atípica distal a região comumente deletada. Curiosamente, estes indivíduos apresentaram apenas características leves sugestivas da SD22q11 (Rauch et al 2005). Em seguida, a região distal deletada foi caracterizada por CGHa. Quatro LCRs distais foram identificadas e designadas como LCR-E a LCR-H (Shaikh et al 2007). Estas LCRs estão localizadas na região 22q11.2 entre 20.654 Mb e 23.215 Mb, enquanto que a LCRs proximais (LCR-A LCR-D) que estão inclusas na região normalmente deletada de 3 Mb região, estão localizadas de 17.310 Mb a 20.241 Mb (Verhoeven et al 2011).

Os sinais fenotípicos da síndrome 22q distal incluem leve atraso no desenvolvimento com uma leve deficiência intelectual ou inteligência normal, dismorfismo facial sutil, filtro suave, sobrancelhas arqueadas e atraso de crescimento. Há relatos de baixa estatura e cardiopatia (deficiência do hormônio do crescimento, prematuridade, defeitos cardíacos conotruncal atípicos e anomalias do truncus arteriosos). Anomalias esqueléticas são menos frequentemente observadas, porém mais comuns e de natureza diferente do que as observadas indivíduos com SD22q11 intersticial (Ben-Shachar et al 2008, Beddow et al 2011, Beddow et al 2011 e Verhoeven et al 2011) (Figura 6).

Fonte: Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, Belmont JW, Patel MS, Hummel M, et al. 22q11.2 distal deletion: A recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and Velocardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008; 82(1):214-21.

Nota: Indivíduo A apresenta deleção de 2,1 Mb (LCR22 D-F) e cariótipo 47,YYY; indivíduo B-C deleção de 2,1Mb e cariótipo 46,XY; indivíduo D, deleção 1,4 Mb (LCR22 D-E) e cariótipo 46,XY; indivíduo E-F, deleção de 1,4 Mb (LCR22 D-E) e cariótipo 46,XY.

Figura 6 - Aspectos clínicos de indivíduos com SD22q11 distal.

2.3.1 Sinais clínicos

A SD22q11 se caracteriza por um espectro fenotípico bastante amplo, com efeitos pleiotrópicos que resultam no acometimento de praticamente todos os órgãos e/ou sistemas, altamente variável com mais de 180 sinais clínicos descritos, tanto físicos como comportamentais (Cuneo 2001, Hay 2007, Stachon et al 2007, Ballesta Martínez et al 2008 e Rosa et al 2009) (Anexo 3).

Nenhuma dessas características, contudo, ocorre com 100% de frequência, indicando não existirem manifestações patognomônicas ou obrigatórias para a síndrome, o que dificulta o seu diagnóstico clínico (Shprintzen 1981, 1988, 2005, 2008, Shprintzen et al 2005, Hay 2007, Rosa et al 2009 e Brandão 2010). Entretanto, algumas delas são cardinais e deveriam levar a um alto índice de

suspeita, como a presença de fissura de palato e a sequência de Robin (SR; OMIM%261800) (Johns Hopkins University 2009f), pois aproximadamente 11% dos casos de SR ocorrem com a SD22q11 (Glander e Cisneros 1992, Zechi 1998, Van den Elzen et al 2001, Shprintzen 2005, Breugem e Mink van der Molen 2008, Rosa et al 2009, Dalben, Richieri-Costa e Taveira 2010 e Fuzza e Abuabara 2010).

Os principais sinais clínicos observados são atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, atraso na aquisição da fala, dismorfismos faciais, anomalias de palato (fissura de palato ou disfunção velofaríngea) em 60% dos casos, anomalias cardíacas em 75%, distúrbios de comportamento e aprendizagem (79%-90%), imunodeficiência (77%) e hipocalcemia (50%) (Goldber et al 1993, Goldmuntz 2005, Casteels et al 2008, Kyburz et al 2008, Ziolkowska et al 2008, Binenbaum et al 2008, Ballesta Martínez et al 2009, Goldmuntz et al 2009, Hu et al 2009, Heike et al 2010, Madan et al 2010 e Naqvi et al 2010).

Distinta de outras síndromes de microdeleção cromossômica em que aspectos do fenótipo parecem estar relacionados com o tamanho da deleção, na SD22q11 a maioria dos estudos não mostra correlação entre o tamanho da deleção e a gravidade do fenótipo (Berti et al 2001, Stachon et al 2007, Maynard et al 2008, Simioni 2008 e Rosa et al 2009).

A grande variabilidade clínica, tanto intra como interfamiliar (Thomas e Graham Junior 1997 e Digilio et al 2003), tem feito com que as correlações genótipo-fenótipo sejam difíceis. Como mostrado em vários relatos de membros da mesma família, diferenças fenotípicas são observadas mesmo entre gêmeos monozigóticos com deleções idênticas e diferentes fenótipos e alguns indivíduos não apresentam anomalias fenotípicas (D'Antoni et al 2004, Rosa et al 2009 e Draaken et al 2010).

As principais características da SD22q11 envolvem tecidos e órgãos derivados da crista neural, sugerindo que a síndrome está patologicamente relacionada ao desenvolvimento anormal das células da crista neural durante a embriogênese (Yamagishi et al 2000).

O sistema faríngeo é um complexo embrionário transitório específico para os vertebrados. É composto pelos arcos faríngeos, que são protuberâncias de tecidos da mesoderme e derivados da crista neural por onde passam os nervos e artérias do arco faríngeo. Durante o desenvolvimento embrionário, células da crista neural migram para os arcos faríngeos, se distribuem e participam da morfogênese dos tecidos e órgãos do sistema faríngeo, como as estruturas craniofaciais (orelha externa e média, palato, do pescoço, faringe), os grandes vasos do coração (incluindo arco aórtico e seus ramos), do timo, das glândulas tireóide e paratireóide, entre outros órgãos e estruturas (Baldini 2005 e Momma 2010). Como consequência da deleção, os órgãos relacionados com o terceiro e quarto arcos branquiais têm o desenvolvimento prejudicado. É possível que um defeito em quaisquer células da crista neural, na sua migração e/ou diferenciação nos arcos faríngeos, seja responsável pelos principais achados clínicos da SD22q11 (Carlson et al 1997, Berti et al 2001, Baldini 2005, Aggarwal e Morrow 2008, Ziolkowska et al 2008, Momma 2010 e Zemble et al 2010).

2.3.1.1 Anomalias craniofaciais

Uma das primeiras características reconhecidas na SD22q11 é a aparência facial típica, embora nem sempre presente e que muitas vezes, são menos pronunciadas no início da infância e vão tornando-se aparente apenas em idade mais avançada (Bales, Zaleski e McPherson 2010 e Alkalay et al 2011) (Figura 7).

Fonte: Alkalay AA, Guo T, Montagna C, Digilio MC, Dallapiccola B, Marino B, et al. Genetic dosage compensation in a family with velo-cardio-facial/DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet.* 2011; 155(A):548-54.

Figura 7 - Aspectos clínicos de indivíduo com SD22q11 aos 2 (A), 6 (B) e 12 anos (C).

Entre as anomalias craniofaciais destacam-se características faciais dismórficas, como hipotonia facial, fendas palpebrais estreitas, base nasal larga, hipoplasia alar, hipoplasia de face média, fissura palatina e retrognatia (Shprintzen et al 1978, 1981, Cuneo 2001, Óskarsdóttir et al 2005, Shprintzen e Golding-Kushner 2008, Butts 2009, Bales, Zaleski e McPherson 2010 e Brandão 2010) (Figura 8).

Fonte: Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study. *Develop Disabil Res Rev.* 2008; 14(1):3-10.
Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, et al. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet.* 2005; 42(11):871-6.

Figura 8 - Aspectos clínicos de indivíduos com SD22q11 (A-H).

Atualmente, há relativamente poucas pesquisas sobre a relação entre a microdeleção 22q11 e deformidades faciais, entretanto, alguns estudos mostram que quando as características faciais são consideradas como achados no diagnóstico clínico da síndrome, aumenta a especificidade e a precisão do diagnóstico, e que as taxas de prevalência da deleção 22q11 em fetos com deformidades faciais é relativamente alta (Tao et al 2010).

2.3.1.2 Anomalias palatinas

As fissuras labiopalatinas são comuns entre as malformações que atingem a face do ser humano, ocorrem com uma prevalência média entre 1 e 2 indivíduos brancos para cada 1000 nascimentos. A etiologia é multifatorial, ou seja, interação complexa entre um conjunto de diferentes genes do indivíduo e os fatores ambientais (Rodrigues et al 2005, Vieira et al 2005, Genisca et al 2009, Aquino et al 2011 e Dixon et al 2011). No Brasil, admite-se que a incidência de fissuras labiopalatinas oscila em torno de 1:650 (Vieira et al 2005 e Silva-Filho e Freitas 2007) e elas podem ocorrer de forma isolada ou sindrômica (Nopoulos et al 2007, Shi, Wehby e Murray 2008, Genisca et al 2009 e Dixon et al 2011). Mais de 400 síndromes descritas, incluindo desordens cromossômicas ou mendelianas, apresentam fissuras labiopalatinas no seu espectro clínico (Rodrigues et al 2005, Meng et al 2009 e Scapoli et al 2008).

A SD22q11 é a síndrome mais comum que apresenta anomalias palatinas como uma característica importante (Ruiter et al 2003, Hay 2007 e Bales, Zaleski e McPherson 2010). A frequência de anomalias palatinas em indivíduos com SD22q11

é de aproximadamente 60%, sendo 9% fissura de palato, 5% fissura de palato submucosa e 32% disfunção velofaríngea (Ryan et al 1997).

Sivertsen et al (2007) encontraram a deleção 22q11 em 1,8% dos indivíduos com fissura de palato isolada.

Segundo Hay (2007), a fissura de palato submucosa e úvula bífida, ocorrem em até 21% dos indivíduos com a síndrome SD22q11. A fissura de palato submucosa decorre de um defeito na musculatura do palato mole e/ou no tecido ósseo do palato duro que se mantém velado pela camada mucosa íntegra. A integridade da mucosa confere a falsa ideia de normalidade (Silva-Filho e Souza-Freitas 2007). Alterações de úvula, como úvula sulcada ou bífida, também são consideradas microformas de fissura de palato, uma vez que resultam de evento de não fusão de tecidos embrionários (Shapiro et al 1971). Essa microforma de fissura palatina representa um dos principais sinais clínicos para diagnóstico das fissuras submucosas e, quando isolada, pode ser subestimada pela ausência de comprometimento estético e funcional (Alvarez 2010).

Uma possível estratégia para identificar a SD22q11 precocemente por meio de investigação da deleção em todos os indivíduos com fissura de palato tem sido debatida na literatura (Reish et al 2003, Ruitter et al 2003, Hay 2007 e Barisic et al 2008).

Reish et al (2003) analisaram 38 indivíduos com idades entre 3 e 31 anos, com insuficiência velofaríngea devido à presença de anomalias palatinas isoladas, a fim de determinar a frequência da deleção 22q11, por meio de FISH. Nenhum dos indivíduos avaliados apresentou a deleção indicando que a análise de rotina para a deleção nesses casos talvez não seja indicada.

Segundo Ruiter et al (2003) a prevalência da SD22q11 entre crianças com fissura de palato não é precisamente conhecida e questionam se melhor estratégia seria testar todas as crianças com fissura de palato ou apenas aquelas com suspeita clínica.

Repetto et al (2009), descreveram as características clínicas de um grupo de 208 indivíduos com SD22q11, diagnosticados por FISH. Encontraram anomalias cardíacas congênitas e anomalias palatinas em 59,6% e 79% dos indivíduos, respectivamente, mostrando uma diferença em relação aos outros estudos que encontraram 75,8% de anomalias cardíacas congênitas e 56% de anomalias palatinas.

Driscoll et al (2006) estudaram 356 indivíduos com a SD22q11 com e sem anomalias estruturais do palato e/ou insuficiência velofaríngea, demonstrando que a variação do fenótipo palatino observada em indivíduos com a SD22q11 pode estar significativamente relacionada às características pessoais como gênero e raça e que há evidências preliminares de que o fenótipo palatino pode ser influenciado por variações nos genes que residem fora da banda 22q11.

Bashir et al (2008) analisaram a frequência da SD22q11 em 191 crianças com diagnóstico de fissura de lábio e/ou palato. Foram identificados 9 indivíduos com deleção 22q11 indicando uma porcentagem maior do que a relatada por outros trabalhos. Segundo os autores, todas as crianças com de fissura de lábio e/ou palato deveriam ser submetidas à rotina de diagnóstico da deleção.

Veerapandiyan et al (2011) estudaram 50 indivíduos com SD22q11 e encontraram anomalias palatinas em 38%. As anomalias palatinas mais comumente observadas foram palato alto (16%) e a fissura de palato submucosa (14%). Três indivíduos apresentaram fissura de palato evidente e um apresentou palato estreito.

A SD22q11 é a causa genética mais comum da disfunção velofaríngea (DVF). Aproximadamente 12,5% a 37,5% dos casos de DVF, aparentemente isolados, têm sido relacionados com a deleção 22q11 e 27% a 90% dos indivíduos com deleção 22q11 apresentam DVF, que pode ser de natureza estrutural ou funcional (Ruotolo et al 2006).

A função velofaríngea normal é dependente de múltiplos fatores e assegurada pelo movimento sincronizado das estruturas do mecanismo velofaríngeo-palato mole, paredes laterais e parede posterior da faringe. A inadequação do mecanismo velofaríngeo pode afetar a fala de diferentes formas (Trindade et al 2005 e Ruotolo et al 2006). Estas estruturas desempenham papel fundamental na produção da fala na medida em que são responsáveis pela distribuição do fluxo aéreo expiratório e das vibrações acústicas para a cavidade oral, na produção dos sons orais, e, para a cavidade nasal, na produção dos sons nasais e alterações em uma ou mais estruturas velofaríngeas pode ser uma característica de algumas síndromes craniofaciais e podem desempenhar um papel crítico na patogênese associada à disfunção velofaríngea (Driscoll et al 2006 e Ruotolo et al 2006).

O termo disfunção velofaríngea (DVF) é empregado, para definir qualquer alteração do mecanismo velofaríngeo resultante de uma alteração estrutural do mecanismo velofaríngeo, ou seja, da falta de tecido em nível do palato mole para se alcançar o fechamento velofaríngeo adequado (insuficiência velofaríngea, IVF), ou da falta de competência neuromuscular no movimento das estruturas velofaríngeas (incompetência velofaríngea), ou ainda, consequência de maus hábitos articulatórios aprendidos na infância que não refletem alterações físicas ou neuromusculares (Trindade et al 2005 e Fukushiro 2007). O sintoma mais característico da DVF é a

hipernasalidade, associado à emissão nasal de ar e a fraca pressão intra-oral e os distúrbios articulatórios compensatórios (Fukushiro 2007). A causa mais frequente da DVF é a fissura de palato, mas DVF sem fissura de palato aparente também tem sido relatada (Fukushiro 2007). Outro sinal clínico no palato, de casos com IVF sem fissura aparente, descrito na literatura, está relacionado a alterações na posição das fibras dos músculos levantadores do véu palatino, que possuem inserção anormal na margem posterior do palato duro (Kummer 2008, Mash 2003 e Brandão 2010).

Na síndrome SD22q11, a DVF pode decorrer de algumas condições estruturais como a fissura de palato evidente que, mesmo após a reparação cirúrgica, pode persistir; fissura de palato submucosa ou submucosa oculta; desproporções palato faríngeas; aponeurose palatina hipoplásica ou ausente; assimetria faríngea; hipotonia faríngea e velofaríngea hipodinâmica (Shprintzen et al 1981, Ruotolo et al 2006 e Brandão 2010).

Oh, Workman e Wong (2007) avaliaram 16 indivíduos com deleção 22q11 e observaram insuficiência velofaríngea em todos os casos; 88% destes apresentavam fissura de palato evidente ou submucosa e 81% apresentavam sinais faciais típicos.

Estes distúrbios de fala e linguagem geralmente podem não ser detectados na infância, levando ao diagnóstico em idades posteriores (Shprintzen et al 1981, Ruotolo et al 2006, Hay 2007, Rouillon et al 2009 e Brandão 2010), por outro lado, muitas vezes, apenas essa observação leva à uma investigação e diagnóstico final como SD22q11 em jovens. A maioria dos indivíduos com disfunção velofaríngea e SD22q11 são candidatos à intervenção cirúrgica (Ruotolo et al 2006). O reconhecimento de indivíduos com DVF e deleção 22q11 é importante para o adequado aconselhamento genético (Zori et al 1998).

2.3.1.3 Anomalias cardíacas

A cardiopatia congênita é um dos tipos mais comuns de defeitos do nascimento, ocorrendo em 1% dos nascidos vivos e em 10% dos fetos abortados espontaneamente (Lee et al 2009). São frequentemente associadas com anomalias cromossômicas, síndromes e outras malformações (Meberg, Hals e Thaulow 2207 e Lee et al 2009) e constituem uma característica básica da SD22q11, encontradas em 75% a 80% dos indivíduos (Yamagishi et al 2000, Cuneo 2001, Ruiter et al 2003, Reish et al 2003, Bashir et al 2008, Rosa et al 2008, Ziolkowska et al 2008, Lammer et al 2009, Lee et al 2009, Bales, Zaleski e McPherson 2010, Van Engelen 2010 e Johnson et al 2010).

A deleção do cromossomo 22q11 parece ser a segunda causa mais comum de doença cardíaca congênita depois da síndrome de Down (Jiang et al 2005) e as manifestações cardiovasculares decorrentes da deleção 22q11 são altamente variáveis (Goldmuntz et al 2009).

As células da crista neural têm grande importância no desenvolvimento do septo conotruncal. A microdeleção 22q11 provoca migração e interação inadequada dessas células causando anomalias cardíacas observadas em indivíduos com a SD22q11, afetando o desenvolvimento do conotrunko, dos arcos branquiais e da face. O principal defeito embriológico subjacente à maioria das alterações cardiovasculares observadas na SD22q11 é o defeito do desenvolvimento do quarto arco branquial e seus derivados da terceira e quarta bolsas faríngeas (Aggarwal e Morrow 2008, Ziolkowska et al 2008, Momma 2010 e Rosa et al 2009).

A cardiopatia congênita conotruncal (que envolvem as vias de saída do coração, como a interrupção do arco aórtico e o *truncus arteriosus*), e inclui a tetralogia de Fallot, atresia pulmonar com comunicação interventricular (defeito do

septo ventricular), transposição de grandes artérias, trancos arterioso comum tipo I, interrupção do arco aórtico tipo B) tem uma prevalência próxima de 0,8:1000 nascidos vivos (Beauchesne et al 2005, Robin e Shprintzen 2005, Kyburz et al 2008, Rosa et al 2008, Carmichael, Ma e Shaw 2009, Goldmuntz et al 2009 e Van Engelen et al 2010).

Dados da literatura mostram que a frequência da SD22q11 em crianças com truncus arteriosos é de aproximadamente 20% a 40%, e em indivíduos com Tetralogia de Fallot/atresia pulmonar-defeito do septo ventricular é de 17,6% a 40% (Ziolkowska et al 2008 e Momma 2010). A frequência da deleção 22q11 entre os indivíduos com cardiopatia conotruncal isolada é de aproximadamente 29%, bem menor do que a frequência de deleção entre os indivíduos com cardiopatia associada a outros sinais clínicos (75%-90%) (Belanger et al 2009 e Rosa et al 2011).

A literatura não aborda, de forma clara, se a presença da deleção 22q11 em crianças com defeitos cardíacos congênitos conotruncal, tem influência no pós-operatório, no resultado do tratamento cardiocirúrgico e nas taxas de mortalidade e morbidade após a correção cirúrgica. Estudos anteriores indicam que, em indivíduos com defeitos cardíacos congênitos conotruncais, a presença da deleção 22q11 é um fator de risco de pior sobrevida após a correção cirúrgica. De acordo com alguns autores a ocorrência de anomalias do arco aórtico e das artérias pulmonares associadas são fatores de risco para maior taxa de mortalidade após a cirurgia cardíaca. Acredita-se que os resultados da cirurgia cardíaca nesse grupo de indivíduos são afetados tanto pelas anomalias cardíacas entre outras do amplo espectro da SD22q11, incluindo imunodeficiência (Ziolkowska et al 2008).

O índice de mortalidade infantil é elevado apenas em casos raros, como nas formas graves da SD22q11 em associação com doença arterial coronariana e complicações afins. Em indivíduos adultos com cardiopatias congênitas a SD22q11 é sub-reconhecida, pois é difícil determinar se a deleção está presente apenas por meio de avaliação dos achados fenotípicos. Entretanto, esses indivíduos são considerados em risco elevado de morte prematura, quando comparado com os seus irmãos não afetados, e as causas da morte prematura são, provavelmente, multifatoriais e devido aos problemas cardíacos e os demais associados a deleção (Beauchesne et al 2005 e Bassett et al 2009).

A necessidade de investigação citogenética para todos indivíduos com malformações conotruncal tem sido um tema de debate. A investigação para microdeleção 22q11 deve ser considerada em indivíduos adultos com alto risco de lesões cardíacas, uma vez que existem importantes implicações no aconselhamento reprodutivo e vigilância para outras manifestações associadas (Beauchesne et al 2005 e McDonald-McGinn e Zackai 2008). Kiburz et al (2008) sugerem testes genéticos para todos os recém-nascidos com malformação conotruncal sugestiva da presença de uma microdeleção ou outro defeito cardíaco associado a dismorfismo facial. A detecção precoce da deleção 22q11 poderia permitir melhor estratificação de risco e estratégias de gestão adequadas, para evitar complicações potenciais, e facilitar a orientação das famílias.

2.3.1.4 Atraso no desenvolvimento e distúrbios de comportamento

Além de apresentarem malformações físicas, muitos indivíduos com SD22q11 apresentam atraso mental leve a moderado, dificuldade de aprendizagem,

problemas de linguagem, cognição e habilidades motoras; atraso no desenvolvimento, distúrbio de comportamento, problemas psiquiátricos como depressão e imaturidade social (Shprintzen et al 1978, 1981, Flint et al 1995, Swillen et al 1999, Cuneo 2001, D'Antonio et al 2001 McDermid e Morrow 2002, Óskarsdóttir et al 2005, Kiburz et al 2008, Shprintzen e Golding-Kushner 2008, Bales, Zaleski e McPherson 2010, Brandão 2010, Campbell et al 2010, Draaken et al 2010 e Levenson 2011).

Atraso no crescimento e desenvolvimento são características comuns em indivíduos com anomalias cromossômicas, entretanto muitas síndromes não apresentam restrição no crescimento ou apresentam apenas no pós-natal. Atraso no crescimento pré-natal não tem sido muito descrito na maioria dos indivíduos com SD22q11, e atraso no crescimento pós-natal é observado em 36% dos casos. Atraso no crescimento e mental parece ser mais comum em indivíduos com deleção 22q11 distal (Ben-Shachar et al 2008).

O perfil psicopatológico parece estar relacionado com defeitos cognitivos específicos, prejudicando particularmente a capacidade visual e perceptiva e uma diminuição da compreensão do abstrato e da linguagem simbólica. Os déficits psicossociais podem tornar-se mais evidentes na vida adulta, quando espera-se que os indivíduos tenham as funções mais independentes na vida diária. Deficiências cognitivas são vistas em 40% a 46 % dos indivíduos com a deleção 22q11 e maioria são leves a moderadas (Kiburz et al 2008 e Looman, Thurmes e O'Conner-Von 2010).

Baylis, Munson e Moller (2008) demonstraram que crianças com síndrome SD22q11 têm habilidades de articulação mais deficientes em comparação com crianças com fissura labiopalatina ou DVF. Essas dificuldades de articulação não

parecem estar associadas com habilidades de percepção da fala ou da capacidade de aprender novas representações fonológicas. A elevada proporção de distúrbios de fala em crianças com deleção 22q11 está relacionada, em parte, a frequência de disfunção de palato sob a forma de insuficiência velofaríngea ou fissura palatina (Cuneo 2001).

Atraso de fala, devido a anomalias de palato, que contribuem para a fala hipernasal e erros de articulação, bem como atraso motor devido hipotonia e diminuição da função cognitiva, tem sido observado em 80% dos indivíduos (Benítez 2009, Bales, Zalesk e McPherson 2010 e Levenson 2011). Anormalidades na fala incluem atraso no início do desenvolvimento da linguagem, em crianças em idade pré-escolar; hipernasalidade, erros fonoaudiológicos e motores; e uso do discurso compensatório em crianças de todas as idades (Cuneo 2001).

Atraso mental é geralmente leve, com 1% dos indivíduos com atraso mental severo e 7% com atraso mental moderado (Bales, Zalesk e McPherson 2010). A incidência do atraso mental é mais elevada nas deleções 22q11 de origem familiar do que nas deleções *de novo* (Cuneo 2001).

Dificuldade de aprendizagem é frequentemente observada, bem como o déficit de atenção e hiperatividade em 30% dos indivíduos (Bales, Zalesk e McPherson 2010).

Adultos com SD22q11 são muito mais susceptíveis a desenvolver diversos distúrbios psiquiátricos e comportamentais, incluindo esquizofrenia em 30% dos casos, autismo e transtorno bipolar depressão, ansiedade do que a população geral (Shprintzen et al 1978, 1981, Swillen et al 1999, Shprintzen 2000, Cuneo 2001, Murphy e Owen 2001, D'Antonio et al 2001, Reish et al 2003, Ruiter et al 2003, Óskarsdóttir et al 2005, Bashir et al 2008, Paylor e Lyndsay 2006, Antshel et al 2007,

Kates et al 2007, Bassett e Chow 2008, Kyburz et al 2008, Shprintzen e Golding-Kushner 2008, Bales, Zalesk e McPherson 2010, Bassett et al 2010, Brandão 2010, Campbell et al 2010, National Library of Medicine 2011 e Verhoeven et al 2011). Estima-se que 20% a 50% das crianças com SD22q11 têm um distúrbio do espectro do autismo (Campbell et al 2010).

2.3.1.5 Anomalias imunológicas

Anomalias endócrinas e imunológicas são relatadas em 40% a 93 % dos indivíduos com a microdeleção 22q11. A gravidade da imunodeficiência varia entre os indivíduos afetados, Infecções recorrentes, especialmente envolvendo o trato respiratório são comuns na infância, talvez, causadas em parte por insuficiência velofaríngea e outras anormalidades de palato. Crianças com mais idade, têm menos infecções e número e função de células aumentadas, mas imunodeficiência grave afeta 1% ou menos. No entanto, a maioria das crianças afetadas tem melhora e não há necessidade de tratamento (Cuneo 2001, Hay 2007 e Draaken et al 2010).

Também são relatados hipotireoidismo, hipertireoidismo, trombocitopenia imune (que é visto até 200 vezes mais do que na população geral), anemia hemolítica auto-imune, monoartrite, artrite reumatóide juvenil poliarticular (20 vezes a mais do que na população geral), vitiligo, neutropenia, anemia aplástica e doença celíaca (Hay 2007 e Marom et al 2011).

