



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA SÍNDROME  
VELOCARDIOFACIAL E POSSÍVEIS FENOCÓPIAS

*Ilária Cristina Sgardioli*

Campinas, 2011





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA SÍNDROME  
VELOCARDIOFACIAL E POSSÍVEIS FENOCÓPIAS

*Ilária Cristina Sgardioli*

Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas. Sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Sg16i Sgardioli, Ilária Cristina, 1981-  
Investigação laboratorial da síndrome velocardiofacial  
e possíveis fenocópias. – Campinas, SP : [s.n.], 2011.

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

1. Síndrome de DiGeorge. 2. Hibridização in Situ  
Fluorescente. 3. Análise de Sequência de DNA. I.  
Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Laboratory investigations of the velocardiofacial syndrome and phenocopies possible

**Palavras-chave em inglês:**

DiGeorge Syndrome

Fluorescent in Situ Hybridization

DNA Sequence Analysis

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestre em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Vera Lúcia Gil da Silva Lopes [Orientador]

Chong Ae Kim

Cláudia Vianna Maurer Morelli

**Data da defesa:** 29-07-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

*Dedico este trabalho aos meus pais Manoel e Gilda, ao meu irmão Rafael e a minha avó Arlete por todo amor, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida. Eu amo vocês.*



---

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
**Ilária Cristina Sgardioli**

---

---

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

---

---

**Membros:**

---

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



---

2. Profa. Dra. Chong Ae Kim -



---

3. Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli -



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

---

**Data: 29/07/2011**

---



## **Agradecimentos**

A Deus por todas as pessoas e oportunidades que Ele coloca em minha vida;

Aos meus pais Manoel e Gilda e ao meu irmão Rafael por todo amor, carinho, compreensão e apoio, sem vocês eu nada seria;

A minha avó Arlete, pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, pela oportunidade, pelo aprendizado, pela dedicação, compreensão e amizade durante estes anos;

Ao meu amigo Tárzis, pela amizade, confiança, apoio, paciência, aprendizado e bons momentos que passamos, os quais guardarei com muito carinho para sempre. E claro que não posso deixar de agradecer por toda sua contribuição neste trabalho, que foi imensa. Obrigada por compartilhar seu conhecimento comigo e me ajudar em tudo;

A minha amiga Milena, por toda paciência, terapia, apoio, compreensão e momentos compartilhados. Obrigada pela amizade que compartilhamos todos os dias. Agradeço também sua colaboração na realização da técnica de *SNP-array* deste estudo e todo conhecimento compartilhado;

Aos meus amigos, funcionários e ex-funcionários do Laboratório de Citogenética Humana, Nilma, Jair, Henry, Jocimar e Antônio e as minhas amigas e funcionárias do Laboratório de Genética Molecular, Luciana, Marilza e Madalena pela amizade, apoio, compreensão, aprendizado e experiências compartilhadas;

As minhas amigas Érika (Sú), Karina e Carol por todo aprendizado compartilhado e todos os bons momentos que passamos, pelas jantinhas realizadas e por todo carinho com que me receberam;



Aos meus amigos Marcelo e Tânia, por toda amizade, aprendizado e por todos os finais de semana compartilhados no laboratório, que tornaram esses momentos mais divertidos e felizes;

A minha amiga Bibiana, por toda nossa jornada desde o aprimoramento, pelos bons e difíceis momentos que passamos juntas que guardarei para sempre;

Aos meus amigos Aline e Renato que sempre estão presentes ajudando a compor a “mesa que aplaude” que trouxe tanta diversão e felicidade nesses anos;

A Laiara e Juliana Vally, que ajudaram parcialmente na execução do projeto e pela amizade;

A todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Citogenética Humana e de Biologia Molecular do Depto. de Genética;

As minhas amigas Mailme e a Renata por toda a convivência, ajuda e bons momentos que passei nesses anos;

Aos funcionários do Laboratório Nacional de Biociências – pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Wanderley e Tereza por toda disponibilidade, ajuda e paciência;

A Miriam, que mal chegou e já ofereceu sua amizade e sua ajuda;

Aos aprimorandos que estiveram presentes neste período, pelos bons momentos;

Aos que tiveram outro caminho, mas que durante sua jornada no depto. nos ajudaram e compartilharam conosco bons momentos, Gabi, Pâmela, Samôra e Romênia;

A minha amiga Sueli, pela amizade e apoio fundamental;



À Banca Examinadora pela contribuição na participação e elaboração desta tese;

Aos médicos do Projeto Crânio Face Brasil pelas suas amostras e aos pacientes e seus familiares que aceitaram participar deste estudo, tornando-o possível;

Aos professores do Depto. de Genética Médica, por todo aprendizado proporcionado;

Às secretárias do Depto. de Genética Médica e à secretaria do curso de Pós Graduação em Ciências Médicas pela paciência e disponibilidade;

À Fapesp, pelo apoio financeiro.



# ***SUMÁRIO***



# Sumário

|                                                                             |       |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Lista de Ilustrações</b> .....                                           | xxi   |
| Tabelas.....                                                                | xxiii |
| Figuras .....                                                               | xxiii |
| <b>Lista de Abreviaturas</b> .....                                          | xxvii |
| <b>Resumo</b> .....                                                         | xxxvi |
| <b>Abstract</b> .....                                                       | xl    |
| <b>1. Introdução</b> .....                                                  | 45    |
| 1.1. Aspectos Gerais da Síndrome Velocardiofacial .....                     | 45    |
| 1.2. Etiologia .....                                                        | 45    |
| 1.3. Influência dos genes <i>TBX1</i> e <i>FGF8</i> na gênese da SVCF ..... | 47    |
| <b>2. Objetivos</b> .....                                                   | 55    |
| <b>3. Casuística</b> .....                                                  | 59    |
| <b>4. Métodos</b> .....                                                     | 59    |
| 4.1. Análise Citogenética por bandamento G .....                            | 60    |
| 4.2. Obtenção das amostras e extração de DNA.....                           | 61    |
| 4.3. <i>MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)</i> .....   | 61    |
| 4.4. <i>FISH (Hibridação in situ com Fluorescência)</i> .....               | 65    |
| 4.5. Sequenciamento dos genes <i>TBX1</i> e <i>FGF8</i> .....               | 67    |
| 4.5.1. <u>Amplificação dos fragmentos do gene <i>TBX1</i></u> .....         | 67    |
| 4.5.2. <u>Amplificação dos fragmentos do gene <i>FGF8</i></u> .....         | 70    |
| 4.6. Sequenciamento automático .....                                        | 71    |
| 4.7. <i>SNParray</i> .....                                                  | 72    |
| <b>5. Resultados</b> .....                                                  | 75    |
| 5.1. Dados clínicos .....                                                   | 75    |
| 5.2. Análise Citogenética por bandamento G .....                            | 75    |
| 5.3. Análise de <i>MLPA</i> .....                                           | 76    |
| 5.4. Análise de <i>FISH</i> .....                                           | 79    |
| 5.5. Análise de Sequenciamento.....                                         | 80    |
| 5.5.1. <u>Gene <i>TBX1</i></u> .....                                        | 80    |



|           |                                                                                                                   |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5.1.1.  | <u>Alteração 01 - rs737868</u> .....                                                                              | 81  |
| 5.5.1.2.  | <u>Alteração 02 - rs41298814</u> .....                                                                            | 81  |
| 5.5.1.3.  | <u>Alteração 03 - rs2301558</u> .....                                                                             | 82  |
| 5.5.1.4.  | <u>Alteração 04 - 41298840</u> .....                                                                              | 82  |
| 5.5.1.5.  | <u>Alteração 05 - rs13054377</u> .....                                                                            | 83  |
| 5.5.1.6.  | <u>Alteração 06 - rs72646967</u> .....                                                                            | 83  |
| 5.5.2.    | <u>Gene <i>FGF8</i></u> .....                                                                                     | 84  |
| 5.6.      | <u>Alterações cromossômicas não relacionadas a SVCF</u> .....                                                     | 85  |
| <b>6.</b> | <b>Discussão</b> .....                                                                                            | 97  |
| <b>7.</b> | <b>Conclusões</b> .....                                                                                           | 105 |
| <b>8.</b> | <b>Referências Bibliográficas</b> .....                                                                           | 109 |
| <b>9.</b> | <b>Anexos</b> .....                                                                                               | 121 |
|           | Anexo I. Parecer do Comitê de Ética .....                                                                         | 121 |
|           | Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....                                                        | 123 |
|           | Anexo III. <i>Checklist</i> .....                                                                                 | 127 |
|           | Anexo IV. Protocolo de Cariótipo de sangue periférico por banda G.....                                            | 131 |
|           | Anexo V. Protocolo de extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio .....                                         | 133 |
|           | Anexo VI. Protocolo de <i>MLPA</i> .....                                                                          | 135 |
|           | Anexo VII. Protocolo da <i>FISH</i> .....                                                                         | 136 |
|           | Anexo VIII. Componentes e volumes das reações de <i>PCR</i> para amplificação dos exons do gene <i>TBX1</i> ..... | 140 |
|           | Anexo IX. Componentes e volumes das reações de <i>PCR</i> para amplificação dos exons do gene <i>FGF8</i> .....   | 141 |
|           | Anexo X. Protocolo da reação de <i>Exo-Sap (GE™)</i> .....                                                        | 143 |
|           | Anexo XI. Protocolo da reação de seqüenciamento .....                                                             | 144 |
|           | Anexo XII. Dados clínicos obtidos através da avaliação clínica e do <i>checklist</i> .....                        | 146 |



# ***LISTA DE ILUSTRAÇÕES***



## Lista de Ilustrações

### *Tabelas*

1. **Tabela 1.** Fragmentos que compõe o Kit de *MLPA P250-A1 DiGeorge* e respectivas localizações das sondas no DNA genômico. 62
2. **Tabela 2.** Seqüências dos oligonucleotídeos e suas temperaturas de anelamento. 68
3. **Tabela 3.** Seqüências dos oligonucleotídeos e suas temperaturas de anelamento. 70
4. **Tabela 4.** Resultados de cariótipos. 75
5. **Tabela 5.** Resultados de *MLPA*. 76
6. **Tabela 6.** Resultados de *FISH*. 79

### *Figuras*

1. **Figura 1.** Indicação das seqüências repetidas curtas (LCR) em 22q11.2. 46
2. **Figura 2.** Localização cromossômica e esquema do gene *TBX1*. 48
3. **Figura 3.** Localização cromossômica e esquema do gene *FGF8*. 50
4. **Figura 4.** Esquematização das etapas da técnica de *MLPA*. 63
5. **Figura 5.** Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos. 64
6. **Figura 6.** Regiões que compoe a sonda *TUPLE1*, utilizada n técnica de *FISH*. 66
7. **Figura 7.** Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos 1, 5, 6 e 9B. 69
8. **Figura 8.** Ciclos utilizados na amplificação do exons 2, 3, 4, 7, 8 e 9C. 69
9. **Figura 9.** Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos 3, 4, 5 e 6. 70
10. **Figura 10.** Ciclos utilizados na reação de seqüenciamento no ABI. 71