Hipoparatiroidismo hipocalcêmico, causado por glândulas de paratireóides ausentes ou pequenas, é um defeito de desenvolvimento da terceira ou quarta bolsa faríngea, é mais significativo no período neonatal e pode resultar em convulsões. É encontrado em 40% a 70% dos indivíduos com a deleção 22q11. Normalmente, os

níveis de cálcio normalizam com tempo, embora existam relatos isolados de recorrência tardia de doença ou alterações hormonais (DiGeorge 1967, Hay 2007, Bales, Zaleski e McPherson 2010 e Zemble et al 2010).

Outra anormalidade endócrina associada com a microdeleção 22q11 é a baixa estatura, relatada em 10% a 40 % dos indivíduos, que é, por vezes, devido à deficiência de hormônio de crescimento, hipoparatiroidismo congênito ou por outras causas como dificuldade de alimentação e restrição do crescimento intrauterino (Bales, Zaleski e McPherson 2010 e Zemble et al 2010).

Imunodeficiência afeta até 77% das crianças com SD22q11. Embora a maioria tem defeitos tímicos ou na produção, maturação e função de células T, defeitos de anticorpos são também observados (Hay 2007).

Evidências clínicas sugerem que indivíduos com microdeleção 22q11 têm um aumento da prevalência de doenças atópicas e autoimunes (McLean-Tooke et al 2008 e Zemble et al 2010). A frequência da doença autoimune clínica é estimada em aproximadamente 10% a 20% dos indivíduos com SD22q11 (Bales, Zaleski e McPherson 2010).

2.3.1.6 Anomalias esqueléticas

Poucos relatos mencionam anomalias esqueléticas em indivíduos com SD22q11. Anomalias de membros são raras, mas anomalias esqueléticas menores envolvendo membros superiores e inferiores (Figura 9), principalmente anomalias das mãos, como polidactilia e anomalias de polegar, e das costelas e/ou vértebras também já foram relatados (Cormier-Daire et al 1995, Kokitsu-Nakata, Guion-Almeida e Richieri-Costa 2008, Digilio et al 2009 e Faivre et al 2009).

Fonte: Kokitsu-Nakata NM, Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A. 22q11 deletion syndrome and limb anomalies: report on two brazilian patients *Cleft Palate Craniofac J.* 2008; 45(5):561-6.

Figura 9 - Exemplos de anomalias esqueléticas em indivíduos com SD22q11.

Kokitsu-Nakata (2006) descreveu um indivíduo com deleção 22q11 apresentando dismorfismo facial, fissura de palato submucosa, deficiência auditiva, cardiopatia congênita, atraso de aquisição de fala, dificuldades de fala, anomalias de membros e deficiência auditiva condutiva. Kokitsu-Nakata, Guion-Almeida e Richieri-Costa (2008), descreveram dois indivíduos com a microdeleção 22q11, que apresentaram insuficiência velofaríngea, anomalias cardíacas congênitas, atraso no desenvolvimento e anomalias de membros, expandindo o espectro clínico da SD22q11, salientando a necessidade de um diagnóstico diferencial de condições que ocorram com anomalias diversas, tais como ectropolidactilia, coligação tarsal e/ou sinostose radioulnar associada à insuficiência velofaríngea e/ou defeitos cardíacos.

Várias anomalias fenotípicas compatíveis com o espectro oculoauriculovertebral (OAV), condição também conhecida como síndrome de Goldenhar, em indivíduos com deleção 22q11 foram descritos na literatura, incluindo anomalias da orelha (microtia unilateral), perda auditiva congênita, microsomia hemifacial, malformações das vértebras cervicais, malformações cardíacas conotruncal, malformações renais, dificuldades alimentar e respiratória (Digilio et al 2009 e Lafay-Cousin et al 2009).

Deve-se considerar que a deleção 22q11 e o espectro OAV singularmente ocorrem com muita frequência (1/4000 e 1/5600, respectivamente), e a possibilidade

de que ambas as condições ocorram juntamente no mesmo indivíduo pode ser estimada em 1:22.400.000. No entanto, a expressão clínica de microsomia hemifacial e microtia relacionada ao espectro OAV deveria ser incluída dentro da ampla expressão fenotípica da deleção 22q11 e indivíduos com esses sinais associados a características clínicas tipicamente relacionadas à deleção 22q11 deveriam ser considerados para testes como FISH, MLPA ou CGHa (Digilio et al 2009).

2.3.1.7 Anomalias oftalmológicas

Anomalias oculares, moderadas a severas, como erros refrativos (hipermetropia, astigmatismo), estrabismo, ambliopia, tortuosidade vascular da retina, embriotoxo posterior, discos ópticos pequenos, nódulos de íris, coloboma de íris e coriorretiniana, nervos da córnea proeminentes, catarata, anormalidades oculares estruturais, fendas palpebrais estreitas, são frequentemente observadas em indivíduos com SD22q11, e a maioria delas pode ser explicada por um defeito na migração das células da crista neural, mas relatos na literatura de envolvimento ocular grave são raros (Casteels et al 2008).

Binenbaum et al (2008) descreveram sete indivíduos com SD22q11 e esclerocórnea, sugerindo que um loco gênico na região 22q11 pode influenciar na embriogênese do segmento anterior do olho, que inclui a córnea, câmara anterior, íris, cristalino, corpo ciliar e estruturas relacionadas. A base do desenvolvimento embriológico para a esclera é a ausência de migração normal de células da crista neural entre a sétima e décima semanas de gestação. A falta de migração resulta na falha da formação do primórdio do limbo, resultando na ausência do limbo, e na falta de diferenciação e desenvolvimento entre a arquitetura da córnea e esclera.

Segundo Casteels et al (2008), exames oftalmológicos em torno 2 anos de idade podem favorecer o reconhecimento dos achados oculares típicos nesta população, levar a um diagnóstico da SD22q11, um aconselhamento genético correto, orientar o tratamento do estrabismo e ambliopia e um acompanhamento individual pode ser planejado. Correção de erros refrativos, pode melhorar as habilidades de leitura dessas crianças .

2.3.1.8 Anomalias congênicas menores

A classificação das anomalias congênicas maiores e menores é feita segundo a consequência médica que causam: as menores não exigem cuidados enquanto que as maiores, via de regra, exigem intervenção clínica e/ou cirúrgica e podem deixar sequelas. Anomalias congênicas menores são alterações morfológicas que podem ser frequentes na população geral e não acarretar maiores problemas ao indivíduo e, muitas delas, são, na verdade, variantes normais do fenótipo. Estas anomalias menores podem servir como pistas diagnósticas para malformações graves ou mesmo síndromes malformativas. Apesar da inocuidade destas malformações, há casos em que a malformação menor constitui a única pista de um distúrbio severo (Marden, Smith e McDonald 1964 e São Paulo 2008).

Entre as malformações menores observadas na SD22q11 as mais frequentemente descritas são as anomalias oculares como olhos pequenos, fendas palpebrais estreitas e as auriculares como orelhas pequenas com hélices enrolados/dobrados, e outras tais como ponte nasal alta, hipoplasia de asa nasal, base nasal larga, filtro longo, micrognatia e dígitos longos (Veerapandiyan et al 2011) (Figura 10).

Fonte: Butts SC. The facial phenotype of the velo-cardio-facial syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; 73(3):343-50.

Figura 10 - Aspectos clínicos de indivíduos com síndrome da deleção 22q11.

2.3.1.9 Dificuldades de alimentação

Dificuldades de alimentação são comuns, pelo menos 30% dos casos de SD22q11 apresentam graves problemas devido a muitos fatores como disfunção palatina, anomalias cardíacas, alterações na motilidade gastrointestinal, hipotonia, entre outros (Bales, Zaleski e McPherson 2010 e Zemble et al 2010).

2.4 GENES DA REGIÃO 22q11

O cromossomo 22 é o segundo menor cromossomo humano, com aproximadamente 50 Mb, representando 1,5% a 2 % do total de DNA nas células e contém entre 500 e 800 genes que desempenham uma variedade de diferentes funções no organismo. Na região 22q11 tipicamente deletada de 3 Mb há aproximadamente 30 e 40 genes, entre os quais se incluem o *UFD1L* (*Ubiquitin Fusion Degradation 1-Like*) (OMIM*601754 Johns Hopkins University 2009g) (Igaki et al 2001), o *TBX1* (*T-box transcription factor TBX1, T-box 1*) (OMIM*602454 Johns Hopkins University 2009h) e o *TUPLE1/HIRA* (*TUP-Like Enhancer of split gene-1/ HIR histone cell cycle regulation defective*) (OMIM*600237 Johns Hopkins University 2009i), expressos nas células derivadas da crista neural, bem como o *CRKL* (*V-CRK Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog (Avian)-Like*) (OMIM*602007 Johns Hopkins

University 2009j)), possíveis responsáveis pelos achados clínicos observados na SD22q11 (D'Antoni et al 2004, Baldini 2005, Aggarwal e Morrow 2008, Rosa et al 2009, Madan et al 2010, Momma 2010 e National Library of Medicine 2011) (Figura 11).

LCRs22=repetições de pequeno número de cópias no cromossomo 22; MLPA=amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação.

Fonte: Adaptado: The National Center for Biotechnology Information. Homo sapiens (human) build 37.3 (current). In: The National Center for Biotechnology Information. NCBI map viewer [homepage in the internet]. Bethesda: The National Center for Biotechnology Information. [update 2010; cited 2010 ago 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=22>

Nota: Sondas para genes dessa região do kit MLPA P250-B1 DiGeorge utilizadas nesse estudo, as LCRs22 A-G e as regiões das Síndromes do olho do gato e DiGeorge. Também é mostrada a região 22q13 (genes ARSA e SHANK3), coberta pelo mesmo kit.

Figura 11 - Cromossomo 22, em destaque a banda 22q11.

A grande complexidade e heterogeneidade genéticas têm dificultado a determinação definitiva do(s) gene(s) crítico(s) para a SD22q11 e ainda não leva a resultados conclusivos (Swillen et al 2000, D'Antoni et al 2004, Sandrin-Garcia et al 2007 e Rosa et al 2009). Diferentes mutações de ponto, translocações balanceadas e pequenas regiões de deleção sobrepostas na região 22q11 têm sido comparadas no sentido de identificar genes candidatos para o fenótipo da SD22q11. Entretanto, nenhuma correlação genótipo-fenótipo evidente tem sido encontrada e alterações idênticas, mesmo entre membros da mesma família, apresentam alta diversidade fenotípica e expressividade variável ou penetrância incompleta (McDonald-McGinn et al 2001, D'Antonio et al 2004, Fernández et al 2005b e Stachon et al 2007).

A associação do gene *TBX1* com a síndrome SD22q11 tem sido objeto de extensa investigação. Alterações no gene *TBX1*, devido a uma mutação ou deleção de parte do cromossomo 22, têm sido consideradas críticas para os principais sinais clínicos da síndrome (Yagi et al 2003, Beauchesne et al 2005, Zweier et al 2007, Choi e Klingensmith 2009, Rosa et al 2009, Draaken et al 2010, Lundin et al 2010, Philip e Basset 2011 e Guo et al 2011b). O gene *TBX1*, membro da família de genes T-box, desempenha um papel importante na formação dos tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário, pois está envolvido no desenvolvimento normal dos músculos, das grandes artérias que levam sangue do coração, das estruturas do ouvido, e das glândulas como a tiróide e da paratireóide e ossos da face e pescoço, incluindo o epitélio e mesênquima do palato, maxilar e proeminência mandibular, bem como o endoderma das bolsas faríngeas (Aggarwal e Morrow 2008 e National Library of Medicine 2011).

O gene *TBX1* ativa os *fatores de crescimento fibroblástico 8 (Fgf8)* e *10 (Fgf10)*, que são necessários para promover o crescimento de células e também têm

um papel na migração da crista neural (Aggarwal e Morrow 2008, Fomin 2009 Madan et al 2010 e Momma 2010).

Deleção específica no *TBX1* da endoderme da faringe leva anomalias do quarto arco faríngeo, fissura de palato e no desenvolvimento da musculatura facial anormal. Na ausência do gene *TBX1*, o desenvolvimento normal do palato não ocorre, pois ele é fator de transcrição crítico que orienta o alongamento e elevação do palato e a expressão do *FGfg8* no palato é dependente do *TBX1* (Goudy et al 2010).

O *TBX1* é o único gene no qual as mutações pontuais têm sido encontradas em indivíduos sem a deleção que manifestam o fenótipo clínico da SD22q11, no entanto, esses casos são raros (Tan et al 2010). As mutações identificadas incluem alterações em um único par de bases e microdeleções do gene. Essas mutações, causam ganho de função, o que poderia ser considerado, funcionalmente, equivalente a uma duplicação do gene. A expressão alterada do gene *TBX1* juntamente com outros fatores genéticos, epigenéticos, ou não genéticos adicionais, necessários para expressividade completa, poderiam explicar porque existem fenótipos altamente variáveis e semelhantes entre as síndromes de deleção e duplicação 22q11 (Hoogendoorn et al 2004, Baldini 2005, Portnoi 2009, Rosa et al 2009, Heike et al 2010 e National Library of Medicine 2011).

Essas mutações reduzem a quantidade ou alteram a função da proteína T-box que é produzida nas células e, provavelmente afetam a capacidade da proteína T-box 1 de se ligar ao DNA e regular a atividade de outros genes. Mais especificamente, a redução na quantidade ou alterações na função normal da proteína T-box 1 estão associadas com defeitos do coração, fissura de palato, características faciais distintivas, perda auditiva, distúrbios de comportamento e

baixos níveis de cálcio em indivíduos com SD22q11 (National Library of Medicine 2011). Mutações em ratos homozigotos para *TBX1* mostraram anomalias abrangendo quase todas as características comuns observadas na SD22q11, incluindo fissura de palato (Heike et al 2010).

Outros genes candidatos são aqueles que não estão na banda 22q11, mas podem estar no caminho genético do *TBX1* ou outros genes necessários para o desenvolvimento da face, do timo, glândulas paratireóide e do coração e que podem contribuir para o fenótipo da síndrome (Hoogendoorn et al 2004, Baldini 2005, Aggarwal e Morrow 2008, Madan et al 2010 e Momma 2010). Análises de outros genes dentro e fora da região 22q11 não conseguiram detectar mutações em indivíduos sem deleção. Entretanto, a associação destes genes com a causa da síndrome não está claramente compreendida (Tan et al 2010).

Mutações no gene *UFD1L* (*ubiquitin fusion degradation 1-like*) também têm sido associadas com a síndrome de SD22q11 e com defeitos cardíacos e craniofaciais. Esse gene codifica uma proteína que forma um complexo com outras duas proteínas, necessário para a degradação de proteínas ubiquitinadas e controle da mitose nesse gene (Philip e Basset 2011 e National Library of Medicine 2011).

Outro gene fortemente associado ao fenótipo cognitivo/psiquiátrico da SD22q11 é o *COMT* (*Catecol-O-Metiltransferase*) (OMIM+116790 Johns Hopkins University 2009k), responsável pela produção de duas versões da enzima catecol-O-metiltransferase, uma delas expressa em células nervosas, auxiliando no controle dos níveis de neurotransmissores, como a dopamina e a noradrenalina, importante na função do córtex pré-frontal, região que organiza e coordena informações de outras partes do cérebro, envolvida com o planejamento, personalidade, inibição de comportamentos, o pensamento abstrato, emoção e memória de trabalho recente; e

outra expressa em outros tecidos incluindo o fígado, os rins e o sangue, controlando os níveis de certos hormônios (Kates et al 2006, Benites 2009, Rosa et al 2009, Shashi et al 2010, Philip e Basset 2011, National Library of Medicine 2011 e Verhoeven et al 2011).

Situações de polimorfismo ou de deleção, onde indivíduo tem apenas uma cópia do gene *COMT* em cada célula, em vez das duas cópias habituais, pode levar à desregulação dos níveis de catecol-O-metiltransferase no cérebro e resultar em incapacidade de degradar dopaminas. Níveis elevados dessas substâncias têm sido implicados em uma variedade de transtornos comportamentais, como o espectro obsessivo compulsivo, a psicose e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), frequentes em indivíduos com a SD22q11 (Rosa et al 2009, Booij, Van Amelsvoort e Boot 2010, Philip e Basset 2011 e National Library of Medicine 2011).

Há fortes indícios da susceptibilidade do gene *PRODH* (*Prolina Desidrogenase*) (OMIM*606810 Johns Hopkins University 2009l) para a esquizofrenia em indivíduos com SD22q11 (Hoogendoorn et al 2004, Benites 2009 e Philip e Basset 2011).

Esse gene fornece instruções para a produção da enzima prolina oxidase, que funciona em estruturas de produção de energia nas mitocôndrias, encontrada principalmente em células do cérebro, fígado e rins. A redução na função da prolina oxidase resulta em um acúmulo de prolina no corpo, e em casos graves de hiperprolinemia pode causar convulsões, deficiência intelectual, ou outros problemas neurológicos ou psiquiátricos (National Library of Medicine 2011).

O gene *GNB1L* (*Guanine Nucleotide-Binding Protein (G Protein), Beta Polypeptide 1-Like (Beta-1-Like)*) (OMIM*610778 Johns Hopkins University 2009m) produz uma proteína altamente expressa no coração. Está deletado na SD22q11,

trissômico na síndrome der 22 e tetrassômico na CES. Portanto, este gene pode contribuir para a etiologia dessas condições (Hoogendoorn et al 2004, Lee et al 2009 e National Library of Medicine 2011).

O gene *HIRA/TUPLE 1* (*HIR histone cell cycle regulation defective*) (OMIM*600237 Johns Hopkins University 2009i) também é considerado um gene candidato, localizado no final proximal da região tipicamente deletada da SD22q11 e amplamente utilizado para diagnóstico citogenético por FISH, permitindo a detecção de deleções em mais de 90% dos indivíduos (D'Antoni et al 2004). Deficiência no produto desse gene leva a acúmulo de proteínas e afeta o desenvolvimento das células da crista neural craniana e do coração, bem como a apoptose de timócitos imaturos. Portanto, a perda do gene *HIRA/TUPLE 1* causa interrupção do arco aórtico, fissura de palato, displasia do timo e outras anomalias craniofaciais (Lee et al 2009, Tao et al 2010 e National Library of Medicine 2011).

Outros genes da região 22q11 são o *GP1BB* (*glycoprotein Ib, beta polypeptide precursor*) (OMIM138720 Johns Hopkins University 2009n), que contribui para a trombocitopenia crônica (Fomin 2009); *CDC45L* (*Cell Division Cycle 45, S. Cerevisiae, Homolog-Like, CDC45-like*) (OMIM*603465 Johns Hopkins University 2009o), que está envolvido na replicação do DNA na fase G1 e pode estar envolvido no mecanismo molecular das SD22q11 (Igaki et al 2001); o *CLTCL1* (*clathrin, heavy polypeptide-like1 isoform 1*) (OMIM*601273 Johns Hopkins University 2009p) (Long et al 1996); *CLDN5* (*Claudin 5*) (OMIM*602101 Johns Hopkins University 2009q); *TXNRD2* (*thioredoxin reductase 2*) (OMIM*606468 Johns Hopkins University 2009r); *ZNF74* (*Zinc Finger Protein 74*) (OMIM*194548 Johns Hopkins University 2009s); *KLHL22* (*kelch-like*); *MED15* (*Mediator Complex Subunit 15; PCQAP*) (OMIM*607372 Johns Hopkins University 2009t); *DGCR8* (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*)

(OMIM*609030 Johns Hopkins University 2009u) um dos genes essenciais para a produção de miRNAs (micro RNAs). Tem sido relatado que alteração causada pela deleção 22q11 resulta em processamento anormal de miRNAs cerebrais específicos e déficit de memória (Fénelon et al 2011). Há também relatos de envolvimento nas anomalias cardíacas e palatinas (Shiohama et al 2003)

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Síndromes de microdeleção, como a SD22q11, não são observáveis por meio de técnicas convencionais de citogenética (Jorde et al 1999, Vogel e Motulski 2000, Belangero et al 2009 e Kamiya 2009). Entretanto, aproximadamente 10% a 20% dos indivíduos com sinais clínicos da SD22q11 não apresentam microdeleção 22q11 e podem apresentar outras aberrações cromossômicas ou microdeleções em outras regiões cromossômicas (Belangero et al 2009 e Koshiyama et al 2009), o que justifica a importância da análise inicial por meio do estudo citogenético com bandamento G.

Como a maioria dos indivíduos apresenta microdeleção na região 22q11 de 1,5 Mb a 3 Mb, faz-se necessário à utilização de outras técnicas de citogenética molecular (Belangero et al 2009). Os métodos utilizados atualmente para investigação de alterações na região 22q11 são hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) e hibridização comparativa de genomas de array (CGHa). A avaliação molecular de polimorfismos de microssatélite e a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), também são possíveis métodos para o diagnóstico da síndrome (Mandal et al 2009, Rosa et al 2009 e Schwinger et al 2010).

Muitas técnicas têm sido usadas para detectar alterações da estrutura e do número de cópias de sequências de DNA. No entanto, cada método tem suas vantagens e limitações em circunstâncias diferentes, mas tecnologias baseadas em microarray e MLPA representam os métodos mais confiáveis e eficazes para a descoberta e validação de alterações no número de cópias (Shen e Wu 2009). Embora FISH e CGHa sejam excelentes ferramentas para análise do genoma, são técnica de alto custo, trabalhosas, demoradas e difíceis de implementar (Eijk-Van e Schouten 2011).

2.5.1 Cariótipo com bandamento G

O cariótipo com bandamento G é o método padrão de investigação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, que são frequentemente associadas a síndromes de múltiplas anomalias que incluem características dismórficas, dificuldade de aprendizagem e atraso no desenvolvimento e crescimento (Bar-Shira et al 2006 e Dave e Sanger 2007).

Na técnica de bandamento G metafásico são observadas aproximadamente 300 a 450 bandas, enquanto no bandamento de alta resolução esse número é aumentado para 800 até 2000 bandas, embora 550 a 850 bandas sejam suficientes para visualização de anomalias cromossômicas menores (Francke 1994), sendo útil para a identificação mais precisa de pontos de quebra e de pequenas alterações não visualizadas pela citogenética convencional, tais como translocações equilibradas ou não-equilibradas, microdeleções e microduplicações de 3 Mb até 5 Mb (Jorde et al 1999, Vogel e Motulski 2000, Kamiya 2009, Rosa et al 2009 e Rodrigues 2010). Estudos citogenéticos com o uso do cariótipo de alta resolução revelam que menos

de 15% dos indivíduos apresentam deleções visíveis na região 22q11 (Driscoll, Budarf e Emanuel 1992 e Belangero et al 2009).

A identificação dos cromossomos se faz pela similaridade das bandas observadas visualmente em comparação com um padrão estabelecido pelo ISCN (Mitelman 2009), como também pela homologia entre as sequências de DNA (Kamiya 2009). Um mínimo de 20 células deve ser analisado para visualizar todos os segmentos cromossômicos e identificar mosaicismos (Dave e Sanger 2007).

Para indivíduos suspeitos de apresentarem anomalia cromossômica, a análise citogenética no nível de resolução de 450 bandas é o procedimento citogenético mais indicado. Anomalias cromossômicas que afetam pequenos segmentos de 5Mb ou menores, e mesmo em algumas alterações maiores, podem não ser detectadas nesse nível de resolução (Bar-Shira et al 2006, Kamiya 2009 e Rodrigues 2010).

Sinais clínicos da SD22q11 têm sido observados em outras condições, envolvendo alterações em outros cromossomos, como em casos de deleções do braço curto do cromossomo 10 e do braço longo do cromossomo 4 (Descartes et al 1996, Ravnan et al 1996, Caliebe, Sirotkin et al 1997, Tsai, Van Dyke e Feldman 1999, Lichtner et al 2000, Villanueva et al 2002, Bartsch et al 2003, Brunet et al 2006, Yatsenko et al 2004, Fernández et al 2008, Rope et al 2009 e Cuturilo et al 2011), na síndrome alcoólica fetal e da embriopatia pelo ácido retinóico (Rosa et al 2009). Uma pequena porcentagem de indivíduos com sinais clínicos da SD22q11 (<1%) tem rearranjos cromossômicos, como translocações envolvendo a banda q11 do cromossomo 22 (Faed et al 1987, Jaquez et al 1997, Dundar et al 2010, Koshiyama et al 2009 e Rosa et al 2009) (Figura 12).

Deleções no cromossomo 8p estão associadas a cardiopatias congênitas (Devriendt et al 1999); deleções teloméricas do gene EHMT1 localizado no cromossomo 9q estão associadas com anomalias cardíacas, crises convulsivas e atraso mental (OMIM#610253) (Johns Hopkins University 2009v, Harada et al 2004, Iwakoshi et al 2004, Stewart et al 2004 e Neas et al 2005). Deleções da região telomérica 17p13 resultando em um fenótipo de DiGeorge-like têm sido descritas (Greenberg et al 1988) e há relatos de deleções 17p teloméricas detectadas durante a triagem de indivíduos com suspeita de síndrome de DiGeorge pelos kits MLPA. Há também semelhanças entre as SD22q11 e SD22q13 como hipotonia, epicanto, fendas palpebrais estreitas, base nasal larga, atraso na fala, anomalias renais, e atraso no desenvolvimento (MRC-Holland 2011). Deleção nos cromossomos 6p, 19 e duplicação nos cromossomos 9p e 5q, em indivíduos com fenótipo da SD22q11, também foram descritos (Busse et al 2011).

Fonte: Fernández L, Lapunzina P, Pajares IL, Palomares M, Martínez I, Fernández B, et al. Unrelated chromosomal anomalies found in patients with suspected 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet.* 2008; 146(A):1134-41.

Nota: Deleção 4q (a); deleção 8p (b); duplicação 8p (c); duplicação 14q (d); duplicação 15q (e); translocação (1;3) (f); translocação (8;14) (g); translocação (16;18) (h); inversão 5 (i); cromossomo marcador (j).

Figura 12 - Indivíduos com diagnóstico clínico da SD22q11, mas com alterações em outros cromossomos.

2.5.2 Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)

A técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) é um método laboratorial muito utilizado como um teste complementar a análise de bandamento convencional, para identificação de alterações cromossômicas pequenas ou complexas, que integra a utilização da citogenética clássica com a genética molecular, por meio do uso de sondas de DNA marcadas com material fluorescente que identificam regiões específicas do genoma, com uma resolução de 5 a 500 kb (Wang 2000, Vianna-Morgante 2004, Fernández et al 2005a, Dave e Sanger 2007, Oh, Workman e Wong 2007, Sivertsen et al 2007, Rosa et al 2009, Yang et al 2009 e Rodrigues 2010).

É mais adequada para a confirmação de síndromes de microdeleção e microduplicação conhecidas. Portanto, as sondas candidatas, especialmente para síndromes de microdeleção, devem ser selecionadas a priori para a investigação FISH, com base no fenótipo do indivíduo (Bar-Shira et al 2006 e Kriek et al 2007).