|     |                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 11. | <b>Figura 11.</b> Em A um cariótipo normal feminino e em B um cariótipo normal masculino.                                                                                                                | 76 |
| 12. | <b>Figura 12.</b> Padrão de resultados das análises de indivíduos normais (sem microdeleção da região 22q11.2) para o Kit P250-A1 – <i>MRC-Holland</i> <sup>®</sup> .                                    | 77 |
| 13. | <b>Figura 13.</b> Padrão de resultado das análises de indivíduos com deleção típica de aproximadamente 3Mb (sondas <i>CLTCL1</i> a <i>LZTR1</i> ) para o Kit P250-A1 – <i>MRC-Holland</i> <sup>®</sup> . | 77 |
| 14. | <b>Figura 14.</b> Deleção com pontos de quebra variável na região 22q11.2.                                                                                                                               | 78 |
| 15. | <b>Figura 15.</b> Deleção de típica 3Mb (A) e duplicação (B) na região 22q11.2.                                                                                                                          | 78 |
| 16. | <b>Figura 16.</b> Indivíduo sem deleção (A) e com deleção (B) da região 22q11.2.                                                                                                                         | 79 |
| 17. | <b>Figura 17.</b> Eletroforese dos fragmentos do gene <i>TBX1</i> . L: marcador de peso molecular 100pb.                                                                                                 | 80 |
| 18. | <b>Figura 18.</b> A – seqüência normal, B – alteração em homozigose e C – alteração em heterozigose.                                                                                                     | 81 |
| 19. | <b>Figura 19.</b> A – seqüência normal e B – alteração em heterozigose.                                                                                                                                  | 81 |
| 20. | <b>Figura 20.</b> A – seqüência normal e B – alteração em heterozigose.                                                                                                                                  | 82 |
| 21. | <b>Figura 21.</b> A – seqüência normal, B – alteração em homozigose e C – alteração em heterozigose.                                                                                                     | 82 |
| 22. | <b>Figura 22.</b> A – seqüência normal e B – alteração em heterozigose.                                                                                                                                  | 83 |
| 23. | <b>Figura 23.</b> A – seqüência normal e B – alteração em homozigose.                                                                                                                                    | 83 |
| 24. | <b>Figura 24.</b> Eletroforese dos fragmentos do gene <i>FGF8</i> . L: marcador de peso molecular 100pb.                                                                                                 | 84 |
| 25. | <b>Figura 25.</b> Cariótipo 46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q12q21), identificando o cromossomo derivado 9.                                                                                                    | 85 |
| 26. | <b>Figura 26.</b> Heredograma relatando membros afetados e membros portadores da inserção aparentemente balanceada.                                                                                      | 86 |



|     |                                                                                                                                     |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 27. | <b>Figura 27.</b> Perfil de hibridação do <i>array</i> dos indivíduos com o rearranjo desbalanceado [der(9)ins(9;15)(q32;q12q21)].  | 87 |
| 28. | <b>Figura 28.</b> Perfil de hibridação do <i>array</i> dos indivíduos com o rearranjo balanceado [ins(9;15)(q32;q12q21)].           | 88 |
| 29. | <b>Figura 29.</b> <i>FISH</i> mostrando as duas cópias das regiões 15q11 (gene <i>UBE3A</i> ) e 15q26 (gene <i>IRFIG</i> ).         | 89 |
| 30. | <b>Figura 30.</b> Duplicação das sondas <i>PPP1R3B</i> , <i>MSRA</i> e <i>GATA4</i> que representam a região 8p23.1.                | 90 |
| 31. | <b>Figura 31.</b> Perfil de hibridação <i>do array</i> evidenciando uma duplicação de 3.8 Mb na região p23.1.                       | 91 |
| 32. | <b>Figura 32.</b> Perfil de hibridação do <i>array</i> evidenciando uma duplicação de 17.09 Mb na região 15q25-26 do cromossomo 15. | 91 |
| 33. | <b>Figura 33.</b> Cariótipo 46,XY,der(11)ins(11;15)(p13;q24q26).                                                                    | 92 |
| 34. | <b>Figura 34.</b> <i>FISH</i> confirmando quantidade e localização do fragmento duplicado.                                          | 93 |



# ***LISTA DE ABREVIATURAS***



## **Lista de Abreviaturas**

**AR:** Ácido retinóico

**CEP:** Comitê de Ética em Pesquisa

**DD:** Fragmentos de controle de Desnaturação de DNA (*MLPA*)

**Del:** Deleção

**Der:** derivativo

**DGM:** Departamento de Genética Médica

**DMSO<sub>4</sub>:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxiribonucleico

**dNTP:** Desoxirribonucleotídeos Tri-fosfatados (dCTP, dGTP, dATP, dTTP)

**DNTP:** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

**DQ:** Fragmentos de controle de Quantidade de DNA (*MLPA*)

**Dup:** duplicação

**EDTA:** Etilenediaminotetracetato dissódico 2H<sub>2</sub>O

**FCM:** Faculdade de Ciências Médicas

**FGF8:** *Fibroblast Growth Factor 8*

**FISH:** *fluorescence in situ hybridization* (hibridação *in situ* com fluorescência)

**Inv:** inversão

**Kb:** kilobases

**LCR:** *Low Copy Repeat Sequences*

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Magnésio

**MLPA:** *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

**pb:** pares de base



**PCR:** *polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

**RM:** Ressonância Magnética

**SDG:** Seqüência de DiGeorge

**SNP:** *single nucleotide polymorphism* (Polimorfismo de nucleotídeo único)

**SVCF:** Síndrome Velocardiofacial

**Taq:** *Thermus aquaticus*

**TBX1:** *T-BOX1*

**TC:** Tomografia computadorizada de crânio

**TCLE:** termo de consentimento livre e esclarecido

**TUPLE1:** *TUP1-like enhancer of split gene 1*

**UNICAMP:** Universidade Estadual de Campinas

**UV:** ultravioleta



## ***RESUMO***



A Síndrome Velocardiofacial (SVCF), uma das formas do espectro da Síndrome de deleção 22q11.2, possui incidência de 1/4.000 a 1/6.000 nascimentos. Embora a microdeleção em 22q11.2 seja a principal causa da síndrome, cerca de 10 a 20% dos pacientes com características clínicas da SVCF não a apresentam. Em alguns indivíduos com características clínicas da SVCF e sem microdeleção em 22q11.2, foram encontradas outras aberrações cromossômicas e mutações no gene *TBX1*. Existem evidências em modelos animais que aventam a associação de alterações no gene *FGF8* ao fenótipo da SVCF em humanos. No entanto, até o momento, o gene *FGF8* ainda não havia sido estudado em pacientes com SVCF sem microdeleção. Os objetivos deste trabalho foram: 1 – investigar as causas genéticas em pacientes com suspeita clínica da SVCF por meio de cariótipo e triagem de microdeleções, utilizando a técnica de *MLPA* e *FISH*; 2 – verificar a presença de alterações nas seqüências codificantes dos genes *TBX1* e *FGF8* em pacientes sem deleção 22q11.2. Foram incluídos 109 indivíduos com suspeita clínica de SVCF avaliados clinicamente por médico geneticista e os métodos utilizados foram: cariótipo com bandas G; *MLPA*, *FISH*; seqüenciamento direto das regiões codificantes dos genes *TBX1* e *FGF8* e *SNP-array*. Dos 101 casos em que o exame de cariótipo foi realizado, quatro apresentaram aberrações cromossômicas não relacionadas à SVCF, sendo que em duas foi possível a confirmação dos resultados por *SNP-array*. Realizou-se *MLPA* de 106 casos, sendo que 29 foram positivos para a deleção. Dos casos negativos, selecionou-se 31 indivíduos após reavaliação clínico-dismorfológica com a hipótese clínica mantida e foi realizado seqüenciamento das regiões codificantes dos genes *TBX1* e *FGF8*. No gene *TBX1* foram encontradas variações normais na seqüência e no gene *FGF8* não foram detectadas alterações, com exceção dos exons 1 e 2, em que não foi possível análise por problemas técnicos. O exame de cariótipo contribuiu na investigação inicial e permitiu concluir a investigação por outras técnicas. O *MLPA* se mostrou eficiente para a investigação diagnóstica da deleção 22q11.2, identificando, também, outras alterações; *FISH* confirmou 82,1% dos resultados obtidos por *MLPA*. Não foram identificadas alterações patogênicas nas regiões codificantes dos genes *TBX1* e em 90% das regiões codificantes do gene *FGF8*.



# ***ABSTRACT***



Velocardiofacial Syndrome (SVCF), one of the forms of the 22q11.2 Microdeletion Syndrome spectrum, has an incidence of 1/4.000 to 1/6.000 births. Although the 22q11.2 microdeletion is the main cause of the syndrome, approximately 10 to 20% of the patients with clinical features of SVCF don't present it. In a few individuals with SVCF clinical features and without 22q11.2 microdeletion other chromosomal aberrations and changes in *TBX1* gene were found. There is evidence in animal models that suggests the associated changes in *FGF8* gene in humans. However, the *FGF8* gene had not been studied in patients with SVCF without microdeletion yet. The purpose of this work was: 1 – To investigate the genetic causes in patients with clinical suspicion of SVCF through the karyotype and microdeletion screening using *MLPA* and *FISH* techniques; 2 – To check the presence of changes in coding sequences of the *TBX1* gene and *FGF8* gene in patients without 22q11.2 deletion. 109 individuals with clinical suspicion of SVCF and clinically evaluated by a clinical geneticist were included, and the following methods were used: karyotype with GTG banding, *MLPA*, *FISH*, direct sequencing of coding regions of *TBX1* and *FGF8* gene and *SNP-array*. Four out of 102 cases in which the tests of karyotype were performed presented chromosomal aberrations not related to SVCF, two of them confirmed by *SNP-array*. The *MLPA* of 106 cases was performed, 29 of them positive to deletion. 31 individuals were selected among negative cases, after clinical reevaluation based on the same clinical hypothesis maintained, and direct sequencing of coding regions of *TBX1* and *FGF8* gene were performed. Normal variations in sequence were found in *TBX1* gene and alterations were not detected in *FGF8* gene except for 1 and 2 exons because of technical problems. The karyotype test contributed in the first investigation and permitted us to conclude the investigation by means of other techniques. The *MLPA* proved to be effective for the diagnostic investigation of 22q11.2 deletion, identifying other alterations as well; *FISH* confirmed 82,1% results obtained by *MLPA*. Pathogenic alterations in coding regions of *TBX1* gene and in 90% of the coding regions of *FGF8* gene were not identified.



# ***INTRODUÇÃO***



## **1. Introdução**

### ***1.1. Aspectos Gerais da Síndrome Velocardiofacial***

A Síndrome Velocardiofacial (SVCF) é a síndrome de microdeleção cromossômica mais comum na espécie humana, com incidência de 1/4.000 a 1/6.000 nascimentos [1, 2, 3]. As principais características clínicas dessa condição são distúrbios cardíacos congênitos (principalmente defeitos conotruncais), aparência facial típica, anomalias palatais (especialmente insuficiência velofaríngea), hipocalcemia, deficiência imunológica, dificuldade de aprendizado e atraso no desenvolvimento [4, 5, 6, 7]. Outras características de menor ocorrência são disfagia grave, deficiência do hormônio de crescimento, doenças auto-imunes, perda auditiva, anomalias esqueléticas, anomalias renais e urogenitais, achados oftalmológicos, anomalias gastrintestinais e algumas neoplasias como hepatoblastoma, carcinoma de células renais, tumor de Wilms e neuroblastoma [7, 8, 9, 10].

Além disso, distúrbios psiquiátricos como esquizofrenia, depressão, déficit de atenção, entre outros, têm sido relatados em pacientes com esta condição clínica [11, 12]. Estudos qualitativos de neuro-imagem revelaram diversas alterações estruturais do sistema nervoso central nesses indivíduos [11, 12, 13].

A cada ano surgem novas informações sobre as manifestações fenotípicas que acomete os indivíduos afetados [10] e aproximadamente 180 tipos de achados clínicos diferentes têm sido associados com a SVCF, mas não existe uma característica clínica única ou um grupo de características clínicas que estão presentes em todos os indivíduos afetados [14].