Análise de FISH para o cromossomo 22q é muitas vezes baseada em sondas comerciais disponíveis TUPLE1 (que se liga a todo o gene *TUPLE 1* e parte do DNA localizado junto às suas extremidades) e a N25 (que se hibridiza em D22S75, localizada dentro da região comumente deletada na SD22q11), com base em suposições de deleção em regiões comuns de pontos de quebra, situadas na parte proximal da região normalmente deletada. O índice de detecção da microdeleção 22q11 parece ser semelhante para ambas. Estas sondas podem detectar a maioria dos casos de SD22q11, aberrações mais distais às sondas ou microdeleções menores na região tipicamente deletada não são detectadas. Utiliza-se também uma sonda de controle, a *ARSA*, que se hibridiza no loco 22q13.3, onde

está localizado o gene da enzima lisossomal arilsulfatase A. Contudo, FISH não prevê quaisquer informações sobre o tamanho ou a extensão de uma deleção (Fernández et al 2005a, Oh, Workman e Wong 2007, Sivertsen et al 2007, Rosa et al 2009, Yang et al 2009, Sorensen et al 2010).

Os reagentes das sondas hibridizadas fluorescem com intensidade moderada a brilhante, sendo que, em núcleos de células normais, geralmente aparecem como dois pares de sinais distintos, um vermelho (*N25 ou TUPLE 1*) e um verde (*ARSA*). Em uma metáfase normal, a sonda se apresenta tipicamente com pequenos sinais, um em cada cromátide de cada cópia do cromossomo 22 (Rosa et al 2009).

Mais de 90% dos indivíduos com a SD22q11 tem uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 22 detectável por FISH (Driscoll et al 1993, Fernández et al 2005a Oh, Workman e Wong 2007, Sivertsen et al 2007 e Rosa et al 2009). Contudo, um resultado negativo a partir dessas análises não exclui a presença de anormalidades na região 22q11, pois alguns indivíduos (<5%) podem apresentar deleções menores ou mutações de ponto dentro de genes específicos detectadas somente por outras técnicas moleculares (Yang et al 2009, Rosa et al 2009 e Sorensen et al 2010).

2.5.3 Hibridização comparativa de genomas de array (*comparative genomic hybridization array, CGHa*)

A técnica de hibridização comparativa de genomas de array (CGHa) é uma tecnologia de alta resolução inovadora, também chamada de cariótipo molecular, desenvolvida para detectar desequilíbrios genômicos (deleções e duplicações) em

todo o genoma em um único ensaio, sendo realizada em uma placa ou lâmina formada por vários pontos contendo cada um deles clones genômicos de interesse (Pinkel et al 1998, Antonarakis 2001 e Snijders et al 2001, Shaffer e Bejjani 2004, Price et al 2005, Bar-Shira et al 2006, Dave e Sanger 2007, Kriek et al 2007 e Rodrigues 2010).

É uma técnica que permite a investigação de alta resolução de todo o genoma, detectar variações no número de cópias de segmentos genômicos e precisar o tamanho do segmento cromossômico envolvido. O foco específico está na perda (microdeleções) ou no ganho (microduplicações) sutis de regiões que são conhecidas por estarem envolvidas em síndromes de microdeleção/microduplicação conhecidas e também regiões cromossômicas subteloméricas que têm sido descritas como aberrantes em muitos casos de atraso mental (Dave e Sanger 2007).

O nível de resolução das diferentes plataformas CGHa (adquiridas comercialmente) depende da distância (1-100 Mb) e do tamanho (25 mers - 200 Kb) das sondas de DNA utilizadas, sendo possível detectar alterações submicroscópicas (menores que 5 Mb) (Bar-Shira et al 2006, Balikova et al 2007, Shao et al 2008, Shinawi e Cheung 2008 e Rodrigues 2010). Diversas plataformas CGHa para diagnóstico clínico foram desenvolvidas e estão continuamente sendo atualizadas (Dave e Sanger 2007).

Aplicações bem sucedidas de arrays incluem também as que se concentram em regiões particulares do genoma incluindo todo ou partes do cromossomo 22, bem como do cromossomo 1 e X, e em regiões subteloméricas conhecidas por estarem associadas a doenças genéticas (Bar-Shira et al 2006).

Métodos com vários marcadores genéticos na região 22q11 são cada vez mais importantes para a detecção precisa de microdeleções genômicas. O uso recente de diagnóstico de microarrays permitiu o delineamento de síndromes adicionais neste loco (Yang et al 2009 e Tan et al 2010).

Devido a eficiência em detectar alterações submicroscópicas, rapidez em obter resultado e relativa simplicidade do método, CGHa tem se tornado uma ferramenta essencial no diagnóstico clínico de rotina e, em alguns laboratórios está, gradualmente, substituindo os métodos citogenéticos clássicos. Seu alto custo é um fator limitante para a utilização (Rodrigues 2010).

2.5.4 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) permite monitorar a reação de PCR enquanto os ciclos se sucedem e detectar o produto da amplificação à medida que ele está sendo formado. Com isso, não há necessidade de se observar o resultado em gel de agarose após o término da reação. O sistema é baseado na detecção e quantificação de um corante fluorescente, cujo sinal aumenta em proporção direta à quantidade de fragmento amplificado na reação de PCR, de tal forma que quanto maior o número de fragmentos amplificados, maior será a fluorescência emitida. A reação acontece em um equipamento diferente daquele utilizado na PCR convencional, além de realizar os ciclos de temperatura, também detecta e registra a fluorescência nas amostras. Por meio de fibras ópticas, um raio laser é enviado para cada amostra em intervalos regulares de tempo. A fluorescência emitida pelo corante volta pela mesma fibra para ser registrada no computador acoplado ao equipamento (Farah 2007).

A qPCR é uma técnica descrita como quantitativa porque consegue realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo, e suas características relevantes são rapidez, especificidade e quantificação. Tem sido aplicada recentemente para determinar número de cópias genômicas em muitas doenças humanas, como na SD22q11 e pode ser utilizada separadamente ou em conjunto com a amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) (Perne et al 2009, Yang et al 2009 e Tomita-Mitchell et al 2010).

2.5.5 Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA)

A amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA), é uma técnica semi-quantitativa de genética molecular inicialmente desenvolvida por Schouten et al (2002), introduzida como um método rápido, de excelente relação custo benefício, alta resolução e especificidade que se baseia na simultânea hibridização de várias sondas de sequência específicas de DNA que permite a detecção de alterações, do número de cópias de DNA, relacionadas a várias síndromes que apresentam deleções ou duplicações.

A reação MLPA resulta em uma mistura de fragmentos de amplificação variando entre 100 nt e 500 nt de comprimento, que podem ser separados e quantificados por eletroforese capilar. O equipamento necessário para MLPA é idêntico àquele para a realização de reações de sequenciamento padrão: um termociclador e um sistema de eletroforese capilar fluorescente. A comparação do padrão do pico obtido em uma amostra de DNA, com uma amostra de referência indica se as sequências mostram número de cópias aberrantes (Sorensen et al 2008, Eijk-Van e Schouten 2011 e Eijk-Van Os e Schouten 2011).

A técnica de MLPA é constituída por quatro fases: desnaturação, hibridação, ligação e amplificação. Nas duas primeiras, o DNA genômico é desnaturado, e então hibridizado a uma mistura de sondas (cada uma específica para a região a ser estudada) (Lincon-de-Carvalho 2009). O princípio do MLPA é que para cada loco, dois oligonucleotídeos de DNA (sondas), que são contíguos ao se anelarem ao DNA, devem hibridizar suas sequências complementares sobre o DNA alvo para a ligação ocorrer. Posteriormente, uma reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) é realizada na sonda ligada. Após a PCR, uma alíquota do produto da PCR é combinada com um marcador de tamanho interno e formamida deionizada. A amostra é então injetada em um capilar de um sequenciador automatizado, onde após 30 minutos de execução, os dados são recolhidos para posterior análise (Figura 13). Uma vez que a quantidade de sondas ligadas é dependente do número de primer de locais específicos de ligação, este método é adequado para a detecção de deleções ou duplicações cromossômicas (Sorensen et al 2008, Van Eijk et al 2010 e Eijk-Van Os e Schouten 2011).

Fonte: Adaptado de: Lincoln-de-Carvalho, CR. Técnica de MLPA: uma alternativa para a investigação de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou deficiência mental idiopática [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2009.

MRC-Holland. Salsa MLPA kit P250-B1 DiGeorge. In: MRC-Holland. MLPA website [homepage in the internet]. Holland: MRC; 2011. [update 2011; cited 2011 ago 8]. Available from: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIaupKyMjaDF\vt9bmutexlh e/Lgqfk8Hkjussj&ProductOID=0DLzOd5tLZ0>

Nota: Na porção superior, uma única sonda composta por dois oligonucleotídeos: em azul, as sequências de hibridação; em lilás, o par de primers (sequências X e Y) e em verde, a sequência "coringa", que vai definir o tamanho do fragmento amplificado. Estas sondas hibridam ao DNA alvo (em vermelho) e, posteriormente, são unidas por uma ligase termoestável (círculo amarelo). Os fragmentos unidos são amplificados em uma PCR e submetidos a uma eletroforese capilar, que separa os diversos fragmentos gerados.

Figura 13 - Representação esquemática das fases de reação da MLPA.

Os resultados são obtidos por picos de fluorescência analisados a partir de softwares de análise de genótipos. A interpretação dos picos se dá pela comparação dos tamanhos dos picos dos indivíduos com os controles. Se os picos entre o indivíduo e o controle forem do mesmo tamanho, significa normal, ou seja, o indivíduo não tem a deleção. Se o pico do indivíduo tiver uma redução de aproximadamente metade do tamanho do pico controle, então este indivíduo tem uma deleção em heterozigose dessa sequência alvo. Mas se o pico do indivíduo for maior, então ele apresenta uma duplicação em um dos cromossomos dessa sonda (Oliveira 2008 e Mandal et al 2009) (Figura 14 e15).

Fonte: MRC-Holland. Salsa MLPA kit P250-B1 DiGeorge. In: MRC-Holland. MLPA website [homepage in the internet]. Holland: MRC; 2011. [update 2011; cited 2011 ago 8]. Available from: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDFE\t9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjussl&ProductOID=0DLzOd5tLZ0l>

Figura 14 - Padrão de eletroforese capilar de uma amostra de aproximadamente 50 ng de DNA humano controle do sexo masculino analisado com kit SALSA MLPA DiGeorge P250-B1 (lote 0210).

Nota: Kit SALSA MLPA P250-B1 DiGeorge probemix (MRC-Holland®, Amsterdam, Holanda) mostrando resultados normais (A e C) e uma redução dos picos relativa ao produto de amplificação da sequência de sondas MLPA na região 22q11, indicando uma deleção (B e D). Análise no software Genemarker® (SoftGenetics®, State College, Pensilvânia, EUA) (C e D). Os pontos azuis e verdes são sondas do kit MLPA localizadas nas regiões proximais e distais à região crítica DiGeorge e em outros cromossomos, os vermelhos indicam as sondas deletadas (D).

Figura 15 - Eletroferogramas dos picos do produto de amplificação da sequência de sondas MLPA da região 22q11.

Deleções de sequências de sondas são expressas por uma redução de 35-50% da área de pico relativa ao produto de amplificação dessas sondas. No entanto, uma mutação ou polimorfismo na sequência detectada por uma sonda também pode causar uma redução na área do pico relativa, mesmo quando não está localizada exatamente no local da ligação. Além disso, alguns sinais de sonda são mais sensíveis à pureza da amostra e pequenas mudanças nas condições experimentais. Assim, deleções e duplicações detectadas pela MLPA devem ser sempre confirmadas por outros métodos.

Nem todas as deleções e duplicações detectadas pela MLPA serão patogênicas, deve-se verificar sempre a mais recente literatura científica ao interpretar seus resultados.

É importante ressaltar que grande parte dos estudos descritos na literatura, demonstrou a eficácia da técnica de MLPA em detectar alterações genômicas, principalmente quanto a rearranjos subteloméricos, entretanto pelo fato da técnica de MLPA ser nova, toda alteração encontrada por meio dela, deve ser validada, repetindo-se o teste utilizando o mesmo kit, outro kit da mesma técnica ou então outro método, para a confirmação de seus resultados (Saugier-Veber et al 2006 e Lincoln-de-Carvalho 2009). Por outro lado, atualmente, MLPA é utilizada para a validação da CGHa e polimorfismo de nucleotídeo único de array (SNPa) (Van Eijk et al 2010).

As sondas dos kits MLPA podem ser combinadas entre si e, assim, permitir a triagem para diversas síndromes em um teste, uma vez que a técnica MLPA amplifica várias sondas em diferentes cromossomos simultaneamente (Sorensen et al 2010).

A técnica de MLPA permite analisar a região cromossômica 22q11 provando ser um método confiável e preciso para detectar microdeleções e microduplicações nessa região (Price et al 2005, Vortsman et al 2006, Kriek 2007, Stachon et al 2007, Emanuel 2008, Jalali et al 2008, Sorensen et al 2008, Cho et al 2009, Hu et al 2009, Mandal et al 2009, Yang et al 2009, Van Eijk et al 2010, Sorensen et al 2010 e Eijk-Van Os e Schouten 2011). Jalali et al (2008), mostraram que a MLPA é altamente precisa, com excelentes valores de sensibilidade e especificidade. Usando uma amostra com uma variedade de diferentes rearranjos na região 22q11, demonstraram a capacidade das sondas MLPA em detectar corretamente o ganho ou perda de material genômico para indicar, com precisão, o número de cópias alélicas e para delinear a extensão da região envolvida no rearranjo. Assim, MLPA identifica alterações típicas e atípicas em toda região 22q11 (Sorensen et al 2010)

(Figura 16). Dadas as muitas vantagens da técnica de MLPA sobre a FISH para a detecção de rearranjos em 22q11, é provável que ela substitua a FISH num futuro muito próximo (Jalali et al 2008).

Fonte: Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, et al. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. Clin Genet. 2005a; 68(4):373-8.

Nota: Sondas FISH (hibridização in situ com fluorescência), marcadores tandem repeat polimórficas de curta duração (STR) e sondas de amplificação múltiplas sondas dependentes de ligação (MLPA) na região crítica DiGeorge da banda 22q11.2. Os segmentos mais deletados (1,5 Mb e 3 Mb) são indicados pelas barras pretas. Os números em círculos denotam a ordem relativa das sete sondas MLPA. Locus de controle ARSA está definido na região 22q13 e, portanto, fora da região crítica de DiGeorge. A deleção típica de 3 Mb abrange a LCR A a D, os marcadores D22S1638 a D22S311 e sondas MLPA HIRA a LZTR1, enquanto que a deleção menor mede 1,5 Mb abrange as LCR A a B, marcadores D22S1638 para D22S1623 e sondas MLPA HIRA a KIAA1652.

Figura 16 - Representação esquemática da posição relativa das regiões de repetições de pequeno número de cópias (*Low Copy Repeats–LCRs*).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de alterações (deleção/duplicação) na região 22q11 em indivíduos até 02 anos de idade com fissura de palato, com o intuito de realizar diagnóstico precoce da SD22q11.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar possíveis anomalias cromossômicas envolvendo outras regiões cromossômicas por meio do cariótipo.

Investigar microdeleções e microduplicações na região 22q11, por meio da técnica de MLPA, em indivíduos que apresentarem cariótipo normal.

*INDIVÍDUOS ESTUDADOS E
METODOLOGIA*

4 INDIVÍDUOS ESTUDADOS E METODOLOGIA

Este estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo (HRAC/USP), conforme ofício nº. 321/2011 - SVAPEPE-CEP (Anexo 1).

Os pais ou responsáveis pelos indivíduos selecionados foram convidados a participar do estudo, informados sobre os objetivos e procedimentos e, aqueles que concordaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

4.1 CASUÍSTICA

Para esse estudo foram selecionados 71 indivíduos, de ambos os sexos, cadastrados e em tratamento no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, da Universidade de São Paulo (HRAC-USP).

Os critérios de inclusão dos indivíduos nesse estudo foram: ter idade inferior ou igual a 2 anos e apresentar fissura de palato. Os indivíduos poderiam apresentar cardiopatia congênita ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor ou ambos e não constituírem síndromes conhecidas. Poderiam ainda apresentar até três anomalias congênitas menores (alterações morfológicas que podem ser frequentes na população geral e não acarretar maiores problemas ao indivíduo, não exigem cuidados e intervenção clínica e/ou cirúrgica (Marden, Smith e McDonald 1964 e São Paulo 2008).

Os dados clínicos dos indivíduos foram obtidos por meio de análise dos prontuários, de acordo com os registros dos profissionais da equipe multidisciplinar do HRAC. Parte dos indivíduos também foi avaliada pelo Setor de Genética Clínica do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP/Bauru), pelo profissional competente. A avaliação genética-clínica incluiu informações sobre sexo, idade, idade dos pais na época da concepção, tempo gestacional, intercorrências gestacionais (uso de substâncias químicas, sangramento, exposição à radiação, traumas físicos e psíquicos, doenças crônicas e/ou infecciosas etc.) e condições perinatais (condições ao nascimento, tipo de parto, medidas antropométricas, tempo de internação, intercorrências neonatais) e história familiar (consanguinidade, recorrência, presença de anomalias) mediante entrevista com os pais ou responsáveis, com descrição pormenorizada do fenótipo morfológico (Anexo 4).

Documentação fotográfica incluindo face (frente e perfil), mão e pés, foi realizada, quando necessária, por profissionais do Setor de Fotografia do HRAC/USP-Bauru.

Para a caracterização da fissura de palato utilizou-se a classificação de Spina et al (1972), que utiliza o forame incisivo como ponto de referência.

Entretanto dos 71 indivíduos selecionados, 16 foram excluídos, pois embora tenhamos realizado a análise citogenética por bandas G, a qualidade de suas amostras de DNA não permitiu a análise proposta e não havia retorno previsto em tempo hábil para realização de nova coleta. Portanto, fizeram parte desse estudo 55 indivíduos.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta da amostra biológica

Após seleção, foi coletada uma amostra de 5 ml de sangue periférico de cada indivíduo a qual foi destinada à análise citogenética e molecular.

A coleta de sangue periférico foi realizada por venipunção, após assepsia com álcool 70% do local a ser puncionado, utilizando-se seringa heparinizada estéril (3 ml) para análise citogenética e tubos contendo EDTA (2 ml) para extração de DNA. A heparinização da seringa é feita aspirando-se, aproximadamente, 1 ml de heparina para o interior da seringa e retornando-a para o interior do frasco sem retirar a agulha da rolha do frasco. Troca-se a agulha antes de realizar a punção.

As amostras receberam um número de identificação, foram registradas no cadastro do Laboratório de Genética e Citogenética Humana do HRAC e, posteriormente, processadas.

4.2.2 Cultura de linfócitos

As amostras foram processadas em capela de fluxo laminar vertical.

Foram utilizados 3 ml de sangue periférico heparinizado para a cultura de linfócitos, para obtenção de cromossomos metafásicos.

Para cada indivíduo foram utilizados dois meios de cultura (199 e RPMI 1640 da Cultilab[®]), enriquecidos com Soro Fetal Bovino (Cultilab[®]) e acrescidos de fito-hemaglutinina P (Cultilab[®]), nas seguintes quantidades: 4 ml de meio de cultura; 1 ml de Soro Fetal Bovino e 0,2 ml de fito-hemaglutinina P.

Aos meios adicionou-se 0,5 ml de sangue periférico heparinizado incubando as culturas em estufa com câmara d'água (FANEM[®]) à temperatura de 37°C, por 72 horas. Após 71 horas de cultivo celular, adicionou-se 0,1 ml de actinomicina D (SIGMA[®]), mantendo-se os frascos envoltos em papel alumínio para evitar a fotodegradação da actinomicina D. Após 55 minutos adicionou-se 0,1 ml de colchicina (solução uso 0.0016% - SIGMA[®]) mantendo-se os frascos incubados por mais 5 minutos.

Após 72 horas de incubação, as culturas foram centrifugadas a 900 rpm, por 10 minutos. O meio sobrenadante foi aspirado e descartado e o sedimento, contendo os linfócitos, foi submetido à hipotonização com solução de 2 ml de cloreto de potássio (KCl 0,075M) a 37°C.

A cada 5 minutos foi adicionado mais 2 ml da solução de KCl e, ao final de 20 minutos, a hipotonização foi interrompida pela adição de 0,5 ml de fixador (3 partes de metanol: 1 parte de ácido acético). A solução foi, então, centrifugada a 900 rpm durante 10 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e, procedeu-se a lavagem do botão de células em 8 ml de fixador metanol-ácido acético 3:1. As células foram ressuspensas com auxílio de pipeta Pasteur e novamente centrifugadas a 900 rpm, por mais 10 minutos.

O procedimento de lavagem das células foi repetido por mais três vezes e, a seguir, o botão de células foi ressuspenso em 1 ml de fixador metanol-ácido acético, observando-se a turbidez da solução. As células lavadas foram, então, gotejadas sobre lâminas de microscopia extrafinas, limpas e desengorduradas em etanol absoluto PA.

De cada cultura foram feitas 5 lâminas, a primeira lâmina foi corada com corante Giemsa (4%), diluído em tampão fosfato Sorënsen (pH 6,8), lavada em água corrente e secas ao ar, para verificação de seu índice mitótico e posterior análise convencional. As lâminas restantes foram embaladas em papel alumínio, identificadas e armazenadas em geladeira para posterior coloração com técnicas de bandas.

4.2.3 Análise citogenética por bandamento G

A análise citogenética foi realizada pela pesquisadora com a colaboração dos profissionais do Laboratório de Genética e Citogenética Humana do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais/ USP.

Na análise com bandamento G, os cromossomos são submetidos a tratamento e coloração específicos que confere padrão de coloração característico para cada um dos 24 cromossomos (22 autossomos e os sexuais X e Y). Por meio destes padrões de banda podem ser detectadas alterações numéricas e estruturais com resolução de 450 bandas.

4.2.3.1 Técnicas de bandamento G

Para coloração das lâminas, foi utilizada a técnica de bandamento GTG, na qual as sequências de proteínas não histônicas são digeridas com enzima tripsina e coradas com corante Giemsa. Essa técnica induz a formação de um padrão de bandas claras e escuras ao longo do comprimento dos 24 cromossomos (22 autossomos e os sexuais X e Y). Quando necessário, foi utilizada a técnica de

bandamento GBW, onde a digestão de proteínas não histônicas é realizada com tampão borato e a coloração é feita com o corante Wright-Giemsa, que mantém o mesmo padrão de bandas.

a) Bandamento G com tripsina (GTG)

As lâminas foram mergulhadas em cuba contendo solução de tripsina diluída em tampão fosfato Sorënsen (pH 6,8), a 37°C, por 4 a 6 segundos. A seguir, foram lavadas em água corrente, coradas com corante Giemsa (4%) diluído em tampão fosfato Sorënsen (pH 6,8), durante 4 minutos e, novamente lavadas (água corrente) e secas em temperatura ambiente.

b) Bandamento com tampão borato (GBW)

As lâminas foram mergulhadas em cuba contendo solução de tampão borato (pH 9,2), a 60°C, durante 10 minutos. Decorrido esse tempo, as lâminas foram coradas com corante Wright-Giemsa, diluído em tampão borato a 50%, por aproximadamente 2 minutos. A seguir foram lavadas (água corrente) e secas em temperatura ambiente.

4.2.3.2 Cariótipo

A técnica de análise do cariótipo foi realizada de acordo com os protocolos adotados pelo Laboratório de Genética e Citogenética Humana do HRAC/USP, adaptados daqueles descritos por Verma e Babu (1995) e Barch, Knutsen e Spurbeck (1997), onde os cromossomos corados pela técnica de bandamento GTG encontram-se estendidos, o que permite a visualização de aproximadamente 450 bandas.

Para cada indivíduo havia uma pasta com uma ficha de identificação.

Foram analisadas 21 metáfases com banda G de cada indivíduo, sendo 16 metáfases desenhadas e identificadas através de microscópio binocular (Olimpus BX51) no aumento de 1250 vezes, e 5 cariótipos montados a partir de fotomicrografias de metáfases, capturadas por meio do o Sistema Computacional para Análise de Cromossomo Humano - CROMHU (Atonus Engenharia de Sistemas Ltda. - Brasil).

Para identificação das bandas G foi utilizado o padrão estabelecido pelo International System Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (Mitelman 2009).

4.2.4 Análise molecular

4.2.4.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído, a partir de 2 ml de sangue periférico em EDTA, utilizando-se o kit de extração PUREGENE DNA purification system (GENTRA Systems Inc®, Minneapolis, MN) de acordo com o seguinte protocolo:

- a) Em um tubo cônico de 15 ml colocar 2 ml de sangue periférico;
- b) Adicionar 6 ml de solução de lise;
- c) Inverter o tubo para misturar, deixar em repouso por 5 minutos, inverter novamente, e deixar em repouso por mais 5 minutos;
- d) Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos;
- e) Remover o sobrenadante, preservando o pellet;
- f) Vortequizar;
- g) Acrescentar 2 ml de solução de lise e pipetar devagar até homogenizar;

- h) Adicionar 0,667 ml de solução de precipitação de proteína;
- i) Vortequizar por 20 segundos;
- j) Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos;
- k) Transferir o sobrenadante contendo o DNA para outro tubo cônico de 15 ml contendo 2 ml de isopropanol 100%. Descartar o tubo com o pellet de proteína;
- l) Inverter o tubo várias vezes até que o DNA se torne visível;
- m) Centrifugar a 400 rpm por 3 minutos. O DNA formará um pequeno pellet;
- n) Descartar o sobrenadante e deixar o tubo secar;
- o) Adicionar 2 ml de etanol 70% e inverter o tubo para lavar o pellet;
- p) Centrifugar a 4000 rpm por 3 minutos;
- q) Descartar o etanol cuidadosamente, invertendo o tubo;
- r) Deixar o tubo secar bem por 4-5 horas ou overnight;
- s) Adicionar 166,7 de solução de hidratação de DNA;
- t) Reidratar overnight à temperatura ambiente ou aquecer em banho-maria por 1 hora;
- u) Estocar a 2° - 8°C.

Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®).

4.2.4.2 Técnica de MLPA

Inicialmente, para a padronização e validação da técnica de MLPA, foram utilizadas amostras de DNAs controle positivos (com deleção 22q11 detectadas por outros métodos) e controles negativos (normais). Para tanto, foram utilizados

amostras de DNA já disponíveis no Laboratório de Genética Molecular do HRAC/USP.

Foi utilizado o kit SALSA P250-B1 DiGeorge probemix[®] (MRC-Holland[®], Amsterdam, Holanda) (Tabela 1), desenvolvido para detectar deleções/duplicações típicas e atípicas na região cromossômica 22q11 (Jalali et al 2008 e Hu et al 2009).

Este kit abrange a região tipicamente deletada (TDR) incluindo as LCRs A, B, C, D, E, F, G e H, e contém 48 sondas MLPA com produtos de amplificação de tamanhos entre 130 e 487 nt, das quais 5 localizadas na região da síndrome do olho do gato e 24 localizadas nas LCRs 22 (A-H). Além disso, contém nove fragmentos de controle gerando um produto de amplificação menor que 120 nt: quatro fragmentos de quantidade DNA (Q-fragmentos) de 64-70-76-82 nt, três fragmentos de controle de desnaturação de DNA (D-fragmentos) de 88-92 -96 nt, um fragmento X de 100 nt e um fragmento Y de 105 nt.

A maioria das deleções 22q11 (87%) se estendem da LCR22-A até a LCR22-D (Shaikh et al 2000, Draaken et al 2010 e Sorensen et al 2010). Neste kit P250-B1 DiGeorge, 14 sondas estão localizadas nesta região. Uma outra deleção (8%) se estende da LCR22-A até LCR22-B, enquanto 2% tem início na LCR22-A e termina na LCR22-C. Finalmente, 2% dos casos se estende a partir de um ponto entre a LCR22-A e LCR22-B e terminam na LCR22-D.

Além das sondas na região 22q11, utilizadas para identificar os tipos mais comuns de deleção, o kit contém ainda 19 sondas para outras regiões, incluindo 22q13, 9q34.3, 10p14, 4q35, 8p23 e 17p13, utilizadas como controles.

Todas as análises realizadas nesse estudo, foram repetidas e confirmadas pelo mesmo kit.

Tabela 1 - Sondas do kit SALSA MLPA P250-B1 DiGeorge probemix® organizadas de acordo com localização cromossômica.

	Sonda	Posição no cromossomo (Distância do 22p ao telômero em Kb (HG18))	Região no cromossomo
1	IL17RA	15.960 kb	Síndrome do olho do gato
2	SLC25A18	16.423 kb	Síndrome do olho do gato
3	BID	16.607 kb	Síndrome do olho do gato
4	MICAL3	16.705 kb	Síndrome do olho do gato
5	USP18	17.013 kb	Síndrome do olho do gato
6	CLTCL1	17.622 kb	LCR22-A
7	HIRA	17.699 kb	LCR22-A
8	CDC45L	17.847 kb	LCR22-A
9	CLDN5	17.891 kb	LCR22-A
10	GP1BB	18.092 kb	LCR22-A
11	TBX1	18.127 kb	LCR22-A
12	TBX1	18.133 kb	LCR22-A
13	TXNRD2	18.266 kb	LCR22-A
14	DGCR8	18.454 kb	LCR22-A
15	ZNF74	20.129 kb	LCR22-B
16	KLHL22	20.380 kb	LCR22-B
17	MED15 (PCQAP)	20.653 kb	LCR22-B
18	SNAP29	19.572 kb	LCR22-C
19	LZTR1	19.679 kb	LCR22-C
20	HIC2	20.129 kb	LCR22-D
21	PPIL2	20.380 kb	LCR22-D
22	TOP3B	20.653 kb	LCR22-D
23	RTDR1	21.734 kb	LCR22-E
24	GNAZ	21.795 kb	LCR22-E
25	RTDR1	21.813 kb	LCR22-E
26	RAB36	21.818 kb	LCR22-E
27	SMARCB1	22.459 kb	LCR22-F
28	SMARCB1	22.506 kb	LCR22-F
29	SNRPD3	23.284 kb	LCR22-G
30	ARSA	49.413 kb	22q13
31	SHANK3	49.508 kb	22q13
32	GATA3	8.141 kb	10p14
33	GATA3	8.156 kb	10p14
34	TCEB1P3	10.589 kb	10p14
35	CUGBP2	11.017 kb	10p14
36	CUGBP2	11.248 kb	10p14
37	NEBL	21.226 kb	10p14
38	PPP1R3B	9.036 kb	8p23
39	MSRA	10.103 kb	8p23
40	GATA4	11.654 kb	8p23
41	SLC25A4	186.303 kb	4q34-qter
42	KLKB1	187.390 kb	4q34-qter
43	EHMT1	139.731 kb	9q34.3
44	EHMT1	139.805 kb	9q34.3
45	RPH3AL	169 kb	17p13.3
46	RPH3AL	184 kb	17p13.3
47	GEMIN4	597 kb	17p13.3
48	YWHAE	1.211 kb	17p13.3

A técnica de MLPA foi realizada segundo o protocolo original descrito por Schouten et al (2002) com pequenas modificações:

- a) **Desnaturação do DNA:** As amostras de DNA foram diluídas (para obter-se uma concentração de 50ng/μl de DNA) em TE. Um microlitro (μl) de cada amostra diluída foi colocado em tubos de 0,2 ml e submetido a uma temperatura de 98°C por cinco minutos, e em seguida a 25°C. As amostras foram centrifugadas 30 segundos a 13.000 rpm.
- b) **Hibridação:** Após a desnaturação, foi acrescentado 1 ul do Master Mix I (0,375 μl do SALSA *Probemix 1*, 0,375 μl do SALSA *buffer* e 0,25 μl de água) a cada tubo e foi incubado a 95°C por um minuto, em seguida a 60°C por 3 horas e permaneceu a 54°C.
- c) **Reação de ligação:** No termociclador, em uma temperatura de 54°C, foram adicionados 8 ul de *mix* ligase-65 (6,25 μl de água, 0,75μl de ligase buffer A, 0,75 μl de ligase buffer B e 0,25 μl de ligase) às amostras. As amostras foram incubadas a 54°C por 15 minutos e em seguida a 98°C por 5 minutos e reduzida a 4°C.
- d) **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):** A uma temperatura de 60°C, foram adicionados 20 μl do Master Mix II (15,75 μl de água estéril, 2 μl de SALSA PCR, 1 μl de PCR buffer, 1 μl do primer e 0,25 μl de *taq DNA polimerase*) a cada tubo, misturados por pipetagem e imediatamente iniciou-se a reação de PCR nas seguintes condições:
 - a. 35 ciclos:
 - 95°C por 30 segundos;
 - 60°C por 30 segundos;

- 72°C por 60 segundos;
- b. 72°C por 20 minutos;
- c. 4°C pausa.

Todas as reações de desnaturação, hibridação, ligação e PCR foram realizadas em termociclador MyGenie96 Thermal Block (Bionneer®).

- e) Separação dos produtos amplificados:** Em uma placa de sequenciamento foram adicionados 1,0 µl do produto da PCR (diluído 1:20), 0,075 µl de size standard LIZ600 (Applied Biosystems®) e/ou ROX500 (Applied Biosystems®) e 9 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems®, Foster City, CA), desnaturados a 96°C por 3 minutos, incubados em banho de gelo por 3 minutos e separados por tamanho em sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems®, Foster City, CA).
- f) Visualização e análise dos resultados:** Os eletroferogramas foram analisados usando o software de análise de genótipo Genemarker® (SoftGenetics®, State College, Pensilvânia, EUA), em planilhas desenvolvidas e fornecidas *on line* pela MRC-Holland®, fabricante do kit de MLPA, específicas para o Kit SALSA MLPA P250-B1 DiGeorge probemix®. A aplicação desse software integra todas as etapas de análise, fornecendo opções de normalização e de relatórios personalizados de pesquisa clínica, incluindo identificação da amostra, os parâmetros de análise, gráfico e eletroferograma.

Quantidades relativas dos produtos de sondas amplificadas foram comparadas com a amostra de referência para determinar o número de cópias da sequências-alvo. O software determina a relação das áreas dos picos de interesse com as áreas dos picos das regiões controle, considerando um pico como sendo normal quando a razão entre essas áreas estiver entre 0,75 e 1,3, valores inferiores a um limiar de 0,75 e acima de um limite de 1,3, para várias sondas adjacentes, indicam a presença de uma deleção ou duplicação, respectivamente (Schouten et al 2002 e Gotter et al 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fizeram parte desse estudo 55 indivíduos, com idades entre 6 dias e 24 meses. A razão sexual foi de 23 indivíduos do gênero masculino e 32 do gênero feminino.

Dentre os 55 indivíduos, 46 apresentaram fissura de palato isolada, 6 apresentaram fissura de palato e cardiopatia, 1 fissura de palato e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, 1 caso apresentou fissura de palato submucosa e 1 caso apresentou fissura de palato submucosa e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor.

A caracterização da amostra está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização da casuística estudada.

INDIVÍDUO	IDADE	SEXO	FP	ADNPM	CARDIOPATIA	ANOMALIAS MENORES
1	11 meses	F	+	-	-	-
2	8 meses	F	+	-	-	-
3	24 meses	F	+	+	-	-
4	18 dias	M	+	-	-	Fendas palpebrais estreitas, orelhas pequenas com hélices dobrados/enrolados, base nasal larga.
5	25 meses	M	+	-	-	Fendas palpebrais estreitas, base nasal larga, discreta assimetria facial ao sorrir
6	2 meses	F	+	-	-	-
7	2 meses	F	+	-	-	-
8	2 meses	F	+	-	-	-
9	2 meses	M	+	-	-	-
10	2 meses	F	+	-	-	-
11	9 meses	F	+	-	-	-
12	3 meses	F	+	-	-	-
13	5 meses	F	+	-	-	-
14	24 meses	F	+	-	-	-
15	18 meses	M	+	-	-	-
16	3 meses	M	+	-	-	Base nasal baixa, narinas antevertidas, filtro longo
17	24 meses	M	+	-	+	Epicanto, orelhas discretamente proeminentes com curva da hélix larga, base nasal baixa
18	12 meses	F	+	-	-	-

continua

continuação

INDIVÍDUO	IDADE	SEXO	FP	ADNPM	CARDIOPATIA	ANOMALIAS MENORES
19	24 meses	F	+	-	-	-
20	4 meses	M	+	-	-	-
21	12 meses	F	+	-	-	-
22	7 meses	F	+	-	+	-
23	4 meses	M	+	-	-	-
24	12 meses	F	+	-	-	-
25	2 meses	M	+	-	-	-
26	1 mês	M	+	-	-	-
27	6 dias	F	+	-	-	-
28	8 meses	F	+	-	-	-
29	24 meses	F	+	-	-	-
30	18 meses	F	+	-	-	-
31	3 meses	F	+	-	-	-
32	21 meses	F	+	-	-	-
33	24 meses	M	+	-	-	-
34	14 meses	F	+	-	-	-
35	1 mês	F	+	-	-	-
36	15 dias	M	+	-	-	-
37	14 meses	F	+	-	-	-
38	24 meses	M	+	+	-	-
39	17 meses	F	+	-	-	-

continua

continuação

INDIVÍDUO	IDADE	SEXO	FP	ADNPM	CARDIOPATIA	ANOMALIAS MENORES
40	24 meses	M	+	-	+	-
41	1 mês	M	+	-	-	-
42	13 meses	F	+	-	-	-
43	1 mês	F	+	-	-	-
44	8 meses	M	+	-	-	-
45	3 meses	F	+	-	-	Fendas palpebrais oblíquas para cima, base nasal baixa, narinas hipoplásicas
46	14 meses	F	+	-	-	-
47	9 dias	M	+	-	-	-
48	2 meses	M	+	-	+	-
49	5 meses	M	+	-	+	-
50	2 meses	M	+	-	+	-
51	24 meses	F	+	-	-	-
52	1 mês	F	+	-	-	-
53	24 meses	M	+	-	-	-
54	24 meses	M	+	-	-	-
55	24 meses	M	+	-	-	-

F (feminino); M (masculino); FP (fissura de palato); ADNPM (atraso no desenvolvimento neuropsicomotor)

* = fissura de palato submucosa

+= presente

- = ausente

Características tais como atraso no crescimento e desenvolvimento, múltiplas anomalias congênitas e uma grande variedade de características dismórficas são comuns entre as anomalias cromossômicas (Ben-Shachar et al 2008). A análise citogenética clássica com bandamento G é método padrão de investigação de alterações cromossômicas nesses casos e de suspeitos de outras anomalias cromossômicas (Dave e Sanger 2007).

Clinicamente, muitas síndromes de microdeleção não só mostram um alto grau de variabilidade entre os indivíduos com deleção, mas também compartilham muitas características comuns. Como há relatos de indivíduos com sinais clínicos da síndrome SD22q11, mas que não apresentam a microdeleção 22q11, ou que apresentam alterações ou rearranjos envolvendo outros cromossomos (Faed et al 1987, Greenberg et al 1988, Jaquez et al 1997, Sirotkin et al 1997, Devriendt et al 1999, Tsai et al 1999, Lichtner et al 2000, Villanueva et al 2002, Harada et al 2004, Iwakoshi et al 2004, Stewart et al 2004, Neas et al 2005, Yatsenko et al 2004, Belanger et al 2009, Dundar et al 2009, Koshiyama et al 2009, Rope et al 2009, Rosa et al 2009 e MRC-Holland 2011) e devido ao fato de que poderíamos encontrar anomalias em outras regiões cromossômicas em algum indivíduo, iniciamos a avaliação realizando análise citogenética por bandamento G em todos os indivíduos. Não foram detectadas alterações citogenéticas numéricas ou estruturais na amostra analisada.

Heteromorfismos ou variantes cromossômicas, ou seja, rearranjos estruturais do material heterocromático, polimorfismos de satélites (NORs) ou sítios frágeis e variantes eucromáticas, não apresentam efeito fenotípico (Kowalczyk, Srebniak e Tomaszewska 2007 e Kamiya 2009) e foram encontrados em quatro

indivíduos da amostra (1, 6, 15 e 55), envolvendo os cromossomos 1, 9, 16, 21 e 22 (Tabela 3, Figuras 17 a 20).

As regiões de banda C representam DNA permanentemente inativado, variações no tamanho e posição da heterocromatina constitutiva das regiões 1qh, 9qh, 16qh e Yqh são observadas frequentemente na rotina citogenética e não provocam alterações no fenótipo de seus portadores (Kaiser-Rogers e Rao 2005, Kowalczyk, Srebniak e Tomaszewska 2007 e Kamiya 2009). Os braços curtos dos acrocêntricos fornecem a maior fonte de variabilidade dentro do genoma humano, as regiões proximais do braço curto e distal dos satélites desses cromossomos são compostos por DNA satélite repetitivo e não codificam sequências e, portanto, variações no comprimento nesses braços curtos e nas NORs podem ser observadas com frequência. A translocação envolvendo uma NOR, isto é, a transferência de NOR de um acrocêntrico para outro cromossomo, pode levar a criação de uma nova variante, pois pode ser transmitida por gerações, sem qualquer efeito fenotípico (Kaiser-Rogers e Rao 2005, Kowalczyk, Srebniak e Tomaszewska 2007 e Kamiya 2009).

Tabela 3 - Heteromorfismos encontrados no cariótipo dos indivíduos estudados.

Indivíduo	Gênero	Cariótipo
1	F	46,XX, 9qh+, 9qh- mat
6	F	46,XX, 1qh+, 1qh-,21ps+
15	M	46,XY, 22ps+
57	M	46,XY,16qh-

F (feminino); M (masculino); h (heterocromatina); mat (de origem materna); p (braço curto); q (braço longo); s (satélite)

- = perda

+ = ganho

Nota: As setas indicam as regiões dos heteromorfismos encontrados.

Figura 17 - Indivíduo 1 – Cariótipo 46,XX, 9qh+, 9qh- mat.

Nota: As setas indicam as regiões dos heteromorfismos encontrados.

Figura 18 - Indivíduo 6 – Cariótipo 46,XX, 1qh+, 1qh-, 21ps+.

Nota: As setas indicam as regiões dos heteromorfismos encontrados.

Figura 19 - Indivíduo 15 – Cariótipo 46,XY, 22ps+.

Nota: As setas indicam as regiões dos heteromorfismos encontrados.

Figura 20 - Indivíduo 55 – Cariótipo 46,XY,16qh-.

Katzman et al (2005) identificaram anomalias cromossômicas, por análise citogenética convencional e FISH, em um grupo de indivíduos selecionados para a SD22q11, e mostraram que embora 5,4% dos indivíduos analisados tinham deleção 22q11, 4% apresentaram outras anomalias cromossômicas, indicando que a citogenética convencional deve ser rotineiramente executada simultaneamente com outros testes.

Entretanto, crianças com mais idade e adultos com fissura palatina e cariótipo normal, acabam recebendo um diagnóstico de fissura palatina isolada e não são encaminhadas para outros testes citogenéticos moleculares para investigação de alterações na região 22q11 (Reish et al 2003).

As técnicas citogenéticas padrão podem identificar anomalias cromossômicas incluindo grandes deleções, duplicações e translocações (Bar-Shira et al 2006). Entretanto, perdas de um pequeno segmento de DNA (aproximadamente 1 Mb a 3 Mb) não podem ser detectadas por meio de métodos de cariótipo convencional e de alta resolução, pois apesar do seu indiscutível sucesso, esta ferramenta tem resolução limitada (4 Mb-10 Mb) (Flint et al 1995, Vissers et al 2003 e Yeshaya et al 2009).

Como a maioria das deleções descritas na região 22q11 apresentam um tamanho de 1,5 Mb a 3 Mb, e há relatos de raras deleções ainda menores, a utilização da citogenética clássica de bandamento G para identificação de microdeleções e/ou microduplicações na região 22q11, tornar-se, portanto, ineficaz, sendo necessário o uso de outras técnicas moleculares, como já relatado em outros estudos (Belangero et al 2009 e Rosa et al 2009).

Além disso, as bandas dos cromossomos ricas em genes são bandas geralmente claras e, portanto, suas deleções/duplicações são difíceis de identificar no bandamento G de rotina (Rodrigues 2010).

A análise de rotina para deleções em 22q11 tem sido debatida na literatura. Muitos estudos defendem o fato de que não é necessário analisar todos os indivíduos com fissura de palato isolada, apenas aqueles com características clínicas relacionadas à SD22q11, como dismorfismo facial, distúrbios comportamentais e psiquiátricos (Reish et al 2003, Ruitter 2003 e Barisic et al 2008). Outros, devido à ampla variabilidade clínica, indicam a análise tanto em indivíduos com malformação cardíaca quanto em indivíduos com disfunção velofaríngea (Vantrappen et al 2001).

A frequência da deleção 22q11 em indivíduos com anomalias palatinas não está totalmente estabelecida na literatura e existem controvérsias a respeito de quando investigar a deleção 22q11 nesses indivíduos.

O objetivo primordial do presente estudo foi verificar a possibilidade de diagnóstico precoce da SD22q11. Para tanto selecionamos indivíduos até 2 anos de idade com anomalias palatinas para avaliar a deleção 22q11 por meio da técnica de MLPA. Utilizando o kit SALSA P250-B1 DiGeorge (MRC Holland), desenvolvido para detectar deleções/duplicações típicas e atípicas da região 22q11, analisamos os 55 indivíduos da amostra. Nenhum apresentou deleção/duplicação na região 22q11, indicando que, de fato, a frequência da deleção 22q11 em indivíduos com fissura de palato isolada é bastante baixa.

Desde a descrição original da SD22q11 por Shprintzen et al (1978), quando apenas as fissuras de palato foram descritas em associação com a síndrome, outros estudos adicionaram outras anomalias palatinas ao espectro da síndrome, como a

fissura de palato evidente ou oculta, fissura labiopalatina, insuficiência velofaríngea e a sequência de Robin (Shprintzen 1985, Glander e Cisneros 1992, Finkelstein et al 1993 e Reish et al 2003), reconhecendo-a como a síndrome mais comumente associada à fissura palatina (Shprintzen et al 1978, Goldberg et al 1993, Hultman et al 2000, Reish et al 2003 e Oh et al 2007). Ryan et al (1997) encontraram uma frequência de 49% de anomalias palatinas, sendo 9% de fissura de palato, 5% fissura submucosa, 3% de fissura de lábio isolada e 32% de disfunção velofaríngea sem fissura.

Análise da região 22q11 realizada por Zori et al (1998) em 16 indivíduos com DVF encontrou 7 indivíduos com deleção. Perkins, Sie e Gray (2000) estudaram um grupo de 23 indivíduos com DVF após adenoidectomia e sem o fenótipo da SD22q11. Quatorze indivíduos desse grupo foram testados para a deleção 22q11 e 9 apresentaram a deleção. Sendo assim, o teste para a deleção 22q11 foi benéfico no diagnóstico de indivíduos com genótipo, mas sem fenótipo da SD22q11 nesse grupo. Oh, Workman e Wong (2007) avaliaram 16 indivíduos com a deleção 22q11, tendo sido observado DVF em todos os casos, 88% destes apresentavam fissura de palato evidente ou submucosa e 81% evidenciavam sinais faciais típicos.

Em seu estudo, Brandão (2010) analisou as características de fala e função velofaríngea em 25 indivíduos com sinais clínicos da SD22q11, dos quais 12 apresentaram fissura de palato submucosa, 8 fissura oculta e 5 IVF sem alteração aparente no palato. O autor mostrou que a média de idade do primeiro atendimento dos indivíduos estudados foi de 8 anos e salienta que a maioria dos casos não tinha diagnóstico nem a suspeita da SD22q11 prévio a este atendimento, e que essa idade coincide com o processo de alfabetização, momento em que ocorrem

evidências da dificuldade nas relações interpessoais e no aprendizado, o que passaria despercebido no período anterior.

Indivíduos com sinais clínicos da SD22q11 apresentam sintomas de fala, fato que os levam a procurar o tratamento, porém há indivíduos com a síndrome que não apresentam sintomas. Nos indivíduos com fissura de palato submucosa, a alteração no palato muitas vezes é sutil, e pode passar despercebida até que a família procure atendimento devido à manifestação de sintomas de fala. A realização tardia da palatoplastia primária também é comum em casos com SD22q11 (Brandão 2010).

Assim, a incidência da DVF observada nos casos de SD22q11 é ainda questionável, pois as amostras analisadas em vários estudos descritos na literatura foram obtidas em centros de referências para anomalias craniofaciais, tratando-se portanto de amostras viciadas (Brandão 2010).

No presente estudo, não foi possível avaliar a presença de disfunção velofaríngea devido a faixa etária dos indivíduos. O diagnóstico da DVF geralmente ocorre na época da aquisição da fala, o que se dá por volta dos 18 meses de idade. No entanto, como relatado na literatura (Shprintzen et al 1981, Ruotolo et al 2006, Hay 2007, Rouillon et al 2009 e Brandão 2010), estes distúrbios de fala e linguagem geralmente podem não ser detectados na infância, levando ao diagnóstico em idades posteriores. Na maioria das vezes, a mãe ou o responsável pelo indivíduo só irá procurar o profissional especializado quando a criança já se encontra em idade mais avançada. Sendo assim, não tivemos na nossa amostra, limitada a faixa etária de 0 a 2 anos, nenhum indivíduo com diagnóstico de DVF. Baseado nessas informações, observamos a necessidade de se estabelecer, num próximo estudo, juntamente com o Setor de Fonoaudiologia do HRAC/USP, um plano de trabalho

para selecionar indivíduos com anomalias palatinas em idade média de 18 meses para avaliação da função velofaríngea e indicação ou não para investigação da deleção. Dessa forma, o diagnóstico precoce da SD22q11 poderia ser efetivo.

De acordo com Reish et al (2003) anomalia palatina isolada não é indicação para investigação da deleção 22q11 em crianças maiores ou adultos que apresentam anomalias palatinas isoladas. Devido ao fato de que outros sinais relacionados a SD22q11, como dismorfismos faciais e distúrbios de comportamento, podem evoluir com a idade, os bebês devem ser acompanhados e reavaliados para identificar sinais adicionais relevantes que possam levar a investigação da deleção.

Rutter et al (2003) acreditam que a investigação da deleção 22q11 de rotina para indivíduos com fissura de palato não é indicada, desde que o acompanhamento clínico desse indivíduo seja garantido durante todo seu desenvolvimento. Do ponto de vista do aconselhamento genético, o risco de se perder um caso é aceitável porque somente 10-15% dos casos são herdados, e serão reconhecidos por meio da história familiar sugestiva e/ou exame físico dos pais. Dessa forma, a única razão para se investigar a deleção 22q11 seria a suspeita clínica.

Muitos dos indivíduos com fissura de palato como parte da SD22q11 apresentam sinais clínicos adicionais da síndrome e deveriam ser testados para a deleção 22q11. É relevante determinar se há indicação para a análise de rotina para todos os indivíduos com fissura de palato, incluindo aqueles sem outro sinal além da fissura de palato isolada. Driscoll, Randall e McDonald-McGinn (1995), Mingarelli et al (1996) e Barisic et al (2008) testaram a deleção 22q11 em indivíduos com fissura de palato sem outras anomalias congênitas. Eles não encontraram deleção nos 38 indivíduos, 16 indivíduos e 58 indivíduos, respectivamente. Rutter et al (2003) testaram 45 indivíduos com fissura de palato e encontraram somente uma deleção.

A somatória dos dados mostra que somente 1 em 157 casos de fissura de palato sem outras anomalias foi detectada. No nosso estudo, dentre os 55 indivíduos analisados, 46 apresentaram fissura de palato isolada e não encontramos nenhuma alteração na região 22q11. Nossos resultados associados aos da literatura demonstram que a prevalência da deleção 22q11 nos casos de fissura de palato isolada é muito baixa.

Em um grupo de 134 indivíduos com fissuras labiopalatinas, Bashir et al (2008) encontraram a deleção em 6 indivíduos com fissura submucosa oculta, dois com fissura de palato e um com fissura labiopalatina unilateral. Seus resultados apresentaram uma porcentagem maior do que a descrita na literatura, concluindo que a investigação de rotina deve ser aplicada em todos os indivíduos com fissuras labiopalatinas, tendo em vista as implicações de um diagnóstico da SD22q11.

Em seu estudo Barisic et al (2008) concluíram que a investigação da deleção 22q11 em indivíduos com fissura de palato não se justifica, entretanto pode ser recomendada para indivíduos com defeitos cardíacos conotrunciais, devendo ser considerada também para indivíduos que apresentam traços dismórficos sugestivos da deleção 22q11.

A cardiopatia congênita é encontrada em 75% a 80% dos indivíduos com a SD22q11 (Yamagishi et al 2000, Cuneo 2001, Ruiter et al 2003, Reish et al 2003, Bashir et al 2008, Rosa et al 2008, Ziolkowska et al 2008, Lee et al 2009, Bales et al 2010 e Van Engelen 2010). Na nossa amostra detectamos 6 indivíduos com cardiopatia, além da fissura de palato (indivíduos 17, 22, 40, 48, 49 e 50). Mesmo sendo a cardiopatia considerada como sugestiva da SD22q11, não detectamos nenhuma alteração na região 22q11 nesses indivíduos.

Atraso no desenvolvimento neuropsicomotor tem sido relatado em indivíduos com SD22q11. Katzman et al (2005) sugerem que atraso no desenvolvimento pode ser uma indicação para a investigação da deleção. Ryan et al (1997) analisaram 558 indivíduos e encontraram atraso no desenvolvimento em 68% dos casos. Dos 100 indivíduos estudados por Oskarsdóttir et al (2005) 96% apresentaram atraso no desenvolvimento.