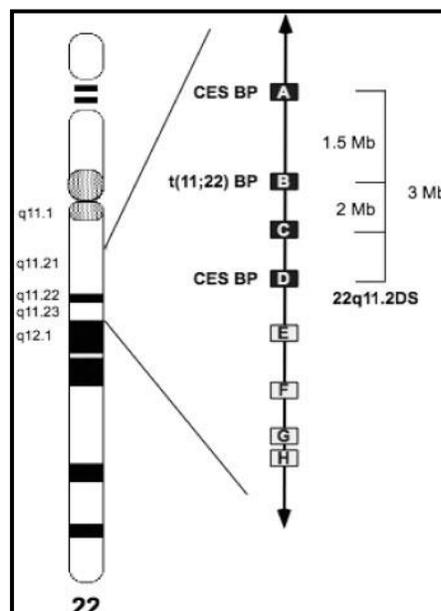
A conclusão diagnóstica em casos suspeitos de SVCF é importante, para que se tenha prognóstico e orientações quanto a condutas antecipatórias mais específicas. Além disso, o aconselhamento genético adequado só pode ser realizado após ter-se estabelecido um diagnóstico preciso [11].

### ***1.2. Etiologia***

A microdeleção em 22q11.2 é a principal causa da Síndrome Velocardiofacial. Relatos na literatura associam essa deleção a mais de 80 tipos diferentes de condições clínicas, incluindo a Síndrome Velocardiofacial (SVCF), Sequência de DiGeorge (SDG) e

Síndrome das Anomalias Conotrunciais-Face (CAFS, do inglês *Conotruncal Anomaly Face Syndrome*), sendo a SVCF e a SDG distúrbios autossômicos dominantes [15, 16, 17]. Como SVCF, SDG e CAFS compartilham um amplo espectro fenotípico e são causadas pela deleção 22q11.2, essas condições representam variações na expressão do mesmo defeito genético [13].

As deleções nessa região são flanqueadas por seqüências com pequeno número de cópias repetidas (*LCR- Low copy repeats*), sendo que o pareamento desigual na meiose entre essas seqüências com alta homologia resulta em deleções com pontos de quebra recorrentes [1, 7, 11]. A Figura 1 indica as seqüências repetidas curtas (LCR) em 22q11.2, onde as caixas cheias (LCRs A até D) são as documentadas que estão envolvidas em numerosos rearranjos recorrentes, enquanto as caixas abertas (LCRs E até H) são raramente descritas em rearranjos.



**Figura 1.** Indicação das seqüências repetidas curtas (LCR) em 22q11.2.

**Fonte:** Adaptado de EMANUEL, 2008 [18].

As *LCRs* contribuem para que microdeleções de 3Mb ocorram em 22q11.2. Entretanto, deleções de 1,5Mb ou deleções atípicas na mesma região também foram relatadas [1, 11].

Alguns trabalhos relatam que a realização de *aCGH* com alta resolução em portadores de deleção em 22q11, encontraram pequenas diferenças nos pontos de quebra em indivíduos que apresentavam a mesma deleção de 3 Mb, quando analisados por outras técnicas. Estas pequenas diferenças nos pontos de quebra incluem vários genes, de função conhecida ou não, e sugeriu-se que a deleção ou não destes pode contribuir para as diferenças fenotípicas observadas [19,20].

Em cerca de 10 a 20% dos pacientes com características clínicas da SVCF não se detecta microdeleção em 22q11.2 [6]. Alguns desses pacientes apresentam outras aberrações cromossômicas ou microdeleções em outras regiões cromossômicas.

Em um estudo realizado por Brunet et al (2006) [1], entre 295 pacientes foram encontradas outras anomalias cromossômicas não envolvendo a região 22q11.2 em cinco. Fernández et al (2008) [5] encontrou que 3,7% dos casos estudados tinham outras anomalias cromossômicas, envolvendo deleções, duplicações, cromossomos derivados, cromossomos marcadores, translocações recíprocas e não recíprocas e aneuploidia de cromossomos sexuais, o que sugere correlações entre outros *loci* com os achados clínicos semelhantes e com os casos positivos para microdeleção 22q11.2. As principais regiões cromossômicas nas quais foram encontradas alterações foram 4q34, 8p12, 14q2-q23 e 10p15 [21].

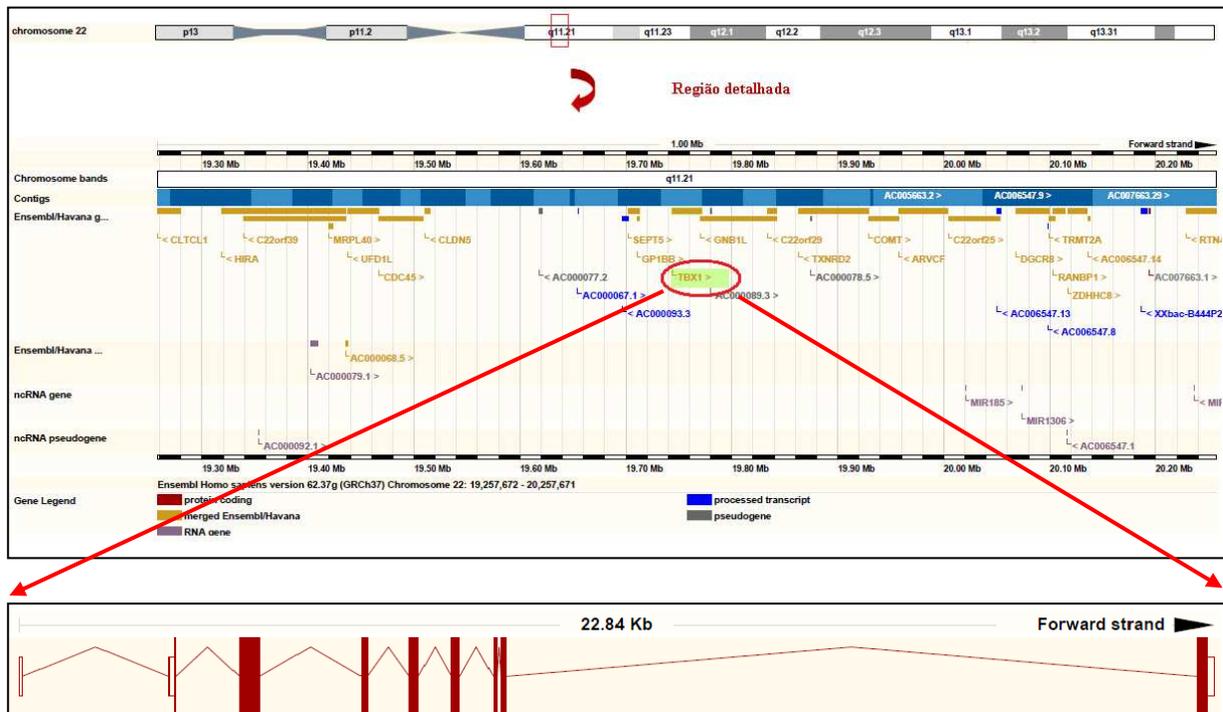
Além de outras aberrações cromossômicas ou microdeleções, mutações no gene *TBX1* já foram descritas em pacientes sem microdeleção em 22q11.2 [22].