Gerdes et al (1999) afirmaram que em crianças com SD22q11, o atraso no desenvolvimento, como de fala e linguagem, é mais comumente observado na idade pré-escolar, e que quanto mais significativo o atraso, maior o risco de apresentarem posteriormente atraso mental leve ou moderado e que atraso severo não tem sido observado. Esse atraso está diretamente associado a deleção 22q11 e não devido as anomalias físicas como as anomalias palatinas. Há uma tendência em se afirmar que em indivíduos cuja deleção é familiar, há um atraso desde o início do desenvolvimento. Dados mostram que esses indivíduos apresentam atraso em todas as áreas do desenvolvimento, porém é necessário considerar o impacto relativo da influência do ambiente e genética. Portanto, embora esses indivíduos apresentem diferenças na expressão do atraso, desde muito leve a significativo, há necessidade de avaliação do desenvolvimento precoce das crianças com SD22q11 e a intervenção terapêutica, especialmente nas áreas de linguagem e habilidades motoras grossas.

Gerdes et al (2001) analisaram o desenvolvimento neuropsicomotor em bebês e crianças em idade pré-escolar (4-70 meses) com deleção 22q11 e encontraram atraso no desenvolvimento em 54%, sendo que 24% tinham um leve atraso, 22% apresentaram atraso médio de desenvolvimento cognitivo e 80% estavam abaixo da média no desenvolvimento da linguagem, evidenciando que

atrasos no desenvolvimento, na linguagem e na aquisição da fala são comuns e indicativos da necessidade de serviços de intervenção precoce para crianças com SD22q11.

No presente estudo, limitado a faixa etária de até 2 anos, somente foi possível identificar atraso no desenvolvimento em 2 indivíduos ambos com 2 anos de idade (indivíduo 3 e 38). Isso demonstra a importância do acompanhamento desses indivíduos, pois a avaliação precisa do desenvolvimento só será realizada em idade mais avançada. De qualquer forma, não detectamos a deleção 22q11 nos indivíduos analisados, portanto, mesmo que futuramente algum desses indivíduos analisados apresentem atraso no desenvolvimento, este estará associado a outro mecanismo.

Dentre os tipos de fissuras orofaciais, o mais frequentemente observado na SD22q11 é a fissura de palato. Poucos trabalhos relatam a fissura de lábio e palato nos indivíduos com SD22q11 (Bashir et al 2008 e Fernandez et al 2009). Durante o período de coleta do presente estudo analisamos uma menina com 6 meses de idade, com fissura de lábio e palato e sem sinais sugestivos da SD22q11 (Figura 21). A mãe apresentava voz hipernasal, história de refluxo quando bebê, atraso na aquisição da fala (iniciou aos 4 anos) e dificuldades de aprendizagem (Figura 22). O cariótipo menina e de sua mãe foi normal e a análise por MLPA identificou, em ambas, uma deleção de 2 Mb dentro da região de 3 Mb (Figura 23), envolvendo as LCR22 A, B e C, comumente deletada nos indivíduos com a síndrome (Figura 24). Para confirmação do resultado, o teste foi repetido e confirmado pelo o kit MLPA P250-B1 e também pelo kit P023-B2 DiGeorge/Velocardiofacial que também é comumente utilizado para investigação da região 22q11.

Figura 21 - Aspectos clínicos da criança com fissura de lábio e palato e deleção 22q11 aos 6 meses de idade.

Figura 22 - Aspectos clínicos da mãe.

Nota: Os pontos vermelhos são sondas deletadas, na criança (a, b) e na mãe (c,d), localizadas dentro da região tipicamente deletada (TDR). Os pontos azuis são outras sondas do kit MLPA P250-B1 DiGeorge (a, c) e P023-B2 DiGeorge/Velocardiofacial (b, d) localizadas nas regiões proximais e distais à região crítica DiGeorge e em outros cromossomos.

Figura 23 - Análise MLPA pelo software Genemarker® (SoftGenetics®, State College, Pensilvânia, EUA).

LCR22= repetições de pequeno número de cópias no cromossomo 22; MLPA= amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação.

Figura 24 - Ideograma do cromossomo 22, em destaque a região 22q11 e as sondas MLPA do kit P250-B1 DiGeorge, envolvendo as LCR22 A, B e C, deletadas na criança e na mãe.

Aproximadamente 87% dos indivíduos com deleção na região 22q11 apresentam deleção de 3 Mb, 8% apresentam deleção de 1,5 Mb e 2% apresentam deleção atípica, tal como a de 2 Mb. Alguns autores tem sugerido que deleções de 1,5 - 2 Mb são comuns em casos familiares (Iascone et al 2002, Adeyinka et al 2004 e Fernandez et al 2005b). O nosso achado, apesar de ser único, demonstra a transmissão de mãe para filha, corroborando, portanto, com os dados da literatura. Apesar do fato de que a maioria dos indivíduos com SD22q11 possui a mesma deleção de 3 Mb, essa síndrome é uma das que mais apresenta variabilidade clínica. No entanto, a maioria dos estudos demonstram que não há correlação entre a variabilidade clínica e o tamanho da deleção (Goldmuntz 2005 e McDonald-McGinn, Emanuel e Zackai 2005).

Como essa criança relatada, positiva para a deleção da região 22q11, apresenta fissura de lábio e palato e, de acordo com o critério de inclusão estabelecido para esse estudo, somente deveriam compor a amostra indivíduos com fissura de palato apenas, não consideramos esse caso como pertencente a casuística. No entanto, esse é um achado importante e merece ser descrito, pois demonstra que, numa próxima avaliação, devemos incluir também indivíduos com fissura de lábio e palato. Além disso, o diagnóstico da SD22q11 pela técnica de MLPA foi realizado em uma criança de 6 meses, configurando um diagnóstico precoce.

De acordo com Wozniak et al (2010), independentemente dos métodos utilizados para diagnosticar a SD22q11, o diagnóstico precoce é crucial e os critérios para investigação da deleção 22q11 deveriam ser ampliados e aplicados em indivíduos com anomalias cardíacas congênitas e pelo menos uma característica

típica da síndrome (dismorfia facial, hipolasia do timo, fissura de palato ou hipocalcemia), bem como em filhos de pais que apresentam a deleção.

Para se estabelecer investigação de rotina, geralmente leva-se em consideração alguns pontos importantes como o conhecimento do distúrbio, o tratamento, o conhecimento do teste e considerações com relação ao custo. Uma parte crítica de qualquer programa de triagem são as características do teste a ser utilizado. Sensibilidade, especificidade e custo precisam ser conhecidos com precisão antes da decisão de sua implementação. Uma consideração adicional é se o teste vai identificar um distúrbio que não seja o pretendido, como no caso dos testes para identificar a deleção, mas que também identificam duplicações (Bales, Zalesk e McPherson 2010).

Kriek et al (2007) sugere a seguinte estratégia para fins de diagnóstico: quando um indivíduo apresenta atraso de desenvolvimento de etiologia obscura e cariótipo banda G normal, o primeiro passo usará MLPA para as regiões comumente alteradas em indivíduos com atraso de desenvolvimento, como as extremidades dos cromossomos, regiões relacionadas com a síndrome de microdeleção. Em seguida, quando MLPA é negativa e o fenótipo do indivíduo é sugestivo de uma anomalia cromossômica, CGHa é o passo seguinte. Alternativamente, a ordem dos testes pode ser invertida.

Dada a variabilidade fenotípica, há implicações clínicas e reprodutivas significativas para o indivíduo e uma abordagem multidisciplinar é necessária para tratá-los efetivamente. A composição de uma equipe familiarizada com a história natural da síndrome SD22q11 e especializada no atendimento desses indivíduos, em colaboração com a família, especialmente em centros de referência, que atendam suas múltiplas necessidades, que façam parte do processo e que

preconizem o diagnóstico precoce seria fundamental (Greenhalgh et al 2003, Ferro et al 2008, Cho et al 2009, Brandão 2010, Van Engelen et al 2010 e Tomita-Mitchell et al 2010).

Bales, Zalesk e McPherson (2010) discutiram os critérios para a adição da triagem neonatal com relação a SD22q11. Segundo esses autores, a avaliação de um cardiologista é indicada, pois a presença da deleção pode criar uma situação única, como a necessidade de adaptação da técnica cirúrgica, que também se aplica nas intervenções cirúrgicas palatinas; avaliação imunológica e exames de imagem para identificar anomalias esqueléticas também são indicadas. Avaliações para problemas de alimentação, fala e linguagem já na infância, são recomendadas para identificar indivíduos que necessitam de intervenção e a avaliação psiquiátrica é recomendada sempre que sinais são observados.

A principal vantagem da detecção precoce da SD22q11 é o reconhecimento e tratamento precoce das complicações associadas, com a possibilidade de realizar intervenções direcionadas para esses indivíduos que possam contribuir significativamente para um bom prognóstico (Bales, Zalesk e McPherson 2010). Estas intervenções incluem cirurgia para defeitos cardíacos congênitos e anomalias do palato, tratamento com imunoglobulina para os casos de imunodeficiência/auto-imunidade; transplante de timo, nos casos de ausência completa de células T; a reposição de hormônio de crescimento para defeitos da tireóide/hipófise e de cálcio para a insuficiência da paratireóide; intervenções gastroenterológicas/nutricionais para anomalias estruturais palatinas e gastrointestinais e planos educacionais para indivíduos com atraso de fala, motor, cognitivo, ou de linguagem (Cho et al 2009, Van Engelen et al 2010 e Tomita-Mitchell et al 2010).

Devido ao fato da literatura ser inconsistente, dos estudos realizados em grupos serem relativamente pequenos e considerando as consequências significativas das deleções 22q11 não detectadas, mais informações seriam necessárias para que recomendações definitivas pudessem ser feitas. Da mesma forma, seriam necessários outros estudos para esclarecer as indicações para a investigação da deleção 22q11 em indivíduos com outros sinais isolados, os quais também podem estar associados a síndrome.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Não foi possível realizar o diagnóstico precoce da SD22q11 em indivíduos com fissura de palato sem outros sinais sugestivos da síndrome;
- A amostra deve ser maior para que conclusões definitivas quanto ao diagnóstico precoce possam ser obtidas;
- Não há, até o momento, um critério adequado para a investigação de rotina da deleção 22q11 em indivíduos com anomalias palatinas;
- Fissura de lábio e palato também deve ser incluída nos estudos posteriores;
- O acompanhamento clínico de indivíduos com fissura de palato durante todo seu desenvolvimento é fundamental, pois características adicionais da síndrome poderão se apresentar com mais idade, levando a indicação de investigação da deleção 22q11;
- O cariótipo, como investigação diagnóstica inicial, é importante devido a possibilidade de encontrar alterações em outras regiões cromossômicas que apresentam um fenótipo semelhante ao da SD22q11;
- A técnica de MLPA é um método rápido, sensível, de baixo custo, em relação a outras técnicas moleculares, e uma excelente alternativa para investigação de alterações típicas e atípicas da região 22q11;

- Estabelecer o diagnóstico da SD22q11 pode ser crucial para avaliações genéticas e craniofaciais, bem como para o tratamento das complicações decorrentes da síndrome, mas indicações para análise molecular em indivíduos com fissura de palato e outros sinais clínicos da SD22q11 ainda não são claras.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- Adeyinka A, Stockero KJ, Flynn HC, Lorentz CP, Ketterling RP, Jalal SM. Familial 22q11.2 deletions in DiGeorge/velocardiofacial syndrome are predominantly smaller than the commonly observed 3 Mb. *Genet Med*. 2004; 6(6):517-20.
- Aggarwal VS, Morrow BE. Genetic modifiers of the physical malformations in velocardio-facial syndrome/Digeorge syndrome. *Dev Disabil Res Rev*. 2008; 14(1):19-25.
- Alkalay AA, Guo T, Montagna C, DigilioMC, Dallapiccola B, Marino B et al. Genetic dosage compensation in a family with velo-cardio-facial/DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet*. 2011; 155 (A):548-54.
- Alvarez CW. Fissura pré-forame incisivo uni/bilateral e fissura pós-forame incisivo associadas: estudo genético-clínico [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2010.
- Antonarakis SE. BACking up the promises. *Nat Genet*. 2001; 27(3):230-2.
- Antshel KM, Aneja A, Strunge L, Peebles J, Fremont WP, Stallone K, et al. Autistic spectrum disorders in velo-cardio facial syndrome (22q11.2 deletion). *J Autism Dev Disord*. 2007; 37(9):1776-86.
- Aquino SN, Paranaíba LMR, Martelli DRB, Swerts MSO, Barros LM, Bonan PRF, et al. Estudo de pacientes com fissura lábio-palatinas com pais consaguíneos. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011; 77(1):19-23.
- Augusseau S, Jouk S, Jalbert P, Prieur M. DiGeorge syndrome and 22q11 rearrangements. *Hum Genet*. 1996; 74(2):206.
- Baldini A. Dissecting contiguous gene defects: TBX1. *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15(3):279-84.
- Bales AM, Zaleski CA, McPherson EW. Newborn screening programs: should 22q11 deletion syndrome be added? *Genet Med*. 2010; 12(3):135-44.
- Balikova I, Menten B, de Ravel T, Le Caignec C, Thienpont B, Urbina M, et al. Subtelomeric imbalances in phenotypically normal individuals. *Hum Mutat*. 2007; 28(10):958-67.

Ballesta Martínez MJ, Guillén Navarro E, López Expósito I, Bafalliu Vidal JA, Domingo Jiménez R et al. Review of 22 patients with 22q11.2 deletion syndrome: phenotype spectrum. *An Pediatr (Barc)*. 2008; 69(4):304-10.

Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL, editors. The AGT cytogenetics laboratory manual. 3rd. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.

Barisic I, Morozin Pohovski L, Petkovic I, Cvetko Z, Stipancić G, Bagatin M. Screening of patients at risk for 22q11 deletion. *Coll Antropol*. 2008; 32(1):165-9.

Bar-Shira A, Rosner G, Rosner S, Goldstein M, Orr-Urtreger A. Array-based comparative genome hybridization in clinical genetics. *Pediatr Res*. 2006; 60(3):353-8.

Bartsch O, Nemecková M, Kocárek E, Wagner A, Puchmajerová A, Poppe M, Ounap K, Goetz P. DiGeorge/velocardiofacial syndrome: FISH studies of chromosomes 22q11 and 10p14, and clinical reports on the proximal 22q11 deletion. *Am J Med Genet A*. 2003; 117(A):1-5.

Bashir MA, Hodgkinson PD, Montgomery T, Splitt M. 22q11 deletion in children with cleft lip and palate is routine screening justified? *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008; 61(2):130-2.

Bassett AS, Chow EWC, Husted J, Hodgkinson KA, Oechslin E, Harris L, et al. Premature death in adults with 22q11.2 deletion syndrome. *J Med Genet*. 2009; 46(5):324-30.

Bassett AS, Chow EWC. Schizophrenia and 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Psychiatry Rep*. 2008; 10(2):148-57.

Bassett AS, Costain G, Fung WLA, Russell KJ, Pierce L, Kapadia R, et al. Clinically detectable copy number variations in a canadian catchment population of schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2010; 44(15):1005-9.

Bassett 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.

Baylis AL, Munson B, Moller KT. Factors affecting articulation skills in children with velocardiofacial syndrome and children with cleft palate or velopharyngeal dysfunction: a preliminary report. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008; 45(2):193-207.

- Beauchesne LM, Warnes CA, Connolly HM, Ammash NM, Grogan M, Jalal SM, et al. Prevalence and clinical manifestations of 22q11.2 microdeletion in adults with selected conotruncal anomalies. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45(4):595-8.
- Beddow RA, Smith M, Kidd A, Corbett R, Hunter AG. Diagnosis of distal 22q11.2 deletion syndrome in a patient with a teratoid/rhabdoid tumour. *Eur J Med Genet.* 2011; 54(3):295-8.
- Belangero SIN, Belluco FTS, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach MCSP, Melaragno MI. Deleção 22q11.1 em pacientes com defeito cardíaco conotruncal e fenótipo da síndrome da deleção 22q11.2. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 92(4):307-77.
- Benítez A. Genes, cognition, and language: some notes regarding velocardiofacial syndrome. *Neurologia.* 2009; 24(1):50-8.
- Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, Belmont JW, Patel MS, Hummel M, et al. 22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008; 82(1):214-21.
- Berends MJ, Tan-Sindhunata G, Leegte B, Van Essen AJ. Phenotypic variability of cat-eye syndrome. *Genet Couns.* 2001; 12(1):23-34.
- Berg JS, Potocki L, Bacino CA. Common recurrent microduplication syndromes: diagnosis and management in clinical practice. *Am J Med Genet.* 2010; 152A(5):1066-78.
- Berti L, Mittler G, Przemeck GKH, Stelzer G, Gunzler B, Amati F, et al. Isolation and characterization of a novel gene from the Digeorge chromosomal region that encodes for a mediator subunit. *Genomics.* 2001; 74(3):320-32.
- Binenbaum G, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Walker BM, Coleman K, Mach AM, et al. Sclerocornea associated with the chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2008; 146 (7):904-9.
- Bittel DC, Yu S, Newkirk H, Kibiryeva N, Holt A 3rd, Butler MG et al. Refining the 22q11.2 deletion breakpoints in DiGeorge syndrome by aCGH. *Cytogenet Genome Res.* 2009; 124(2):113-20.
- Blennow E, Lagerstedt K, Malmgren H, Sahlén S, Schoumans J, Anderlid BM. Concurrent microdeletion and duplication of 22q11.2. *Clin Genet.* 2008; 74(1):61-7.

Booij J, Van Amelsvoort T, Boot E. Co-occurrence of early-onset Parkinson disease and 22q11.2 deletion syndrome: potential role for dopamine transporter imaging. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(11):2937-8.

Borgaonkar DS. Chromosomal variation in man: a catalog of chromosomal variants and anomalies. 5th ed. New York: Alan R Liss; 1989.

Brandão GR. Fala e função velofaríngea de indivíduos com sinais da síndrome velocardiofacial: resultados do tratamento cirúrgico [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2010.

Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballín MR, et al. Microdeletion and microduplication 22q11.2 screening in 295 patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet*. 2006; 140(22A):2426-32.

Burn J, Goodship J. Congenital heart disease. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, editors. *Emery and Rimoin's: principles and practice of medical genetics*. 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1996. p.767-828.

Busse T, Graham Junior JM, Feldman G, Perin J, Catherwood A, Knowlton R, et al. High-resolution genomic arrays identify CNVs that phenocopy the chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Mut*. 2011; 32(1):91-7.

Butts SC. The facial phenotype of the velo-cardio-facial syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009; 73(3):343-50.

Caliebe A, Waltz S, Jenderny J. Mild phenotypic manifestations of terminal deletion of the long arm of chromosome 4: clinical description of a new patient. *Clin Genet*. 1997; 52:116-9.

Campbell L, McCabe K, Leadbeater K, Schall U, Loughland C, Rich D. Visual scanning of faces in 22q11.2 deletion syndrome: attention to the mouth or the eyes? *Psychiatry Res*. 2010; 177(1/2):211-5.

Carlson C, Sirotkin H, Pandita R, Goldberg R, McKie J, Wadey R, et al. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet*. 1997; 61(3):620-9.

Carmichael SL, Ma C, Shaw GM. Socioeconomic measures, orofacial clefts, and conotruncal heart defects in California. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009; 85(10):850-7.

Casteels I, Casaer P, Gewillig M, Swillen A, Devriendt K. Ocular findings in children with a microdeletion in chromosome 22q11.2. *Eur J Pediatr*. 2008; 167(7):751-5.

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

Cho EH, Park BYN, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent *in situ* hybridization. *Korean J Lab Med*. 2009; 29(1):71-6.

Choi M, Klingensmith J. Chordin is a modifier of *tbx1* for the craniofacial malformations of 22q11 deletion syndrome phenotypes in mouse. *PloS Genet*. 2009; 5(2):e1000395.

Coppinger J, McDonald-McGinn D, Zackai E, Shane K, Atkin JF, Asamoah A, et al. Identification of familial and de novo microduplications of 22q11.21-q11.23 distal to the 22q11.21 microdeletion syndrome region. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(8):1377-83.

Cormier-Daire V, Iserin L, Théophile D, Sidi D, Vervel C, Padovani JP, et al. Upper limb malformations in DiGeorge syndrome. *Am J Med Genet*. 1995; 56(1):39-41.

Cotter PD, Nguyen H, Tung G, Rauen KA. Incidence of microduplication 22q11.2 in patients referred for FISH testing for velo cardiofacial and DiGeorge syndromes. *Europ J Hum Genet*. 2005; 13(12):1245-6.

Courtens W, Schramme I, Laridon A. Microduplication 22q11.2: a benign polymorphism or a syndrome with a very large clinical variability and reduced penetrance? Report of two families. *Am J Med Genet A*. 2008; 164A(6):758-63.

Cuneo BF. 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge, velocardiofacial, and conotruncal anomaly face syndromes. *Curr Opin Pediatr*. 2001; 13(5):465-72.

Cuturilo G, Menten B, Krstic A, Drakulic D, Jovanovic I, Parezanovic V, Stevanovic M. 4q34.1-q35.2 deletion in a boy with phenotype resembling 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Pediatr*. 2011; 170(11):1465-70.

D'Antoni S, Mattina T, Di Mare P, Federico C, Motta S, Saccone S. Altered replication timing of the HIRA/Tuple1 locus in the DiGeorge and Velocardiofacial syndromes. *Gene*. 2004; (333):111-9.

D'Antonio LL, Scherer NJ, Miller LL, Kalbfleisch JH, Bartley JA. Analysis of speech characteristics in children with velocardiofacial syndrome (VCFS) and children with phenotypic overlap without VCFS. *Cleft Palate Craniofac J*. 2001; 38(5):455-67.

Dalben GS, Richieri-Costa A, Taveira LAA. Craniofacial morphology in patients with velocardiofacial syndrome. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010; 47(3):241-6.

Dave BJ, Sanger WG. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Semin Pediatr Neurol*. 2007; 14(1):2-6.

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.

De La Rochebrochard C, Joly-Hélas G, Goldenberg A, Durand I, Laquerrière A, Ickowicz V, et al. The intrafamilial variability of the 22q11.2 microduplication encompasses a spectrum from minor cognitive deficits to severe congenital anomalies. *Am J Med Genet*. 2006; 140A:1608-13.

De Smedt B, Swillen A, Verschaffel L, Ghesquière P. Mathematical learning disabilities in children with 22q11.2 deletion syndrome: a review. *Dev Disabil Res Rev*. 2009; 15(1):4-10.

Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygili A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet*. 2003; 116A(2):129-35.

Descartes M, Keppler-Noreuil K, Knops J, Longshore JW, Finley WH, Carroll AJ. Terminal deletion of the long arm of chromosome 4 in a mother and two sons. *Clin Genet*. 1996; 50:538-40.

Devriendt K, Matthijs G, Van Dael R, Gewillig M, Eyskens B, Hjalgrim H, et al. Delineation of the critical deletion region for congenital heart defects, on chromosome 8p23.1. *Am J Hum Genet*. 1999; 64(4):1119-26.

Devriendt K, Swillen A, Fryns JP. Deletion in chromosome region 22q11 in a child with CHARGE association. *Clin Genet*. 1998; 53(5):408-10.

DiGeorge A, Lischner HW, Dacou C, Arey JB. Absence of the thymus. *Lancet*. 1967; 1(7504):1387.

- DiGeorge A. Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: concurrence with congenital hypoparathyroidism. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1968; 4(1):116-21.
- Digilio MC, Angioni A, De Santis M, Lombardo A, Giannotti A, Dallapiccola B, et al. Spectrum of clinical variability in familial deletion 22q11.2: from full manifestation to extremely mild clinical anomalies. *Clin Genet.* 2003; 63(4):308-13.
- Digilio MC, McDonald-McGinn DM, Heike C, Catania C, Dallapiccola B, Marino B, et al. Three patients with oculo-auriculo vertebral spectrum and microdeletion 22q11.2. *Am J Med Genet.* 2009; 149A(12):2860-4.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(3):167-78.
- Draaken M, Reutter H, Schramm C, Bartels E, Boemers TM, Ebert AK, et al. Microduplications at 22q11.21 are associated with non-syndromic classic bladder exstrophy. *Eur J Med Genet.* 2010; 53(2):55-60.
- Driscoll D, Randall P, McDonald-McGinn D. Are 22q11 chromosomal deletions a major cause of isolated cleft palate? In: 55th Annual Meeting of the American Cleft Palate–Craniofacial Association; 1995 April 24-29; Tampa, Flórida: Tampa: American Cleft Palate–Craniofacial Association; 1995. (Abstract 110).
- Driscoll DA, Boland T, Emanuel BS, Kirschner RE, La Rossa D, Manson J, et al. Evaluation of potential modifiers of the palatal phenotype in the 22q11.2 deletion syndrome. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006; 43(4):435-41.
- Driscoll DA, Budarf ML, Emanuel BS. A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletion of 22q11. *Am J Hum Genet.* 1992; 50(5):924-33.
- Driscoll DA, Salvin J, Sellinger B, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, et al. Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet.* 1993; 30(10):813-7.
- Driscoll DA, Spinner NB, Budarf ML, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Goldberg RB, et al. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet.* 1992; 44(2):261-8.

- Dundar M, Kiraz A, Tasdemir S, Akalin H, Hafo F, Kurtoglu S, et al. Unbalanced 3;22 translocation with 22q11 and 3p deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010; 152(11):2791-5.
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, et al. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(7):1157-67.
- Eijk-Van Os PGC, Schouten JP. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol Biol*. 2011; 688:97-126.
- Emanuel BS. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev*. 2008; 14(1):11-8.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, et al. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet*. 2003; 73(5):1027-40.
- Faed MJ, Robertson J, Beck JS, Cater JI, Bose B, Madlom MM. Features of Di George syndrome in a child with 45,XX,-3,-22,+der(3),t(3;22)(p25;q11). *J Med Genet*. 1987; 24(4):225-7.
- Faivre L, Masurel-Paulet A, Callier P, Mejean N, Gay S, Grimaldi M, et al. Vertebral defects as an unusual mode of presentation of 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet*. 2009; 149(A):2865-6.
- Farah SB. Métodos de análise dos ácidos nucléicos. In: Farah SB. *DNA segredos e mistérios*. 2a. ed. São Paulo: Sarvier; 2007.
- Fénelon K, Mukai J, Xu B, Hsu PK, Drew LJ, Karayiorgou M, et al. Deficiency of Dgcr8, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108(11):4447-52.
- Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, et al. Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet*. 2005a; 68(4):373-8.
- Fernández L, Lapunzina P, Pajares IL, Criado GR, García-Guereta L, Perez J, et al. Higher frequency of uncommon 1.5-2Mb deletions found in familial cases of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005b; 136(1):71-5.

Fernández L, Lapunzina P, Pajares IL, Palomares M, Martínez I, Fernández B, et al. Unrelated chromosomal anomalies found in patients with suspected 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet.* 2008; 146 (A):1134-41.

Fernández L, Nevado J, Santos F, Heine-Suñer D, Martinez-Glez V, García-Miñaur, S, et al. A deletion and a duplication in distal 22q11.2 deletion syndrome region. Clinical implications and review. *BMC Med Genet.* 2009; 10:48.

Ferro MR, Abramides DVM, Veronez FS, Tavano LD, Souza SRB, De-Vitto LPM, et al. Habilidades sociais em pacientes com síndrome velocardiofacial. *Arq Ciênc Saúde.* 2008; 15(4):157-62.

Finkelstein Y, Zohar Y, Nachmani A, Talmi YP, Lerner MA, Hauben DJ, et al. The otolaryngologist and the patient with velocardiofacial syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; 119(5):563-6.

Flint J, Wilkie AO, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet.* 1995; 9(2):132-40.

Fomin ABF, Pastorino AC, Kim CA, Pereira AC, Carneiro-Sampaio M, Jacob CMA. DiGeorge syndrome: a not so rare disease. *Clinics.* 2010; 65(9):865-9.

Fomin ABF. Avaliação da função tímica em pacientes com síndrome de DiGeorge [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Forrester S, Kovach MJ, Smith RE, Rimer L, Wesson M, Kimonis VE. Kousseff syndrome caused by deletion of chromosome 22q11-13. *Am J Med Genet.* 2002; 112(4):338-42.

Francke U. Digitized and differentially shaded human chromosome ideograms for genomic applications. *Cytogenet Cell Genet.* 1994; 65(3):206-18.

Fukushiro AP. Análise perceptiva, nasométrica e aerodinâmica da fala de indivíduos submetidos à cirurgia do retalho faríngeo para correção da insuficiência velofaríngea [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2007.

Fuzza RF, Abuabara A. Sequência de Pierre Robin no recém-nascido: relato de caso. *Pediatria.* 2010; 32(3):231-5.

Genisca AE, Frias JL, Broussard CS, Honein MA, Lammer EJ, Moore CA, et al. National birth defects prevention study: orofacial clefts in the National Birth Defects Prevention Study, 1997–2004. *Am J Med Genet.* 2009; 149A(6):1149-58.

Gerdes M, Solot C, Wang PP, McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Taking advantage of early diagnosis: preschool children with the 22q11.2 deletion. *Genet Med.* 2001; 3(1):40-4.

Gerdes M, Solot C, Wang PP, Moss E, LaRossa D, Randall P, et al. Cognitive and behavior profile of preschool children with chromosome 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet.* 1999; 85(2):127-33.

Glander K, Cisneros GJ. Comparison of the craniofacial characteristics of two syndromes associated with the Pierre Robin sequence. *Cleft Palate Craniofac J.* 1992; 29 (3):210-9.

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

Goldmuntz E, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn D, Mei M, Zackai E, et al. Evaluation of potential modifiers of the cardiac phenotype in the 22q11.2 deletion syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009; 85(2):125-9.

Goldmuntz E. DiGeorge syndrome: new insights. *Clin Perinatol.* 2005; 32(4):963-78.

Gorlin RJ, Cohen Junior MM, Levin MM. Syndromes of the head and neck. 3a. ed. New York: Oxford University; 1990.

Goudy S, Law A, Sanchez G, Baldwin HS, Brown C. Tbx1 is necessary for palatal elongation and elevation. *Mechan Develop.* 2010; 127(5/6):292-300.

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

Greenhalgh KL, Aligianis IA, Bromilow G, Cox H, Hill C, Stait Y, et al. 22q11 deletion: a multisystem disorder requiring multidisciplinary input. *Arch Dis Child.* 2003; 88(6):523-4.

- Guo T, McDonald-McGinn D, Blonska A, Shanske A, Bassett AS, Chow E, et al. The international chromosome 22q11.2 consortium: genotype and cardiovascular phenotype correlations with *TBX1* in 1,022 velo-cardio-facial/DiGeorge/22q11.2 deletion syndrome patients. *Hum Mutat.* 2011b; 32(11):1278-1289.
- Guo X, Freyer L, Morrow B, Zheng D. Characterization of the past and current duplication activities in the human 22q11.2 region. *BMC Genomics.* 2011a; 12(71):1471-2164.
- Halder A, Jain M, Kabra M, Gupta N. Mosaic 22q11.2 microdeletion syndrome: diagnosis and clinical manifestations of two cases. *Mol Cytogenet.* 2008;10(1):18.
- Harada N, Visser R, Dawson A, Fukamachi M, Iwakoshi M, Okamoto N, et al. A 1-Mb critical region in six patients with 9q34.3 terminal deletion syndrome. *J Hum Genet.* 2004; 49(8):440-4.
- Hassed SJ, Hopcus-Niccum D, Zhang L, Li S, Mulvihill JJ. A new genomic duplication syndrome complementary to the velocardiofacial (22q11 deletion) syndrome. *Clin Genet.* 2004; 65(5):400-4.
- Hay BN. Deletion 22q11: spectrum of associated disorders. *Semin Pediatr Neurol.* 2007; 14(3):136-9.
- Heike CL, Starr JR, Rieder MJ, Cunningham ML, Edwards KL, Stanaway IB, et al. Single nucleotide polymorphism discovery in *TBX1* in individuals with and without 22q11.2 deletion syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010; 88(1):54-63.
- Heller J. *Catch-22*. London: Jonathan Cape; 1962.
- Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith SK, O'Donovan MC, Buckland PR. Functional analysis of polymorphisms in the promoter regions of genes on 22q11. *Hum Mutat.* 2004; 24(1):35-42.
- Hu Y, Zhu X, Yang Y, Mo X, Sheng M, Yao J, et al. Incidences of micro-deletion/duplication 22q11.2 detected by multiplex ligation-dependent probe amplification in patients with congenital cardiac disease who are scheduled for cardiac surgery. *Cardiol Young.* 2009; 19(2):179-84.
- Hultman CS, Riski JE, Cohen ST, Burstei FD, Boydston WR, Hudgins RJ, et al. Chiari malformation, cervical spine anomalies, and neurologic deficits in velocardiofacial syndrome. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 106(1):16-24.

Iascone MR, Vittorini S, Sacchelli M, Spadoni I, Simi P, Giusti S. Molecular characterization of 22q11 deletion in a three generation family with maternal transmission. *Am J Med Genet.* 2002; 108(4):319-21.

Igaki H, Nakagawa K, Aoki Y, Ohtomo K, Kukimoto I, Kanda T. Characterization of the bi-directional transcriptional control region between the human *UFD1L* and *CDC45L* genes. *Bioch Biophys Res Commun.* 2001; 283(3):569-76.

Iwakoshi M, Okamoto N, Harada N, Nakamura T, Yamamori S, Fujita H, et al. 9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children. *Am J Med Genet A.* 2004; 126A(3):278-83.

Izco FM, Zamallo EZ, Alvaredo SG, Irastorza PB. Síndrome de delección 22q11: un fenotipo en expansión. *Neurologia.* 2009; 24(1):69-71.

Jalali GR, Vorstman JAS, Errami Ab, Vijzelaar R, Biegel J, Shaikh T, et al. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Hum Mutat.* 2008; 29(3):433-40.

Jaquez M, Driscoll DA, Li M, Emanuel BS, Hernandez I, Jaquez F, et al. Unbalanced 15;22 translocation in a patient with manifestations of DiGeorge and velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet.* 1997; 70(1):6-10.

Jiang L, Duan C, Chen B, Hou Z, Chen Z, Li Y, et al. Association of 22q11 deletion with isolated congenital heart disease in three chinese ethnic groups. *Int J Cardiol.* 2005; 105(2):216-23.

Johns Hopkins University. #115470 cat eye syndrome; CES. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009d. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://www.omim.org/entry/115470>.

Johns Hopkins University. #145410 Opitz GBBB syndrome, autosomal dominant. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009c. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://www.omim.org/entry/145410>.

Johns Hopkins University. #188400 Digeorge syndrome; DGS. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009b. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://www.omim.org/entry/188400>.

Johns Hopkins University. #192430 velocardiofacial syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009a. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/192430>.

Johns Hopkins University. #610253 Kleeftstra syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009v. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/610253>.

Johns Hopkins University. %125520 Cayler cardiofacial syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009e. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/125520>.

Johns Hopkins University. %261800 Pierre Robin syndrome. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009f. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/261800>.

Johns Hopkins University. *138720 glycoprotein ib, platelet, beta polypeptide; GP1BB. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009n. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/138720>.

Johns Hopkins University. *194548 zinc finger protein 74; ZNF74. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009s. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/194548>.

Johns Hopkins University. *600237 histone cell cycle regulation defective, s. cerevisiae, homolog of, a; HIRA. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009i. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/600237>.

Johns Hopkins University. *601273 clathrin, heavy polypeptide-like 1; CLTCL1. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009p. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/601273>.

Johns Hopkins University. *601754 ubiquitin fusion degradation 1-like; UFD1L. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009g. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/601754>.

Johns Hopkins University. *602007 v-crk avian sarcoma virus ct10 oncogene homolog-like; CRKL. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009j. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/602007>.

Johns Hopkins University. *602007 v-crk avian sarcoma virus ct10 oncogene homolog-like; CRKL. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009k. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/602007>.

Johns Hopkins University. *602101 claudin 5; CLDN5. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009q. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/602101>.

Johns Hopkins University. *603465 cell division cycle 45, s. cerevisiae, homolog-like; CDC45L. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009o. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/603465>.

Johns Hopkins University. *606468 nucleolar protein family a, member 1; NOLA1. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009r. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/606468>.

Johns Hopkins University. *606810 proline dehydrogenase; PRODH. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009l. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/606810>.

Johns Hopkins University. *607372 mediator complex subunit 15; med15. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009t. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/607372>.

Johns Hopkins University. *609030 digeorge syndrome critical region gene 8; DGCR8. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009u. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/609030>.

Johns Hopkins University. *610778 guanine nucleotide-binding protein, beta-1-like; GNB1L. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009m. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/610778>.

Johns Hopkins University. MIM ID *602454 protein-tyrosine phosphatase, receptor-type, u; ptpu. In: Johns Hopkins University. OMIM: online mendelian inheritance in man [homepage in the internet]. Baltimore: Johns Hopkins University; 2009h. [update 2009; cited 2009 ago 8]. Available from: <http://omim.org/entry/602454>.

Johnson MD, Gentry LR, Rice GM, Mount DL. A case of congenitally absent left internal carotid artery: vascular malformations in 22q11.2 deletion syndrome. *Cleft Palate Craniofac J*. 2010; 47(3):314-7.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. *Genética Médica*. 2a. ed. Tradução por Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. Tradução de medical Genetics.

Jyonouchi S, McDonald-McGinn DM, Bale S, Zackai EH, Sullivan KE. CHARGE (coloboma, heart defect, atresia choanae, retarded growth and development, genital hypoplasia, ear anomalies/deafness) syndrome and chromosome 22q11.2 deletion syndrome: a comparison of immunologic and nonimmunologic phenotypic features. *Pediatrics*. 2009; 123(5):e871-7.

Kaiser-Rogers K, Rao K. Structural chromosome rearrangements. In: Gersen SL, Keagle MK, editors. *The principles of clinical cytogenetics*. 2nd. ed. Totowa: Humana Press; 2005. p.165-206.

Kamiya TY. Caracterização do espectro fenotípico de pacientes com fissuras labiopalatinas associadas a múltiplas anomalias congênitas e alterações estruturais [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2009.

Kates WR, Antshel KM, AbdulSabur N, Colgan D, Funke B, Fremont W, et al. A gender-moderated effect of a functional COMT polymorphism on prefrontal brain morphology and function in velo-cardio-facial syndrome (22q11.2 deletion syndrome). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006; 141B(3):274-80.

Kates WR, Antshel KM, Fremont WP, Shprintzen RJ, Strunge LA, Burnette CP, Higgins AM. Comparing phenotypes in patients with idiopathic autism to patients with velocardiofacial syndrome (22q11 DS) with and without autism. *Am J Med Genet*. 2007; 15;143A(22):2642-50.

Katzman PJ, Wang B, Sawhney M, Wang N. Differential detection of deletion 22q11.2 syndrome by specialty and indication. *Pediatr Dev Pathol*. 2005; 8(5):557-67.

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

Kokitsu-Nakata NM, Guion-Almeida ML, Richieri-Costa A. 22q11 deletion syndrome and limb anomalies: report on two brazilian patients. *Cleft Palate Craniofac J*. 2008; 45(5):561-6.

Kokitsu-Nakata NM. Síndromes genéticas e ambientais em distúrbios da audição [tese]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2006.

Kosaki R, Migita O, Takahashi T, Kosaki K. Two distinctive classic genetic syndromes, 22q11.2 deletion syndrome and Angelman syndrome, occurring within the same family. *Am J Med Genet A*. 2009; 149A(4):702-5.

Koshiyama DB, Rosa RFM, Zen PRG, Pereira VLB, Graziadio C, Coser 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.

Kowalczyk M, Srebniak M, Tomaszewska A. Chromosome abnormalities without phenotypic consequences. *J Appl Genet*. 2007; 48(2):157-66.

Kriek M, Knijnenburg J, White SJ, Rosenberg C, Den Dunnen JT, Van Ommen GJB, et al. Diagnosis of genetic abnormalities in developmentally delayed patients: a new strategy combining MLPA and array-CGH. *Am J Med Genet A*. 2007; 143(6):610-4.

Kummer AW. Velopharyngeal dysfunction (VPD) and resonance disorders. In: Kummer AW. *Cleft palate and craniofacial anomalies: the effects on speech and resonance*. 2nd. ed. San Diego: Singular Thomson Learning; 2008. p.45-76.

Kyburz A, Bauersfeld U, Schinzel A, Riegel M, Hug M, Tomaske M, et al. The fate of children with microdeletion 22q11.2 syndrome and congenital heart defect: clinical course and cardiac outcome. *Pediatr Cardiol*. 2008; 29:76-83.

Lafay-Cousin L, Payne E, Strother D, Chernos J, Chan M, Bernier FP. Goldenhar phenotype in a child with distal 22q11.2 deletion and intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor. *Am J Med Genet*. 2009; 149A(12):2855-9.

Lammer EJ, Chak JS, Iovannisci DM, Schultz K, Osoegawa K, Yang W, et al. Chromosomal abnormalities among children born with conotruncal cardiac defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009; 85(1):30-5.

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.

Levenson D. Should 22q11 deletion be added to newborn screening panels? *Am J Med Genet A*. 2011; 155A(1):fmvii-fmviii.

Lichtner P, König R, Hasegawa T, Van Esch H, Meitinger T, Schuffenhauer S. An HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) syndrome locus maps distal to the DiGeorge syndrome region on 10p13/14. *J Med Genet*. 2000; 37(1):33-7.

Lincoln-de-Carvalho, CR. Técnica de MLPA: uma alternativa para a investigação de rearranjos subteloméricos em indivíduos com atraso do desenvolvimento neuromotor ou deficiência mental idiopática [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2009.

Lindsay EA, Greenberg F, Shaffer LG, Shapira SK, Scambler PJ, Baldini A, et al. Submicroscopic deletions at 22q11.2: variability of the clinical picture and delineation of a commonly deleted region. *Am J Med Genet*. 1995; 56(2):191-7.

Long KR, Trofatter JA, Ramesh V, McCormick MK, Buckler AJ. Cloning and characterization of a novel human clathrin heavy chain gene (CLTCL). *Genomics*. 1996; 35(3):466-72.

Lundin J, Söderhäll C, Lundén L, Hammarsjö A, White I, Schoumans J, et al. 22q11.2 microduplication in two patients with bladder exstrophy and hearing impairment. *Eur J Med Genet*. 2010; 53(2):61-5.

Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*. 1998; 14(10):417-22.

Madan S, Madan-Khetarpal S, Park SC, Surti U, Bailey AL, McConnell J, et al. Left ventricular non-compaction on MRI in a patient with 22q11.2 distal deletion. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(5):1295-9.

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.

Marden PM, Smith DW, McDonald MJ. Congenital anomalies in the newborn infant, including minor variations: a study of 4,412 babies by surface examination for anomalies and buccal smear for sex chromatin. *J Pediatr*. 1964; 64:357-71.

Marom T, Roth Y, Goldfarb A, Cinamon U. Head and neck manifestations of 22q11.2 deletion syndromes. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011; [in print]. [DOI 10.1007/s00405-011-1745-1]

Mash JL. Management of velopharyngeal dysfunction: differential diagnosis for differential management. *J Craniofac Surg.* 2003; 14(5):612-8.

Maynard TM, Meechan DW, Dudevoir ML, Gopalakrishna D, Peters AZ, Heindel CC, et al. Mitochondrial localization and function of a subset of 22q11 deletion syndrome candidate genes. *Mol Cell Neurosci.* 2008; 39(3):439-51.

McDermid HE, Morrow BE. Genomic disorders on 22q11. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(5):1077-88.

McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Bason L, Christensen K, Lynch D, Sullivan K, et al. Autosomal dominant "Opitz" GBBB syndrome due to a 22q11.2 deletion. *Am J Med Genet.* 1995; 59(1):103-13.

McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. 22q11.2 deletion syndrome. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, editor. *GeneReviews*. [homepage in the internet]. Seattle: University of Washington NBK1523/; 2005. [updated 2011; cited 2011 sep 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>

McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, et al. Phenotype of the 22q11.1 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med.* 2001; 3(1):99-108.

McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. *Develop Disabil Res Rev.* 2008; 14(1):69-74.

McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, Gennery AR. Immunologic defects in 22q11.2 deletion syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122(2):362-7.

Meberg A, Hals J, Thaulow E. Congenital heart defects-chromosomal anomalies, syndromes and extracardiac malformations. *Acta Paediatr.* 2007; 96(8):1142-5.

Meng L, Bian Z, Torensma R, Von den Hoff JW. Biological mechanisms in palatogenesis and cleft palate. *J Dent Res.* 2009; 88(1):22-9.

Mingarelli R, Digilio MC, Mari A, Amati F, Standoli L, Giannotti A, et al. The search for hemizygosity at 22q11 in patients with isolated cleft palate. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1996; 16:118-121.

Mitelmam F, editor. *ISCN 2009: international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: Karger; 2009.

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

MRC-Holland. Salsa MLPA kit P250-B1 DiGeorge. In: MRC-Holland. MLPA website [homepage in the internet]. Holland: MRC; 2011. [update 2011; cited 2011 ago 8]. Available from: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF\E\t9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjuss|&ProductOID=0DLzOd5tLZ0>

Murphy KC, Owen MJ. Velo-cardio-facial syndrome: a model for understanding the genetics and pathogenesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry.* 2001; 179:397-402.

Naqvi N, Davidson SJ, Wong D, Cullinan P, Roughton M, Doughty VL, et al. Predicting 22q11.2 deletion syndrome: a novel method using the routine full blood count. *Int J Cardiol.* 2010; 150(1):50-3.

National Library of Medicine. Chromosome 22. In: National Library of Medicine. Genetics home reference: your guide to understanding genetic conditions. [homepage on the Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 2011. [updated 2011; cited 2011 Jan 27]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/22>

Neas KR, Smith JM, Chia N, Huseyin S, St Heaps L, Peters G, et al. Three patients with terminal deletions within the subtelomeric region of chromosome 9q. *Am J Med Genet A.* 2005; 132A(4):425-30.

Nogueira SI, Hacker AM, Bellucco FTS, Christofolini DM, Kulikowski LD, Cernach MC, et al. Atypical 22q11.2 deletion in a patient with DGS/VCFS spectrum. *Eur J Med Genet.* 2008; 51(3):226-30.

Nogueira SI, Hacker AM, Bellucco FTS, Kulikowski LD, Christofolini DM, Cernach MC, et al. Deletion 22q11.2: report of a complex meiotic mechanism of origin. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A(15):1778-81.

Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L. Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007; 161(8):753-8.

Ogilvie CM, Ahn JW, Mann K, Roberts RG, Flinter F. A novel deletion in proximal 22q associated with cardiac septal defects and microcephaly: a case report. *Mol Cytogenet.* 2009; 24(2):9.

Oh AK, Workman LA, Wong GB. Clinical correlation of chromosome 22q11.2 fluorescent in situ hybridization analysis and velocardiofacial syndrome. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007; 44(1):62-6.

Oliveira MA. Caracterização de rearranjos cromossômicos em pacientes com malformações congênitas múltiplas e/ou retardamento mental (MCA/MR) [dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2008.

Óskarsdóttir S, Persson C, Eriksson BO, Fasth A. Presenting phenotype in 100 children with the 22q11 deletion syndrome. *Eur J Pediatr*. 2005; 164(3):146-53.

Ou Z, Berg JS, Yonath H, Enciso VB, Miller DT, Picker J, et al. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet Med*. 2008; 10(4):267-77.

Paylor R, Lindsay E. Mouse models of 22q11 deletion syndrome. *Biol Psychiatry*. 2006; 59(12):1172-9.

Perkins JA, Sie K, Gray S. Presence of 22q11 deletion in postadenoidectomy velopharyngeal insufficiency. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000; 126(5):645-8.

Perne A, Zhang X, Lehmann L, Groth M, Stuber F, Book M. Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and real-time PCR accuracy for gene copy number quantification using the beta-defensin locus. *Biotechniques*. 2009; 47(6):1023-8.

Philip N, Basset A. Cognitive, behavioural and psychiatric phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Behav Genet*. 2011; 41(3):403-12.

Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998; 20(2):207-11.

Portnoï MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalan A, Biran-Mucignat V, Malan V, et al. 22q11.1 duplication syndrome: two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet A*. 2005; 137A(1):47-51.

Portnoï MF. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Europ J Med Genet*. 2009; 52(2/3):88-93.

Price TS, Regan R, Mott R, Hedman A, Honey B, Daniels RJ, et al. SW-ARRAY: a dynamic programming solution for the identification of copy-number changes in genomic DNA using array comparative genome hybridization data. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(11):3455-64.

Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, et al. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet.* 2005; 42(11):871-6.

Ravnan JB, Chen E, Golabi M, Lebo RV. Chromosome 22q11.2 microdeletions in velocardiofacial syndrome patients with widely variable manifestations. *Am J Med Genet.* 1996; 66:250-6.

Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, et al. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet.* 2006; 43(6):478-89.

Reish O, Finkelstein Y, Mesterman R, Nachmani A, Wolach B, Fejgin M, et al. Is isolated palatal anomaly an indication to screen for 22q11 region deletion? *Cleft Palate Craniofac J.* 2003; 40(2):176-9.

Repetto GM, Guzmán ML, Puga A, Calderón JF, Astete CP, Aracena M, et al. Clinical features of chromosome 22q11.2 microdeletion syndrome in 208 Chilean patients. *Clin Genet.* 2009; 76(5):465-70.

Rioja-Mazza D, Lieber E, Kamath V, Kalpatthi R. Asymmetric crying facies: a possible marker for congenital malformations. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2005; 18(4):275-7.

Robin NH, Shprintzen RJ. Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.1. *J Pediatr.* 2005; 147(1):90-6.

Rodrigues MR, Costa B, Gomide MR, Neves LT. Fissura completa bilateral: características morfológicas. *Rev Odontol UNESP.* 2005; 34(2):67-72.

Rodrigues RM. Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido [dissertação]. Bauru: Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo; 2010.

Rope AF, Cragun DL, Saal HM, Hopkin RJ. DiGeorge anomaly in the absence of chromosome 22q11.2 deletion. *J Pediatr.* 2009; 155(4):560-5.

- Rosa RFM, Mombach R, Zen PRG, Graziadio C, Paskulin GA. Características clínicas de uma amostra de pacientes com a síndrome do olho do gato. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56(4):462-6.
- Rosa RFM, Pilla CB, Pereira VL, Flores JA, Golendziner E, Koshiyama DB, et al. 22q11.2 deletion syndrome in patients admitted to a cardiac pediatric intensive care unit in Brazil. *Am J Med Genet.* 2008; 146A(13):1655-61.
- Rosa RFM, Trevisan P, Koshiyama DB, Pilla CB, Zen PR, Varella-Garcia M, et al. 22q11.2 deletion syndrome and complex congenital heart defects. *Rev Assoc Med Bras.* 2011; 57(1):62-5.
- Rosa RFM, Zen PRG, Roman T, Graziadio C, Paskulin GA. Síndrome de deleção 22q11.2: compreendendo o CATCH22. *Rev Paul Pediatr.* 2009; 27(2):211-20.
- Rouillon I, Leboulanger N, Roger G, Maulet M, Marlin S, Loundon N, et al. Velopharyngoplasty for noncleft velopharyngeal insufficiency: results in relation to 22q11 microdeletion. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 135(7):652-6.
- Ruiter EM, Bongers EMHF, Smeets DFCM, Kuijpers-Jagtman AM, Hamel BCJ. No justification of routine screening for 22q11 deletions in patients with overt cleft palate. *Clin Genet.* 2003; 64(3):216-9.
- Ruotolo RA, Veitia NA, Corbin A, McDonough J, Solob CB, McDonald-McGinn D, et al. Velopharyngeal anatomy in 22q.11 deletion syndrome: a three dimension cephalometric analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006; 43(4):446-56.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, Philip N, Levy A, Seidel H, et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet.* 1997; 34(10):798-804.
- Sandrin-Garcia P, Abramides DV, Martelli LR, Ramos ES, Richieri-Costa A, Passos GA. Typical phenotypic spectrum of velocardiofacial syndrome occurs independently of deletion size in chromosome 22q11.2. *Mol Cell Biochem.* 2007; 303(1-2):9-17.
- São Paulo (cidade). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenação de Epidemiologia e Informação – CEInfo. Declaração de nascido vivo: Campo 34 - manual de Anomalias Congênitas. São Paulo: Secretaria Municipal da Saúde; 2008. 50p.
- Saugier-Veber P, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, de La Rochebrochard C, Layet V, Drouot N, et al. Simple detection of genomic microdeletions and microduplications using QMPSF in patients with idiopathic mental retardation. *Europ J Hum Genet.* 2006; 14(9):1009-17.

Scambler PJ, Kelly D, Lindsay E, Williamson R, Goldberg R, Shprintzen R, et al. Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing de DiGeorge locus. *Lancet*. 1992; 339(8802):1138-9.

Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Palmieri A, Masiero E, Pezzeti F, et al. Genes causing clefting for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: a family based association study. *Eur J Oral Sci*. 2008; 116(4):507-11.

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

Schwinger E, Devriendt K, Rauch A, Philip N. Clinical utility gene card for: DiGeorge syndrome, velocardiofacial syndrome, Shprintzen syndrome, chromosome 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2, TBX1). *Eur J Hum Genet*. 2010; 18(9).

Sedláčková E. Velopharyngeal insufficiency as developmental disturbance. *Čas Lék Čes*. 1955; 94(47/48):1304-7.

Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update*. 2004; 10(3):221-6.

Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(4):489-501.

Shaikh TH, O'Connor RJ, Pierpont ME, McGrath J, Hacker AM, Nimmakayalu M, et al. Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res*. 2007; 17(4):482-491.

Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, et al. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet*. 2008; 146A(17):2242-51.