### ***1.3. Influência dos genes *TBX1* e *FGF8* na gênese da SVCF***

Embora os estudos de correlação genótipo-fenótipo ainda não tenham determinado com precisão os genes específicos responsáveis pelas características clínicas da síndrome, o gene *TBX1* foi descrito como principal candidato. Acredita-se que a haploinsuficiência deste gene no período embrionário acarreta na ausência ou redução dos arcos faríngeos e defeitos cardíacos [10]. Em alguns indivíduos com características clínicas da SVCF, nos

quais o diagnóstico laboratorial não confirma a microdeleção da região 22q11.2, foram encontradas mutações no gene *TBX1*, as quais foram associadas ao fenótipo [8].

O gene *TBX1* (Figura 2), localizado na região 22q11.2, é membro de uma família de genes filogeneticamente conservada que possui um domínio de ligação ao DNA, denominado *T-BOX* [23].



**Figura 2.** Localização cromossômica e esquema do gene *TBX1*.

Fonte: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?g=ENSG00000107831;r=10:103530081-103535827](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000107831;r=10:103530081-103535827) acessado em 08 de maio de 2011.

Chapman et al em 1996 [24] detectaram expressão do gene *TBX1* no mesoderma anterior embrionário. Quando o embrião está com 9,5 dias pós-concepção (dpc) a expressão desse gene é limitada à região da cabeça, arcos faríngeos (porções mesenquimal e epitelial) e vesícula óptica.

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

sugeriu-se que a redução dos níveis de expressão do gene *TBX1* poderia contribuir para a hipotonia faríngea presente em indivíduos com deleção 22q11.2 [25].

Em 2003, Yagi et al [26] realizaram uma triagem de mutações neste gene em indivíduos que apresentavam o fenótipo da síndrome velocardiofacial e eram negativos para a deleção da região 22q11.2. Os achados de Yagi et al [26] indicam que mutações no gene *TBX1* são responsáveis por cinco características fenotípicas principais da síndrome de deleção 22q11.2: dismorfismos faciais, defeitos cardíacos, hipoplasia tímica, insuficiência velofaríngea com fissura de palato e disfunção na glândula paratireóide com hipocalcemia.

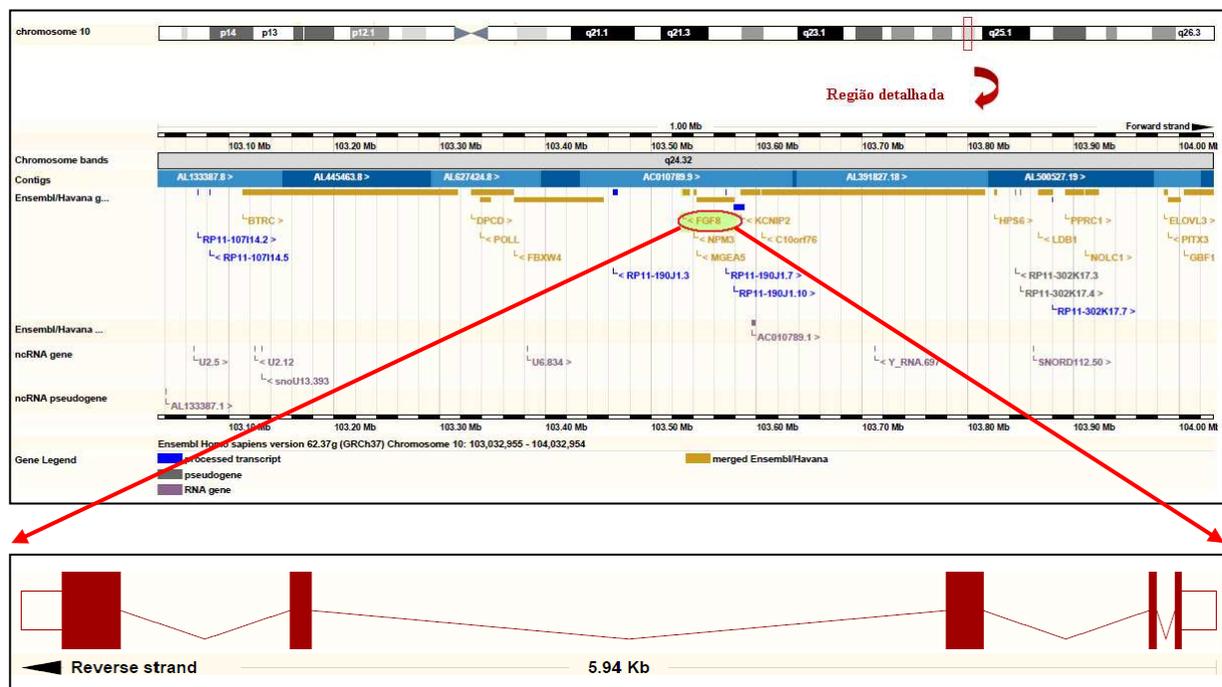
Zweier et al em 2007 [22] selecionaram indivíduos sem a deleção 22q11.2, mas com o fenótipo típico dessa deleção para triagem de mutações do gene *TBX1*. Foi identificada uma mutação *missense*, de herança paterna, que foi descrita em um indivíduo que apresentava face típica da SVCF/SDG. Essa mutação denominada H194Q, troca 582C → G (exon 5), resulta na substituição de um resíduo histidina por um resíduo glutamina no códon 194 dentro do domínio *T-BOX*. Essa alteração não foi encontrada em 384 indivíduos controle. Nesse trabalho, a ação desta e de outras mutações na atividade de transcrição do gene *TBX1* também foi analisada. Além disso, Zweier et al em 2007 [22] concluíram que mutações no gene *TBX1* do tipo ganho de função podem resultar em um espectro fenotípico semelhante aos causados pela haploinsuficiência gênica devido a mutações de perda de função ou deleções.