Shapiro BL, Meskin LH, Cervenka J, Pruzansky S. Cleft uvula: a microform of facial clefts and its genetic basis. *Birth Defects Orig Artc Ser*. 1971; 7(7):80-2.

Shashi V, Howard TD, Keshavan MS, Kaczorowski J, Berry MN, Schoch K, et al. COMT and anxiety and cognition in children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Psychiatry Res*. 2010; 178(2):433-6.

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.

Shi M, Wehby GL, Murray JC. Review on genetic variants and maternal smoking in the etiology of oral clefts and other birth defects. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008; 84(1):16-29.

Shimajima K, Imai K, Yamamoto T. A de novo 22q11.22q11.23 interchromosomal tandem duplication in a boy with developmental delay, hyperactivity, and epilepsy. *Am J Med Genet A*. 2010; 152A(11):2820-6.

Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*. 2008; 13(17/18):760-70.

Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N. Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 304(1):184-90.

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

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

Shprintzen RJ, Golding-Kushner KJ. *Velo-cardio-facial syndrome*. San Diego: Plural; 2008.

Shprintzen RJ, Higgins AM, Antshel K, Fremont W, Roizen N, Kates W. Velo-cardio-facial-syndrome. *Curr Opin Pediatr*. 2005; 17(6):725-30.

Shprintzen RJ, Siegel-Sadewitz VL, Amato J, Goldberg RB. Retrospective diagnoses of previously missed syndromic disorders among 1000 patients with cleft lip, cleft palate, or both. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1985; 21:85-92.

Shprintzen RJ. Pierre Robin, micrognathia and airway obstruction: the dependency of treatment on accurate diagnosis. *Int Anesthesiol Clin*. 1988; 26(1):64-71.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome. In: Cassidy SB, Allanson J, editors. *Management of genetic syndromes*. New York: Wiley; 2005. p.495-517.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 years of study. *Develop Disabil Res Rev.* 2008; 14(1):3-10.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: a distinctive behavioral phenotype. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2000; 6(2):142-7.

Silva-Filho OG, Freitas JAS. Caracterização morfológica e origem embriológica. In: Trindade IEK, Silva-Filho OG, coordenadores. *Fissuras labiopalatinas: uma abordagem interdisciplinar.* São Paulo: Editora Santos; 2007. p.17-49.

Simioni M. Investigação da região 22q11.2 em defeitos de linha média facial com hipertelorismo [dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas; 2008.

Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, Puech A, Gupta RD, Patanjali SR, et al. Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics.* 1997; (42):245-51.

Sivertsen A, Lie RT, Wilcox AJ, Abyholm F, Vindens H, Haukanes BI, et al. Prevalence of duplications and deletions of the 22q11 DiGeorge syndrome region in a population-based sample of infants with cleft palate. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A(2):129-34.

Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet.* 2001; 29(3):263-4.

Sorensen KM, Agergaard P, Olesen C, Andersen PS, Larsen LA, Ostergaard JR, et al. Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. *J Molecular Diagnost.* 2010; 12(2):147-5.

Sorensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AO. Multiplex ligation-dependent probe amplification technique for copy number analysis on small amounts of DNA material. *Anal Chem.* 2008; 80(23):9363-8.

Spina V, Psillakis JM, Lapa FS, Ferreira MC. Classificação das fissuras lábio-palatinas: sugestão de modificação. *Rev Hosp Clin Fac Med S. Paulo.* 1972; 27(1):5-6.

- Stachon AC, Baskin B, Smith AC, Shugar A, Cytrynbaum C, Fishman L, et al. Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A(24):2924-30.
- Stewart DR, Huang A, Faravelli F, Anderlid BM, Medne L, Cipraro K, et al. Subtelomeric deletions of chromosome 9q: a novel microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004; 128A(4):340-51.
- Strong WB. Familial syndrome of right-sided aortic arch, mental deficiency, and facial dysmorphism. *J Pediatr*. 1968; 73(6):882-8.
- Swillen A, Devriendt K, Legius E, Prinzie P, Vogels A, Ghesquiere P, et al. The behavioural phenotype in velo-cardio-facial syndrome (VCFS): from infancy to adolescence. *Genet Couns*. 1999; 10(1):79-88.
- Swillen A, Devriendt K, Vantrappen G, Voegels A, Rommel N, Fryns JP, et al. Familial deletions of chromosome 22q11: the Leuven experience. *Am J Med Genet*. 1998; 80(5):531-2.
- Swillen A, Vogels A, Devriendt K, Fryns JP. Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet*. 2000; 97(2):128-35.
- Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z, Gordon CT, et al. Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *Am J Med Genet*. 2011; 155A(7):1623-33.
- Tan TY, Gordon CT, Amor DJ, Farlie PG. Developmental perspectives on copy number abnormalities of the 22q11.2 region. *Clin Genet*. 2010; 78(3):201-18.
- Tao L, Qing L, Yi-Xin W, Dong Y, Yi X, Zhen F, et al. Use of amniocytes for prenatal diagnosis of 22q11.2 microdeletion syndrome: a feasibility study. *Chin Med J*. 2010; 123(4):438-42.
- Thomas JA, Graham Junior JM. Chromosome 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr*. 1997; 36(5):253-66.
- Tomita-Mitchell A, Mahnke DK, Larson JM, Ghanta S, Feng Y, Simpson PM, et al. Multiplexed quantitative real-time PCR to detect 22q11.2 deletion in patients with congenital heart disease. *Physiol Genomics*. 2010; 42A(1):52-60.

- Trindade IEK, Genaro KF, Yamashita RP, Miguel HC, Fukushima AP. Proposta de classificação da função velofaríngea na avaliação perceptivo-auditiva da fala. *Pró-Fono*. 2005; 17(2):259-62.
- Tsai CH, Van Dyke DL, Feldman GL. Child with velocardiofacial syndrome and del(4)(q34.2): another critical region associated with a velocardiofacial syndrome-like phenotype. *Am J Med Genet*. 1999; 82(4):336-9.
- Umlauf MG. 22q11 deletion syndrome: is that what they used to call ...? *Perspect Psychiat Care*. 2008; 44(4):259-66.
- Van Den Elzen AP, Semmekrot BA, Bongers EM, Huygen PL, Marres HA. Diagnosis and treatment of the Pierre Robin sequence: results of a retrospective clinical study and review of the literature. *Eur J Pediatr*. 2001; 160(1):47-53.
- Van Eijk R, Eilers PHC, Natté R, Cleton-Jansen AM, Morreau H, Van Wezel T, et al. MLPAinter for MLPA interpretation: an integrated approach for the analysis, visualisation and data management of multiplex ligation-dependent probe amplification. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11:67.
- Van Engelen K, Topf A, Keavney BD, Goodship JA, Van der Velde ET, Baars MJH, et al. 22q11.2 deletion syndrome is under-recognised in adult patients with tetralogy of Fallot and pulmonary atresia. *Heart*. 2010; 96(8):621-4.
- Vantrappen G, Rommel N, Devriendt K, Cremers CW, Feenstra L, Fryns JP. Clinical features in 130 patients with the velo-cardio-facial syndrome: the Leuven experience. *Acta Otorhinolaryngol Bel*. 2001; 55(1):43-8.
- Veerapandiyan A, Abdul-Rahman OA, Adam MP, Lyons MJ, Manning M, Coleman K, et al. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome in African-American patients: a diagnostic challenge. *Am J Med Genet*. 2011; 155A(9):2186-95.
- Verhoeven W, Egger J, Brunner H, de Leeuw N. A patient with a de novo distal 22q11.2 microdeletion and anxiety disorder. *Am J Med Genet A*. 2011; 155A:392-7.
- Verma RS, Babu A. Human chromosomes-principles and techniques. 2nd. ed. New York: McGraw-Hill; 1995.
- Vianna-Morgante AM. FISH no estudo dos cromossomos humanos. In: Guerra M, organizador. FISH: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 2004. p.133-48.

Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005; 1(6):e64.

Villanueva MP, Aiyer AR, Muller S, Pletcher MT, Liu X, Emanuel B, et al. Genetic and comparative mapping of genes dysregulated in mouse hearts lacking the hand2 transcription factor gene. *Genomics.* 2002; 80(6):593-60.

Vissers LE, De Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(6):1261-70.

Vogel F, Motulsky AG. *Genética humana: problemas e abordagens.* 3a. e. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.

Vortsman JA, 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.

Wang N. Methodologies in cancer cytogenetics and molecular cytogenetics. *Am J Med Genet.* 2000; 115(3):118-24.

Wentzel C, Fernstrom M, Ohrner Y, Anneren G, Thuresson AC. Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. *Eur J Med Genet.* 2008; 51(6):501-10.

Wilson DI, Britton SB, Mc Keown C, Kelly D, Cross IE, Strobel S, et al. Noonan's and DiGeorge syndromes with monosomy 22q11. *Arch Dis Child.* 1993b; 68(2):187-9.

Wilson DI, Goodship JA, Burn J, Cross IE, Scambler PJ. Deletions with in chromosome 22q11 in familial congenital heart disease. *Lancet.* 1992; 340(8819):573-5.

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

Wozniak A, Wolnik-Brzozowska D, Wisniewska M, Glazar R, Materna-Kiryluk A, Moszura T, et al. Frequency of 22q11.2 microdeletion in children with congenital heart defects in western poland. *BMC Pediatr.* 2010; 10:88.

Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003; 362(25):1366-73.

Yamagishi H, Maeda J, Tokumura M, Yoshiba S, Takahashi E, Fukushima H, et al. Ventricular septal defect associated with microdeletions of chromosome 22q11.2. *Clin Genet*. 2000; 58(6):493-6.

Yang YH, Hu YL, Zhu XY, Mo XM, Wang DJ, Yao JC, et al. Diagnosis of 22q11 deletion and duplication in congenital heart disease by multiplex ligation dependent probe amplification. *Chin J Contemp Pediatr*. 2009; 11(11):892-6.

Yatsenko SA, Yatsenko AN, Szigeti K, Craigen WJ, Stankiewicz P, Cheung SW, et al. Interstitial deletion of 10p and atrial septal defect in DiGeorge 2 syndrome. *Clin Genet*. 2004; 66(2):128-36.

Yeshaya J, Amir I, Rimon A, Freedman J, Shohat, Avivi L. Microdeletion syndromes disclose replication timing alterations of genes unrelated to the missing DNA. *Mol Cytogenet*. 2009; 2:11.

Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, Firth HV, Harrison K, MacKenzie J, et al. Microduplication and triplication of 22q11.2: A highly variable syndrome. *Am J Hum Genet*. 2005; 76(5):865-76.

Yu S, Cox K, Friend K, Smith S, Buchheim R, Bain S, et al. Familial 22q11.2 duplication: a three-generation family with a 3-Mb duplication and a familial 1.5-Mb duplication. *Clin Genet*. 2008; 73(2):160-4.

Yu S, Graf WD, Ramalingam A, Brawner SJ, Joyce JM, Fiedler S, et al. Identification of copy number variants on human chromosome 22 in patients with a variety of clinical findings. *Cytogenet Genome Res*. 2011; 134(4):260-8.

Zackai EH, Emanuel BS. Site-specific reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11), in several unrelated families with 3:1 meiotic disjunction. *Am J Med Genet*. 1980; 7(4):507-21.

Zechi RM. Estudo genético-clínico em pacientes portadores de sequência de Pierre Robin [dissertação]. Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 1998.

Zemble R, Luning Prak E, McDonald K, McDonald-McGinn D, Zackai E, Sullivan K. Secondary immunologic consequences in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Clin. Immunol*. 2010; 136(3):409-18.

Ziolkowska L, Kawalec W, Turska-Kmiec A, Krajewska-Walasek M, Brzezinska-Rajszys G, Daszkowska J, et al. 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.

Zori RT, Boyar FZ, Williams WN, Gray BA, Bent-Williams A, Stalker HJ, et al. Prevalence of 22q11 region deletions in patients with velopharyngeal insufficiency. *Am J Med Genet.* 1998; 77(1):8-11.

Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagul I, Campbell CE., Rauch A. Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet.* 2007; 80(3):510-7.

ANEXOS

ANEXO 1 – Ofício de Aprovação do Comitê de Ética

HOSPITAL DE REABILITAÇÃO
DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão
Seção de Apoio à Pesquisa

Ofício nº 321/2011-SVAPEPE-CEP

Bauru, 26 de outubro de 2011

Prezado(a) Senhor(a)

O projeto de pesquisa intitulado **"Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato ou insuficiência velofaríngea"**, de autoria de V.Sa., foi aprovado pelo CEP em 24 de novembro de 2009. Na reunião realizada em **25 de outubro de 2011**, as alterações solicitadas e a solicitação de alteração do título para **"Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato"** foram **aprovadas**.

Informamos que após o recebimento do trabalho concluído, este Comitê enviará um parecer final que poderá ser utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

PROFA. DRA. MARCIA RIBEIRO GOMIDE

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HRAC-USP

Ilmo(a) Sr(a)

ROSANA MARIA CANDIDO DE SOUZA SANDRI

A/C

Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo

Laboratório de Citogenética – HRAC/USP

Rua Silvio Marchione, 3-20 Bauru SP Brasil
Caixa Postal 1501 CEP 17.012-900
Tel. 55 14 3235 8421
E-mail: cep@centrinho.usp.br

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____, responsável pelo menor * _____, após leitura minuciosa deste documento, devidamente explicado pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa: **“Investigação de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato”**, realizada por Rosana Maria Candido de Souza Sandri (CRBio 31679/01-D) sob a orientação da Dra. Lucilene Arilho Ribeiro Bicudo (CRBM 4400).

Este estudo tem como objetivo estudar a região cromossômica 22q11 em indivíduos com fissura de palato a fim de ampliar o conhecimento sobre as causas dessa anomalia e possibilidade de diagnóstico precoce. Os procedimentos que serão utilizados incluem: consulta de rotina no Setor de Genética Clínica do HRAC-USP onde será realizada entrevista com o indivíduo ou seu(s) responsável(is) para se obter informações sobre seus antecedentes, sua história familiar ou detalhes da anomalia, realização de fotografias e coleta de sangue (5ml) do indivíduo. A coleta de sangue pode causar desconforto físico e existe uma chance de ocorrer uma mancha roxa (hematoma) na região da coleta. Cada indivíduo participante deste estudo será incluído somente com sua permissão (ou de seus responsáveis), após serem informados dos objetivos (acima citados).

Informamos que, de modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo. Porém, essa investigação poderá contribuir para uma melhor orientação genética às famílias e direcionamento do tratamento nos indivíduos com resultado positivo. Os resultados dos exames estarão disponíveis no prontuário do indivíduo participante e serão fornecidos ao indivíduo ou seu(s) responsável(is), em consulta previamente agendada na Seção de Genética Clínica do HRAC-USP/Bauru, durante as vindas de rotina ao Hospital. Os resultados desta pesquisa poderão ser divulgados, para fins científicos, em revistas e em eventos especializados na área, incluindo o uso de imagens, desde que a identidade do indivíduo seja preservada.

Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HRAC-USP, pelo endereço Rua Silvio Marchione, 3-20, no Serviço de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão ou pelo telefone (14) 3235-8421.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 20 do Código de Ética Profissional do Biólogo).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa/Responsável

Assinatura do Pesquisador Responsável

* A SER PREENCHIDO, SE O SUJEITO DA PESQUISA NÃO FOR O PACIENTE

Pesquisador Responsável (HRAC-USP): Rosana Maria Candido de Souza Sandri.

Endereço do Pesquisador Responsável: Av. Carlos Alberto Repke, 546 – Agudos/SP CEP17120-000

Telefone: (14) 3261 1250 E-mail: rsandri@centrinho.usp.br

Endereço Institucional: Rua Silvio Marchione, 3-20 – Bauru/SP - CEP 17043-900

Fone: (14) 3235 8412.

ANEXO 3 – Anomalias congênitas descritas em indivíduos com deleção 22q11

Achados Craniofaciais/Orais	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fissura palatina evidente, fissura palatina submucosa ou submucosa oculta 2. Retrognatia (retroposição da mandíbula) 3. Platibasia (base de crânio plana) 4. Fácies típico assimétrico em lactentes 5. Assimetria estrutural da face 6. Assimetria funcional da face 7. Excesso vertical maxilar (face longa) 8. Perfil facial retificado 9. Agenesia de dentes (um ou vários) 10. Dentes pequenos 11. Hipoplasia de esmalte (dentição decídua) 12. Fácies hipotônico, flácido 13. Inclinação inferior da comissura labial 14. Fissura labial (raro) 15. Microcefalia 16. Fossa craniana posterior pequena
Achados oftalmológicos	<ol style="list-style-type: none"> 17. Vasos retinianos tortuosos 18. Congestão da região suborbital, semelhante à reação alérgica 19. Estrabismo 20. Fendas palpebrais estreitas 21. Embriotoxon posterior 22. Disco óptico pequeno 23. Nervos córneos proeminentes 24. Catarata 25. Nódulos de íris 26. Coloboma de íris (raro) 27. Coloboma de Retina (raro) 28. Olhos pequenos 29. Hipertelorismo orbital moderado 30. Distopia orbital vertical moderada 31. Pálpebras superiores inchadas (hooding-encapuzamento)
Achados nasais	<ol style="list-style-type: none"> 41. Ponte nasal alta 43. “Ponta” nasal bulbosa/larga 44. Domos nasais ligeiramente separados (“ponta” nasal parece bífida) 45. Hipoplasia de asa nasal, narinas estreitas 46. Cavidade nasal estreita

continua

continuação

Achados cardíacos	47. Defeito no septo ventricular 48. Defeito no septo atrial 49. Atresia pulmonar ou estenose 50. Tetralogia de Fallot 51. Concavidade aórtica à direita (crossa aórtica para direita) 52. Tronco arterial 53. PDA (Persistência do Ducto Arterial) 55. Coarctação da aorta 56. Anomalias de válvula aórtica 57. Artérias subclávia aberrantes 58. Anel vascular 59. Origem anômala da artéria carótida 60. Transposição dos grandes vasos 61. Atresia da válvula tricúspide
Anomalias vasculares	62. Artéria carótida interna deslocada medialmente 63. Ectopia da carótida interna 64. Anomalia da veia jugular 65. Ausência de artéria carótida interna (unilateral) 66. Ausência de artéria vertebral (unilateral) 67. Baixa bifurcação de carótida comum 68. Artérias vertebrais tortuosas ou atípica 69. Fenômeno de Reynaud 70. Veias pequenas 71. Anomalia do Círculo de Willis
Características Neurológicas, Cerebrais, e achados de Ressonância Magnética	72. Volume de cérebro total reduzido 73. Cisto Periventricular (principalmente nos sulcos anteriores) 74. Vermis cerebelar pequeno 75. Hipoplasia/disgenesia cerebelar 76. Alterações na Substância Branca 77. Hipotonia generalizada 78. Ataxia Cerebelar 79. Ataques apopléticos 80. Acidente Vascular Cerebral (AVC) 81. Espinha bífida/meningomielocoele 82. Atraso no desenvolvimento moderada 83. Fissura de Silvius aumentada 84. Cavum septum pellucidum 85. Variações em tamanho de vários segmentos de cérebro

continua

continuação

Características Faríngea/Laríngea/Vias Aéreas	86. Obstrução da via aérea superior na infância 87. Tecidos linfóides ausentes ou pequenos 88. Membrana laríngea (anterior) 89. Via aérea faríngea grande 90. Laringomalacia 91. Hiperplasia de Aritenoide 92. Hipotonia faríngea 93. Movimento faríngeo assimétrico 94. Músculo faríngeo hipotônico 95. Paresia de prega vocal unilateral 96. Doença reacional das vias aéreas 97. Asma 98. Faringe estruturalmente assimétrica 99. Laringe estruturalmente assimétrica
Abdômen/Rim/Intestinos	100. Hipoplasia ou Aplasia Renal 101. Rins císticos 102. Hérnias Inguinais 103. Hérnias umbilicais 104. Má rotação de intestino 105. Diástase Retal 106. Hérnia Diafragmática
Membros	106. Mãos e pés pequenos 107. Dedos longos e finos 108. Unhas curtas 109. Pele vermelha, escamosa em mãos e pés 110. Morféia 111. Contraturas (incomum) 112. Polegares com três falanges (incomum) 110. Polidactilia (incomum) 113. Sindactilia de tecido mole (incomum)
Problemas em Infância	114. Dificuldades alimentares 115. Refluxo nasal 116. Refluxo Gastroesofágico 117. Irritabilidade 118. Constipação crônica
Genitourinário	119. Hipospadias 120. Criptorquidia 121. Refluxo Vesico-ureteral 122. Hidrocele

continua

continuação

Fala e Linguagem	123. Hipernasalidade severa 124. Distúrbio Articulatorio Compensatório (com predomínio de golpe de glote) 125. Distúrbio de linguagem (atraso na aquisição) 126. Insuficiência Velofaríngea (normalmente severo) 127. <i>Pitch</i> agudo 128. Rouquidão
Características Cognitivas / Aprendizagem	129. Dificuldades de Aprendizagem (conceitos matemáticos, leitura, compreensão) 130. Pensamento concreto, dificuldade de abstração 131. Déficit nos scores de Q.I. durante aprendizagem escolar 132. Q.I. normal ou borderline 133. Deficiência mental moderada 134. Déficit de Atenção e Hiperatividade
Anomalias diversas	135. Dessaturação de oxigênio espontâneo sem apnéia 136. Trombocitopenia 137. Doença de Bernard-Soulier 138. Artrite reumatóide juvenil 139. Regulação da temperatura corporal deficitária 140. Instabilidade de Vaso-motor
Características psiquiátricas e psicológicas	136. Desordem afetiva bipolar 137. Desordem maníaca depressiva e psicose 138. Labilidade de humor, com variações muito rápidas de humor 139. Desordem de humor 140. Depressão 141. Hipomania 142. Desordem Esquizoafetiva 143. Esquizofrenia 144. Impulsividade 145. Reação afetiva pobre 146. Distímia 147. Ciclotímia 148. Imaturidade social 149. Desordem compulsiva obsessiva 150. Desordem de ansiedade generalizada 151. Fobias 152. Reflexo de Startle exacerbado 153. Desordem de espectro de autismo 154. Desordem esquizoafetiva

continua

continuação

Imunológico	155. Infecções respiratórias superiores freqüentes 156. Pneumonia, bronquite frequentes 157. Redução do número de células T 158. Hormônio do timo reduzido
Endócrino	159. Hipocalcemia 160. Hipoparatiroidismo 161. Hipotireoidismo 162. Deficiência de crescimento, estatura pequena relativa 163. Timo ausente ou hipoplásico 164. Glândula pituitária pequena (raro) 165. Tiroidite auto-imune
Esqueleto/Músculos/Ortopedia	166. Escoliose 167. Espinha bífida oculta 168. Hemivertebra 169. Vértex de borboleta 170. Vértex fundidas (normalmente cervical) 171. Osteopenia 172. Anomalia de Sprengel, deformação escapular 173. Equinovaro de Talipes (pés e tornozelos equinovaros) 174. Músculos do esqueleto pequenos 175. Deslocações em comum 176. Dores nas pernas crônicas 177. Arcos dos pés planos 178. Articulações hiperextensíveis 179. Fusão de costelas 180. Costelas extras 181. Siringe/Fístula (cavidade patológica no cérebro ou na medula espinhal) 182. Anomalias vertebrais
Pele/Tegumento	183. Cabelos abundantes 184. Pele fina (padrões venosos facilmente visíveis)
Sequências/Associações secundárias à SVCF	185. Sequência de Robin 186. Sequência de DiGeorge 187. Sequência de Potter 188. Associação de Charge 189. Holoprosencefalia

Fonte: Velo-Cardio-Facial Syndrome Educational Foundation, Inc. Milltown, New Jersey, USA. Available: [cited in Apr 13 2011] http://www.vcfsef.org/pdf/VCFS_Factsheet_07.pdf

ANEXO 4 – Ficha da genética clínica**GENÉTICA CLÍNICA**

RG nº

						-		
--	--	--	--	--	--	---	--	--

Dados gerais:

Idade materna na concepção:

Idade paterna na concepção:

Intercorrências gestacionais/perinatais:

Heredograma:

Dados Clínicos:

H.D.:

Conduta:

____/____/____

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Artigo enviado para publicação

[HOME](#)

[LOGOUT](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	11-272
Current Revision #	0
Submission Date	2011-10-31
Current Stage	Initial QC Started
Title	22q11 deletion/duplication screening in Brazilian babies aged 0 - 2 years old with cleft palate.
Running Title	22q11 deletion/duplication screening in cleft palate
Manuscript Type	Original Article
Corresponding Author	Lucilene Ribeiro-Bicudo (Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais)
Contributing Authors	Rosana Sandri , Roseli Zechi-Ceide , Antonio Richieri-Costa
Financial Disclosure	I have no relevant financial interests in this manuscript.
Abstract + Keywords	<p>Objective: To screen a sample of 55 children aged 0 - 2 years who presented overt or sub mucous cleft palate for 22q11deletion in sense to ascertain the prevalence of this anomaly in this group.</p> <p>Design: Patients were referred due to present palatal clefting. The sample included 46 patients with no associated anomalies and 9 individuals with congenital heart defect and/or developmental delay. Peripheral blood samples from all patients were analyzed for 22q11 region utilizing MLPA.</p> <p>Results: Fifty-five patients aged 0 to 2 years were included in the study. Fifty-three had CPO, and 2 had a submucous CP. No deletion/duplication was detected in any of the evaluated patients.</p> <p>Conclusions: We concluded that neither del22q11 nor dup22q11 testing is warranted in babies diagnosed as having palatal anomalies as main finding. Based on the relative small size of this study, and the inconsistency of the current literature, further studies are needed to clarify the indication for deletion/duplication screening in patients with palatal anomalies.</p> <p>Key Words: 22q11, deletion, cleft palate, MLPA</p>
Section Editor	Not Assigned
Search Terms	Craniofacial morphology, Genetics, Hard palate, Velocardiofacial syndrome
Copyright Release Date	Not Received

Stage	Start Date
Editor Assigned	2011-10-31
Author Approved Converted Files	2011-10-31
Waiting for Author Approval of Converted Files	2011-10-31
File Conversion Complete	2011-10-31
Waiting for File Conversion	2011-10-31
Manuscript Submitted	2011-10-31
Manuscript Files Submitted	2011-10-31
Preliminary Manuscript Data Submitted	2011-10-31

For assistance, please contact the Editorial Office. E-mail: cleftpalj@allentrack.net
CPCJ Home

22q11 deletion/duplication screening in Brazilian babies aged 0 – 2 years old with cleft palate

Rosana Maria Candido de Souza Sandri MS, Roseli Maria Zechi-Ceide PhD, Antonio Richieri- Costa PhD, Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo PhD.

Divisão de Sindromologia - Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais/USP, Bauru – Brasil.