O gene *TBX1* é um gene dose-dependente e a dose pode ser afetada por modificadores genéticos e ambientais [27, 28]. Estudos apontam que o padrão de expressão do fator de crescimento de fibroblasto 8, o gene *FGF8*, é alterado em mutantes *TBX1*<sup>-/-</sup> e sua expressão é abolida no endoderma faríngeo [29]. Hu et al em 2004 [30] relataram que o gene *FGF8* é ativado pelo gene *TBX1* durante sua expressão no trato cardíaco. Além disso, existem evidências que mostram a associação de alterações no gene *FGF8* ao fenótipo da SVCF em humanos, baseado em modelos animais [31].

O gene *FGF8* pertence à família dos fatores de crescimento de fibroblastos (*FGFs*), a qual desempenha um papel importante no desenvolvimento geral do embrião e no desenvolvimento de tipos celulares específicos [32, 33, 34], destacando a função de sinalizadores intracelulares [35]. Um estudo recente demonstrou que os fatores 8, 4 e 2

possuem tanto um efeito estimulatório como inibitório na diferenciação das células dos membros em formação, do processo frontonasal e do arco mandibular [36].

O gene *FGF8* (Figura 3), mapeado no cromossomo 10q24 [37, 38] é expresso principalmente no período fetal (durante a gastrulação), regionalização do cérebro, alongação axial, organogênese dos membros, face e na esquelotogênese [39, 40, 41], no sistema reprodutor (ovário, mamas, testículos e próstata), no sistema urinário e também realiza a mediação do crescimento de células cancerosas através de sua ação hormonal [42, 43].



**Figura 3.** Localização cromossômica e esquema do gene *FGF8*.

Fonte: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000184058;r=22:19744226-19771116](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000184058;r=22:19744226-19771116) acessado em 08 de maio de 2011.

Há relatos de que possivelmente há interação genética entre o *TBX1* e o *FGF8* na formação dos arcos aórticos evidenciando a participação dos mesmos na Tetralogia de Fallot, enquanto outros alegam que o gene *FGF8* está relacionado apenas a formação cardíaca [44].

A baixa expressão do gene *FGF8* em modelo animal (rato) mostra uma variedade fenotípica nos sistemas faríngeos e cardiovasculares, sugerindo que podem ser possíveis fenocópias da SVCF em humanos [31].

Frank et al em 2002 [31] sugerem que a baixa expressão do gene *FGF8* contribui como um modificador no fenótipo da SVCF ou pode ser responsável pelas características clínicas da síndrome nos casos em que há ausência da microdeleção 22q11.2. A inativação completa desse gene junto com a diminuição da função de outros genes remanescentes em camundongos fornece um padrão fenotípico semelhante aos observados em humanos com SVCF. De acordo estes autores, o gene *FGF8* pode estar relacionado diretamente com a participação na via molecular afetada pela região microdeletada do 22q11.2 ou pode estar relacionado com o funcionamento de uma via paralela necessária para o desenvolvimento normal dos arcos faríngeos e tecidos que possuem a crista neural como precursor.

A alta prevalência da SVCF e a heterogeneidade das manifestações clínicas que acomete o indivíduo justificam a investigação laboratorial para realização de condutas clínicas antecipatórias dos afetados e aconselhamento genético da família. O método laboratorial mais utilizado para o diagnóstico dessa condição, até o momento, é a técnica de *Hibridação in situ com Fluorescência (FISH)* com sonda específica para a região cromossômica 22q11.2, que permite a detecção de microdeleções em cerca de 80% dos casos [11, 12, 21].

Apesar da deleção 22q11.2 ser a etiologia mais prevalente nos casos de SVCF, cerca de 10 a 20% dos pacientes, nos quais essa microdeleção não é identificada, ficam sem diagnóstico conclusivo, impossibilitando o aconselhamento genético específico.

A técnica de *MLPA* foi desenvolvida para testar diferentes *loci* cromossômicos em um único experimento. Em um estudo realizado por Fernandez et al em 2005 [21], a técnica de *MLPA* mostrou-se uma ferramenta sensível, eficiente e rápida para a triagem de deleções em pacientes com SVCF.

Uma vez que alterações dos genes *TBX1* e *FGF8*, em modelos animais, causam defeitos semelhantes às manifestações clínicas dos pacientes com SVCF, estes se tornaram fortes genes candidatos a serem estudados nos casos negativos para microdeleção em 22q11.2. Mutações no gene *TBX1* já foram descritas como responsáveis pelo fenótipo em

diferentes estudos [22]. No entanto, até o momento, o gene *FGF8* ainda não foi estudado em pacientes com SVCF sem microdeleção e mutações no gene *TBX1*.