Corresponding author: Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo. Divisão de Sindromologia - Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais/USP, Bauru – Brasil. Telephone: + 55 (14) 32358412. FAX: + 55 (14) 32348718 e-mail: lubicudo@centrinho.usp.br

MS Sandri is Biologist, Dr. Zechi-Ceide is Clinical Geneticist, Dr. Richieri-Costa is Director of the Syndromology Division, and Dr. Ribeiro is director of the Genetics Laboratory, Syndromology Division, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalias, Brazil.

Running title: 22q11 deletion/duplication screening in cleft palate.

Grants: Fapesp (2009/54489-5) and CNPq (307597/2008-0)

Abstract

Objective: To screen a sample of 55 children aged 0 – 2 years who presented overt or sub mucous cleft palate for 22q11deletion in sense to ascertain the prevalence of this anomaly in this group.

Design: Patients were referred due to present palatal clefting. The sample included 46 patients with no associated anomalies and 9 individuals with congenital heart defect and/or developmental delay. Peripheral blood samples from all patients were analyzed for 22q11 region utilizing MLPA.

Results: Fifty-five patients aged 0 to 2 years were included in the study. Fifty-three had CPO, and 2 had a submucous CP. No deletion/duplication was detected in any of the evaluated patients.

Conclusions: We concluded that neither del22q11 nor dup22q11 testing is warranted in babies diagnosed as having palatal anomalies as main finding. Based on the relative small size of this study, and the inconsistency of the current literature, further studies are needed to clarify the indication for deletion/duplication screening in patients with palatal anomalies.

Key Words: 22q11, deletion, cleft palate, MLPA.

Introduction

Main anomalies involving the palate include cleft uvula, submucous cleft palate, and overt cleft palate. Cleft uvula has been suggested to be a microform of palatal cleft (Shapiro et al., 1971) with a estimated prevalence of 0.44% with no sex differences (Chosack and Eidelman, 1978). For submucous cleft palate the estimated prevalence is around 0.05% and for cleft palate 1:2000 live births (Bagatin, 1985; Weatherley-White et al., 1972; Tolarova, 1987; Moore et al., 1990; Farral and Holder, 1992; Gosain et al., 1996; Hagberg et al., 1997; Tolarová and Cervenka, 1998; Lucas et al., 2000; Rittler et al., 2011).

Initially, only clefts of the secondary palate were described in association with the syndrome, but other less common oral anomalies were subsequently added to the spectrum including occult or overt cleft palate, cleft lip/palate, deep nasopharynx, and Robin sequence (Shprintzen et al., 1985; Glander and Cisneros, 1992; Finkelstein et al., 1993). In patients with velocardiofacial syndrome palatal anomalies are present in 49% of the cases corresponding to 3% with isolated cleft lip, 5% with submucous cleft, 9% with cleft palate, and 32% with velopharyngeal insufficiency without a cleft (Ryan et al., 1997). The frequency of patients with Robin sequence with 22q11 deletion seems to be low and accounts for 7% of cases in a study involving 115 patients (Evans et al., 2006). Patients with 22q11DS usually present velopharyngeal insufficiency manifest by hypernasal speech and the main possible explanation has been attributed to hypotonia usually often present as part of the syndrome without a myogenic component clearly confirmed (Widdershoven et al., 2011).

There is a controversy in the literature regarding the evaluation of patients with palatal anomalies concerning 22q11 deletion syndrome. For some authors routine screening tests are not

indicated, but they stress the necessity of clinical follow-up (Ruiter et al., 2003; Barisic et al., 2008), while others believe that all children with cleft lip and or palate should routinely be tested due to the implications of the diagnosis of velocardiofacial syndrome (Bashir et al., 2008; Nugent et al., 2010).

The goal of our study was to screening a sample of 55 Brazilian patients aged 0-2 years and presenting palatal anomalies as main feature in sense to detect 22q11 deletion in attempt to perform early diagnosis.

Material and Methods

Patients

Patients with orofacial clefts were referred to the Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais. Fifty-five children with palatal anomalies were seen by the pediatrician, speech pathologist, and clinical geneticist. Samples from patients were obtained after informed consent. Ethical approval was obtained for this study from the IRB at Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Bauru, Brazil.

MLPA

The presence of chromosome-specific low-copy repeats (LCRs) predisposes chromosome 22 to deletions and duplications. One of the current diagnostic procedures for detecting aberrations at 22q11 is PCR-based multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). MLPA was performed on DNA from peripheral blood lymphocytes, extracted with 123 Puregene Blood Core Kit C (Qiagen, Maryland, MD). Kit P250 for DGS/VCFS (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) was used. The kit test 26 loci on 22q11, 2 on 22q13, 2 on 4q, 3 on 8p, 2 on 9q, 6 on 10p and 4 on 17p. Data analysis was made against up to 5 control samples using the MRC Coffalyser v9 software or GeneMarker v 1.95 software.

Results

From the 55 patients, 53 have CPO, and 2 have submucous CP. The group consisted of 24 males and 33 females, of whom 77% was aged 1 year at the time of MLPA testing. Nine individuals presented congenital heart defect and/or developmental delay.

Utilization of MLPA analysis, deletion/duplication of 22q11 was not identified in any of the evaluated patients.

Discussion

The spectrum of the findings in patients with 22q11 deletion has been recently enlarged and now includes more than 180 variable features (Shprintzen, 2008). The classic form of the syndrome is easily recognized, but more subtle phenotypic features or the observation of signs present in either syndromic or nonsyndromic individuals pose a dilemma to the clinician as to whether to evaluate the patient for 22q11 critical region (Motzkin et al., 1993; Shprintzen, 1994; de La Rochebrochard et al., 2006; Repetto et al., 2009; Veerapandiyan et al., 2011). Thus, many studies have been performed to ascertain the prevalence of the deletion carriers among specific patient groups to further direct decision making regarding detection of the deletion in individuals with those clinical features that can be seen in VCFS. The correct recognition of patients who carry the deletion is essential for appropriate medical and genetic counseling (Bassett et al., 2011).

It has been matter of discussion the early screening of patients with isolated clefts, even isolated overt cleft palate. It has been shown that hemizygosity at 22q11 is not increased in isolated CP (Mingarelli et al., 1996) and older children and adults with an isolated palatal anomaly may not require screening for the 22q11 deletion and additional relevant clinic, behavioral or psychiatric symptoms should be considered to deserve routine screening (Reish et al., 2003), similar results were found in children with palatal anomalies (Barasic et al., 2008).

Divergent opinions in relation to 22q11 deletion syndrome screening in patients with cleft palate or diverse oral anomalies have been supported by some authors. Since the initial reports on this condition overt or submucous clefts of the secondary palate was considered as one of the most

consistent finding (Shprintzen et al., 1978). Bashir et al. (2008) after screened 191 children with oral clefts they found 9 positive cases for 22q11 FISH test and in view of the prognostic implications of a diagnosis of VCF syndrome they suggested that all children with cleft lip and/or palate should routinely screened for the deletion. Prevalence at birth of infants with 22q11 deletion syndrome with an isolated overt cleft in the soft palate showed numbers around 10% (Lima et al., 2010), and a small but significant proportion of patients attending cleft services has been reported (Nugent et al., 2010).

Variation in the palatal phenotype observed in individuals with the 22q11.2 deletion syndrome has been suggested to be related with gender and race as well as with the variation of genes that lie outside the deleted region (Driscoll et al., 2006). In this study, we have screened 55 patients with congenital or 173 oral palatal anomalies and no deletions for the 22q11 deletions were found. Most of the patients were less than 1 year of age, and they were randomly selected independently of gender, social class, and skin color.

Taking in to account the implications of the diagnosis of VCF syndrome, and that social interaction in the first few months may be of special importance for child cognitive development (Hentges et al., 2011), we believe that this task should be continued. Based on the relative small size of this study, and the inconsistency of the current literature, further studies are needed to clarify the indication for deletion/duplication screening in patients with palatal anomalies.

References

- Bagatin M. Submucous cleft palate. *J Maxillofac Surg.* 1985;13:37-38.
- Barisić I, Morozin Pohovski L, Petković I, Cvetko Z, Stipancić G, Bagatin M. Screening of patients at risk for 22q11 deletion. *Coll Antropol.* 2008;32:165-169.
- Bashir MA, Hodgkinson PD, Montgomery T, Splitt M. 22q11 Deletion in children with cleft lip and palate--is routine screening justified? *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008;61:130-132.
- Bassett AS, McDonald-McGinn DM, Devriendt K, Digilio MC, Goldenberg P, Habel A, Marino B, Oskarsdottir S, Philip N, Sullivan K, Swillen A, Vorstman J; International 22q11.2 Deletion Syndrome Consortium. Practical guidelines for managing patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J Pediatr.* 2011;159:332-339.
- Chosack A, Eidelman E. Cleft uvula: prevalence and genetics. *Cleft Palate J.* 1978;15:63-67.
- De La Rochebrochard C, Joly-Hélas G, Goldenberg A, Durand I, Laquerrière A, Ickowicz V, Saugier-Verber P, Eurin D, Moirrot H, Diguët A, de Kergal F, Tiercin C, Mace B, Marpeau L, Frebourg T. The intrafamilial variability of the 22q11.2 microduplication encompasses a spectrum from minor cognitive deficits to severe congenital anomalies. *Am J Med Genet A.* 2006;140:1608-1613.
- Driscoll DA, Boland T, Emanuel BS, K 210 irschner RE, LaRossa D, Manson J, McDonald-McGinn D, Randall P, Solot C, Zackai E, Mitchell LE. Evaluation of potential modifiers of the palatal phenotype in the 22q11.2 deletion syndrome. *Cleft Palate Craniofac J.* 2006;43:435-441.
- Evans AK, Rahbar R, Rogers GF, Mulliken JB, Volk MS. Robin sequence: a retrospective review of 115 patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70:973-980.
- Farral M, Holder S. Familial recurrence-pattern analysis of cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet.* 1992;50:270-277.
- Finkelstein Y, Zohar Y, Hauben DJ, Nachmani A, Lerner MA, Frydman M. The otolaryngologist and the patient with velocardiofacial syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:563-566.
- Glander K, Cisneros GJ. Comparison of the craniofacial characteristics of two syndromes associated with the Pierre Robin sequence. *Cleft Palate Craniofac J.* 1992;29:210-219.
- Gosain AK, Conley SF, Marks S, Larson DL. Submucous cleft palate: diagnostic methods and outcomes of surgical treatment. *Plast Reconstr Surg.* 1996;97:1497-1509.

- Hagberg C, 234 Larson O, Milerad J. Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformations. *Cleft Palate Craniofac J.* 1997;35:40-45.
- Hentges F, Hill J, Bishop DV, Goodacre T, Moss T, Murray L The effect of cleft lip on cognitive development in school-aged children: a paradigm for examining sensitive period effects. *J Child Psychol Psychiatry.* 2011;52:704-712.
- Lima K, Følling I, Eiklid KL, Natvig S, Abrahamsen TG Age-dependent clinical problems in a Norwegian national survey of patients with the 22q11.2 deletion syndrome. *Eur J Pediatr* 2010;169:983-989.
- Lucas VS, Gupta R, Ololade O, Gerbier M, Roberts GJ. Dental health incidence and caries associated microflora in children with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2000;37:447-452.
- Mingarelli R, Digilio MC, Mari A, Amati F, Standoli L, Giannotti A, Novelli G, Dallapiccola B. The search for hemizyosity at 22qll in patients with isolated cleft palate. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1996;16:118-121.
- Moore GE, Ivens A, Newton R, Balacs MA, Hendwrson DJ, Jensson O. X chromosome genes involved in the regulation of facial clefting and spina bifida. *Cleft Palate J.* 1990;27:131-135.
- Motzkin B, Marion 257 RW, Goldberg RB, Shprintzen RJ, Saenger P. Variable phenotypes in velocardiofacial syndrome with chromosomal deletion. *J Pediatr.* 1993;123:406-410.
- Nugent N, McGillivray A, Earley MJ. 22q11 chromosome abnormalities and the cleft service. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010;63:598-602.
- Reish O, Finkelstein Y, Mesterman R, Nachmani A, Wolach B, Fejgin M, Amiel A. Is isolated palatal anomaly an indication to screen for 22q11 region deletion? *Cleft Palate Craniofac J.* 2003;40:176-179.
- Repetto GM, Guzmán ML, Puga A, Calderón JF, Astete CP, Aracena M, Arriaza M, Aravena T, Sanz P. Clinical features of chromosome 22q11.2 microdeletion syndrome in 208 Chilean patients. *Clin Genet.* 2009;76:465-470.
- Rittler M, Cosentino V, López-Camelo JS, Murray JC, Wehby G, Castilla EE. Associated anomalies among infants with oral clefts at birth and during a 1-year follow-up. *Am J Med Genet A.* 2011;155:1588-1596.
- Ruiter EM, Bongers EM, Smeets DF, Kuijpers-Jagtman AM, Hamel BC. No justification of routine screening for 22q11 deletions in patients with overt cleft palate. *Clin Genet.* 2003;64:216-219.
- Ryan AK, Goodship JA, Wilson DI, 280 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, Brondum-Nielsen K, Stewart F, VanEssen T, Patton M, Patterson J, Scambler PJ. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet.* 1997;34:798-804.
- Shapiro BL, Meskin LH, Cervenka J, Pruzansky S. Cleft uvula: a microform of facial clefts and its genetic basis. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1971;7:80-82.
- Shprintzen RJ. Velocardiofacial syndrome and DiGeorge sequence. *J Med Genet.* 1994;31:423-427.
- Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Dev Disabil Res Rev.* 2008;14:3-10.
- Shprintzen RJ, Goldberg 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;15:56-62.
- Shprintzen RJ, Siegel-Sadewitz VL, Amato J, Goldberg RB. Anomalies associated with cleft lip, cleft palate, or both. *Am J Med Genet.* 1985;29:585-596.

Tolarová M. Orofacial clefts in Cz 305 echoslovakia. Incidence, genetics and prevention of cleft lip and palate over a 19-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1987;21:19-25.

Tolarová MM, Cervenka J. Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet*. 1998;75:126-137.

Veerapandiyan A, Abdul-Rahman OA, Adam MP, Lyons MJ, Manning M, Coleman K, Kobrynski L, Taneja D, Schoch K, Zimmerman HH, Shashi V. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome in African-American patients: A diagnostic challenge. *Am J Med Genet A*. 2011;155:2186-2195.

Weatherley-White RC, Sakura CY Jr, Brenner LD, Stewart JM, Ott JE. Submucous cleft palate. Its incidence, natural history, and indications for treatment. *Plast Reconstr Surg*. 1972;49:297-304.

Widdershoven JC, Spruijt NE, Spliet WG, Breugem CC, Kon M, Mink van der Molen AB. Histology of the pharyngeal constrictor muscle in 22q11.2 deletion syndrome and non-syndromic children with velopharyngeal insufficiency. *PLoS One*. 2011;6:e21672.

Acknowledgements: We would like to gratefully acknowledge the patients and their families who participated in this study.

APÊNDICE 2 – Artigo enviado para publicação

Cleft lip in 22q11 deletion syndrome

Rosana Maria Candido de Souza Sandri^a, Nancy Mizue Kokitsu Nakata^b, Antonio Richieri-Costa^b, Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo^a

^a Molecular Genetics Laboratory, Syndromology Division, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

^b Clinical Genetics, Syndromology Division, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

Running Title: 22q11 deletion syndrome

Correspondence to: Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo. Molecular Genetics Laboratory, Syndromology Division, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRCA-USP), Bauru, SP, Brazil. Telephone: 55 + (14) 32358412. Fax: 55 + (14) 32347818. e-mail: lubicudo@centrinho.usp.br

ABSTRACT

The 22q11 deletion syndrome is usually recognized in neonates presenting congenital cardiac malformations, hypocalcaemia, hypoparathyroidism, immunodeficiency, and thymic hypoplasia or aplasia and then named as DiGeorge Syndrome. Early diagnosis is important to prevent complications and provide proper support to patient and family. However, in few instances cases without this usual pattern of anomalies only are diagnosed by undirected ways, based on familial clinical information. Here we report on a female patient who was referred to our routine clinic as having cleft lip. Familial evaluation led us to suspect that the mother could be a carrier for a 22q11.2 deletion and the study through MLPA testing confirmed that both the patient and her mother presented a 2 Mb 22q11 deletion. In this situation, early diagnosis is important to observe the clinical and phenotypical evolution, be alert to prevent eventful complications and provide proper support to patient and family. Clinical and genetic aspects are discussed.

Key words: 22q11 deletion syndrome, MLPA testing, cleft lip/palate

INTRODUCTION

The 22q11 deletion syndrome [22q11DS; OMIM 602054] is caused by a microdeletion of chromosome 22 at the q11.2 band and is one of the most challenging conditions within the field of clinical dysmorphology. It shows an expansive phenotype with more than 180 clinical signs involving different organ and system [Shprintzen, 2008]. These signs are differently combined from patient to patient resulting in a kaleidoscopic number of phenotypes ranging from normality to severe handicapped individuals [Shprintzen, 2008]. Phenotypic variability has been attributed to the presence or absence of genes at the breaking points and depending of the size of the deletion plus variations in the rest of the genome due to copy number variations [Bittel et al., 2009]. Microscopic deletion at 22q11 occurs in approximately 1 in every 4000 live births. Different deletion genotypes have been delineated to this condition: a predominant 3Mb deletion accounting to 90% of the cases, a 1.5-2 Mb deletion in 8%, and atypical smaller deletions in 2%. Familial cases of 22q11DS present a higher frequency of uncommon 1.5-2 Mb deletions [Fernández et al., 2005].

To date few cases of cleft lip/palate (CL/P) have been described in 22q11DS, but it has been suggested that children with CP and CL/P should be routinely screened to deletions in this region due to the implications involving the diagnosis and prognosis of the velocardiofacial syndrome (VCFS) [Bashir et al., 2008]. Here we described a female child who was referred to our hospital with the diagnosis cleft lip with minor associated anomalies but with no direct signs of DiGeorge syndrome or typical 22q11DS signs and her mother with typical signs of VCFS.

METHODS

Samples and pictures from patient and her mother were obtained after informed consent. Ethical approval was obtained from the IRB at Hospital of Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRCA-USP), in Brazil.

Case Report

The proband (Fig. 1A-C), is a 6 months old Brazilian girl. She was born by Cesarean section at term. The parents were nonconsanguineous 23-year-old, G1P1 mother and a 22-year-old father. Her birth weight was 3,280g (25-50th centile), length was 46cm (3rd centile) and head circumference (OFC) of 35cm (>50th centile). Clinical examination, at age of 6 months showed weight, height and OFC as 7,600 g (25th centile), 63.5 cm (3rd-10th centile), and 40 cm (2nd centile), respectively. She presented round face, narrow forehead, epicanthic folds, flat nasal base, cleft lip, small mouth, retrognathia, asymmetric and prominent ears, abnormal anti-helix and normal development.

Physical examination of her mother (Fig. 2A-E) revealed long face, mid-face hypoplasia, narrow palpebral fissures, hypoplastic nasal alae, retrognathia, small and asymmetric ears, helix and anti-helix anomalous at left, slender hands and digits, long toes, hypernasal voice, speech delay, learning disability, and psychomotor development delay.

MLPA

MLPA was performed on DNA from peripheral blood lymphocytes, extracted with Puregene Blood Core Kit C (Qiagen, Maryland, MD). The SALSA P023 MLPA-DiGeorge and the SALSA P250 MLPA-DiGeorge syndrome test kits (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) were used to determine copy number changes in the 22q11.2 region. MLPA was performed following the manufacturer's instructions. All runs included DNA from three normal controls to calibrate unknown samples. The reaction products were detected with an ABI-3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). To size the PCR products and obtain peak areas we used the GeneMapper software (Applied Biosystems). These data were exported into GeneMarker software (Softgenetics, State College, PA) for MLPA analysis.

RESULTS

MLPA testing of both patient and mother with kits P250 and P023 showed a deletion of 2Mb extending from LCR22-A to LCR22-C. Fig. 3 shows the MLPA 22q11 deletion results for patient and mother.

DISCUSSION

Approximately 87% of patients with 22q11 deletion syndrome (22q11DS) have a common 3Mb deletion region, known as the "common" or "typical" deleted region (TDR) which includes at least 48 known genes, around 8% span a smaller 1.5 Mb region (nested within the larger 3 Mb region), which contains at least 28 genes, while 2% have atypical deletion of 2Mb or smaller [Edelmann et al., 1999; Shaikh et al., 2000; Emanuel, 2008]. Atypical or unique deletions or translocations have also been found in a few rare patients [Kurahashi et al., 1996, 1997; Amati et al., 1999; Shaikh et al., 2000; Garcia-Minaur et al., 2002; Rauch et al., 2005]. A recurrent 1.5 - 2 Mb proximally nested deletion has been reported more commonly in familial cases of 21q11DS [Iascone et al., 2002; Adeyinka et al., 2004; Fernandez et al., 2005]. In familial cases, the disorder is generally more severe in the younger generations, suggesting an apparent anticipation. VCFS is one of the commonest syndromes associated with cleft of the secondary palate. There is a relatively high prevalence of palatal anomalies, which can include cleft palate, submucous cleft palate, and velopharyngeal insufficiency, however, there are controversies toward routine screening for 22q11 deletion in patients with overt cleft palate [Morava et al., 2000; Reish et al., 2003; Ruiter et al., 2003; Oh et al., 2007; Barasic et al., 2008]. Arguments for searching genes for NSCL/P within this region take into account that one of the genes hosted within the 22q11.2 region and related with NSCL/P is the *TBX1*. Deletion of *Tbx1* in mice phenocopies a number of the features of the 22q11DS, including cleft palate leading *TBX1* to be proposed as the key gene in the etiology of DGS/VCFS [Jerome and Papaioannou, 2001]. Mutations in *TBX1* have been identified in a small number of patients with a 22q11.2 deletion syndrome phenotype [Yagi et al, 2003; Paylor et al, 2006; Zweier et al, 2007; Shi et al., 2009]. Considering isolated CL/P, it was the report of a patient with a homozygous intronic variant in *TBX1* gene and a possible segmental maternal isodisomy for the region was suggested linking 22q11 with CL/P [Vieira et al., 2005], in some studies with microdeletions in candidate genes for CL/P confirmed that deletions

involving *TBX1* are likely to be etiologic [Shi et al., 2009], and in few isolated cases of 22q11 deletions [Bashir et al., 2008]. The region in the patient here reported encompass the *TBX1* gene, which can be attributed as the causative agent, and the differences existing between mother/daughter phenotypes could be attributed to the presence or absence of genes at the breaking points and depending of the size of the deletion plus variations in the rest of the genome due to copy number variations [Bittel et al., 2009]. In presence of unusual findings within the spectrum of some purportedly known syndrome, familial examination could provides a definitive clue to definitive diagnosis, to prevention, orientation and genetic counseling.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

REFERENCES

- Adeyinka A, Stockero KJ, Flynn HC, Lorentz CP, Ketterling RP, Jalal SM. Familial 22q11.2 deletions in DiGeorge/velocardiofacial syndrome are predominantly smaller than the commonly observed 3Mb. *Genet Med*. 2004;6:517-520.
- Amati F, Conti E, Novelli A, Bengala M, Diglio MC, Marino B, Giannotti A, Gabrielli O, Novelli G, Dallapiccola B. Atypical deletions suggest five 22q11.2 critical regions related to the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome. *Eur J Hum Genet*. 1999;7:903-909.
- Barisić I, Morozin Pohovski L, Petković I, Cvetko Z, Stipanić G, Bagatin M. Screening of patients at risk for 22q11 deletion. *Coll Antropol*. 2008;32:165-169.
- Bashir MA, Hodgkinson PD, Montgomery T, Splitt M. 22q11 Deletion in children with cleft lip and palate--is routine screening justified? *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008;61:130-132.
- Bittel DC, Yu S, Newkirk H, Kibiryeva N, Holt A 3rd, Butler MG, Cooley LD. Refining the 22q11.2 deletion breakpoints in DiGeorge syndrome by aCGH. *Cytogenet Genome Res*. 2009;124:113-120.
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen R.J., Morrow B.E. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum. Mol. Genet*. 1999;8:1157-1167.
- Emanuel BS. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22q11.2 rearrangements. *Dev Disabil Res Rev*. 2008;14(1):11-8.
- Fernández L, Lapunzina P, Pajares IL, Criado GR, García-Guereta L, Pérez J, Quero J, Delicado A. Higher frequency of uncommon 1.5-2 Mb deletions found in familial cases of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2005 Jul 1;136(1):71-5.
- Garcia-Miñaur S, Fantes J, Murray RS, Porteous ME, Strain L, Burns JE, Stephen J, Warner JP. A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *J Med Genet*. 2002;39(10):E62.
- Iascone MR, Vittorini S, Sacchelli M, Spadoni I, Simi P, Giusti S. Molecular characterization of 22q11 deletion in a three-generation family with maternal transmission. *Am J Med Genet*. 2002;108:319-321.
- Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):286-91.
- Kurahashi H, Nakayama T, Osugi Y, Tsuda E, Masuno M, Imaizumi K, Kamiya T, Sano T, Okada S, Nishisho I. Deletion mapping of 22q11 in CATCH22 syndrome: identification of a second critical region. *Am J Hum Genet*. 1996;58:1377-1381.
- Morava E, Czakó M, Melegh B, Kosztolányi G. Velo-cardio-facial phenotype and deletion of 22q11.2 in Hungarian children. *Clin Genet*. 2000;58:403-405.
- Oh AK, Workman LA, Wong GB. Clinical correlation of chromosome 22q11.2 fluorescent in situ hybridization analysis and velocardiofacial syndrome. *Cleft Palate Craniofac J*. 2007;44:62-66.
- Paylor R, Glaser B, Mupo A, Ataliotis P, Spencer C, Sobotka A, Sparks C, Choi CH, Oghalai J, Curran S, Murphy KC, Monks S, Williams N, O'Donovan MC, Owen MJ, Scambler PJ, Lindsay E. Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7729-7734.
- Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, Lascorz J, Hüffmeier U, Weyand M, Singer H, Hofbeck M. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet*. 2005;42:871-876.
- Reish O, Finkelstein Y, Mesterman R, Nachmani A, Wolach B, Fejgin M, Amiel A. Is isolated palatal anomaly an indication to screen for 22q11 region deletion? *Cleft Palate Craniofac J*. 2003;40:176-179.

Ruiter EM, Bongers EMHF, Smeets DFCM, Kuijpers-Jagtman AM, Hamel BCJ. No justification of routine screening for 22q11 deletions in patients with overt cleft palate. *Clin Genet* 2003;64:216-219.

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

Shi M, Mostowska A, Jugessur A, Johnson MK, Mansilla MA, Christensen K, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC. Identification of microdeletions in candidate genes for cleft lip and/or palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85:42-51.

Shprintzen RJ. Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Dev Disabil Res Rev.* 2008;14:3-10.

Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet.* 2003;362:1366-1373.

Zweier C, Sticht H, Aydin-Yaylagul I, Campbell CE, Rauch A. Human TBX1 missense mutations cause gain of function resulting in the same phenotype as 22q11.2 deletions. *Am J Hum Genet.* 2007;80: 510-517.

Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005;1(6):e64.