A investigação de aspectos ainda não esclarecidos na gênese da SVCF, como os papéis dos genes *TBX1* e *FGF8*, poderá trazer à luz novas informações sobre esta condição clínica e contribuir no entendimento da etiológica da SVCF. Além disso, contribui para o trabalho de diferentes profissionais, dando suporte na avaliação clínica para que a partir desta possa ser encaminhado para o diagnóstico laboratorial.

## ***OBJETIVOS***



## 2. Objetivos

O **objetivo geral** deste estudo é de contribuir para o esclarecimento genético molecular para os quadros clínicos sugestivos de SVCF.

Quanto aos **objetivos específicos**, são eles:

- 1) Investigar as causas genéticas em pacientes com suspeita clínica de SVCF por meio de cariótipo e triagem de microdeleções, utilizando as técnicas de *MLPA* e *FISH*;
- 2) Verificar a presença de alterações nas seqüências codificantes dos genes *TBX1* e *FGF8* em pacientes sem deleção 22q11.2;



## ***CASUÍSTICA e MÉTODOS***



### 3. Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, sob o nº. 487/2009 em 23/06/2009, conforme anexo I. Após a anuência do participante ou de seu responsável, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

Foram incluídos neste estudo, 109 indivíduos com suspeita clínica da SVCF atendidos em vários centros participantes do projeto Crânio-Face Brasil no período de março de 2009 a março de 2011.

Tendo em vista a heterogeneidade clínica, o critério de inclusão para a composição da amostra não utilizou número mínimo de sinais clínicos. Foram incluídos pacientes com suspeita clínica da Síndrome Velocardiofacial formada por médico geneticista, de acordo com a rotina dismorfológica padrão [45]. Utilizou-se ficha padronizada (*checklist*) de coleta de dados clínicos e exames complementares conforme o anexo III.

Para a realização da técnica de seqüenciamento automático das regiões codificantes dos genes *TBX1* e *FGF8*, utilizou-se como critério de inclusão indivíduos com resultados normais de cariótipo, resultados negativos para a deleção em 22q11.2 pelas técnicas de *MLPA* e *FISH* e reavaliação clínico-dismorfológica com hipótese clínica de SVCF persistente, assim selecionando 31 indivíduos.

### 4. Métodos

Neste estudo foram utilizadas as técnicas de cariótipo com bandamento G, *MLPA*, *FISH*, seqüenciamento e *SNParray*. Os exames de cariótipo e *FISH* foram realizados no Laboratório de Citogenética Humana e a técnica de *MLPA*, no Laboratório de Genética Molecular – ambos pertencentes ao Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

As técnicas de seqüenciamento automático e *SNParray* foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências – pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas - SP.

#### ***4.1. Análise Citogenética por bandamento G***

Para a análise cromossômica dos indivíduos, a fim de identificar outras alterações cromossômicas relacionadas ou não com a SVCF, foi utilizado o exame de cariótipo realizado por meio de cultura de linfócitos obtida pela técnica descrita por Moorhead et al em 1960 [46], com modificações.

Coleta da amostra – Foram coletados de 2 a 5mL de sangue através de punção venosa com seringa previamente heparinizada (0,2 – 0,4 mL de heparina sódica), ou em tubos de coleta a vácuo contendo heparina sódica (tubos com tampa verde), após assepsia local com álcool 70%.

Preparo da Cultura – Foram adicionados de 0,5mL a 1mL de sangue total heparinizado a frascos de cultura contendo 5mL de meio de cultura RPMI contendo 15% de soro fetal bovino e 0,2mL de fitohemaglutinina. Os frascos de cultura foram incubados a 37°C por 72 horas. Duas horas antes do fim desse período, foram acrescentados 0,02mL de brometo de etídio 1mg/mL e 40 minutos antes do término da cultura foi adicionado 0,04mL de colquicina  $4 \times 10^{-5}M$  à cultura. Após o final do período de incubação foi realizada a hipotonia direta utilizando-se 06mL de solução hipotônica de KCl 0,075M a 37°C por 30 minutos. Após a hipotonia foi realizada a fixação utilizando-se como fixador metanol + ácido acético (3:1).

Preparação das lâminas – para a confecção das lâminas, as mesmas foram colocadas em etanol a 70% por alguns minutos, após colocadas em água deionizada, escorridas e em seguida foram pingadas, com pipetas *Pasteur* de duas a três gotas do material, após fixação, sobre as lâminas. As lâminas foram colocadas em uma estufa na temperatura de aproximadamente 55°C durante alguns minutos e foram observadas em microscópio de contraste de fase.

Bandamento G – foi realizado de acordo com a técnica descrita por Sanchez et al em 1973, com pequenas modificações. As lâminas foram deixadas em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas e em seguida incubadas em tampão fosfato 0,06M pH 6,8 em banho-maria a 37°C por um período de 15 minutos. Após a incubação, as lâminas foram coradas com eosina azul de metileno segundo Wright diluído em tampão fosfato na proporção de 1:3 por cinco minutos.

Análise Cromossômica – Foram analisadas 20 metáfases de cada indivíduo em

microscópio óptico comum da *Olympus*<sup>®</sup> e as imagens foram capturadas utilizando o *software FISHView* da *Applied Spectral Imaging*<sup>®</sup>. A resolução obtida foi de 400 a 550 bandas.

Armazenamento do material – Após as análises, todos os *pellets* foram armazenados em tubos “*ependorf*” contendo solução fixadora, à temperatura de -20°C, para a realização da *FISH*.

O protocolo detalhado encontra-se no anexo IV.

#### **4.2. Obtenção das amostras e extração de DNA**

Para obtenção das amostras de DNA genômico foi utilizado o método do fenol-clorofórmio [47].

Foram coletados de 10 a 20 mL de sangue periférico em tubos cônicos, contendo como anti-coagulante 1,0mL de EDTA 10 % pH 8,0.

O protocolo detalhado encontra-se no anexo V.

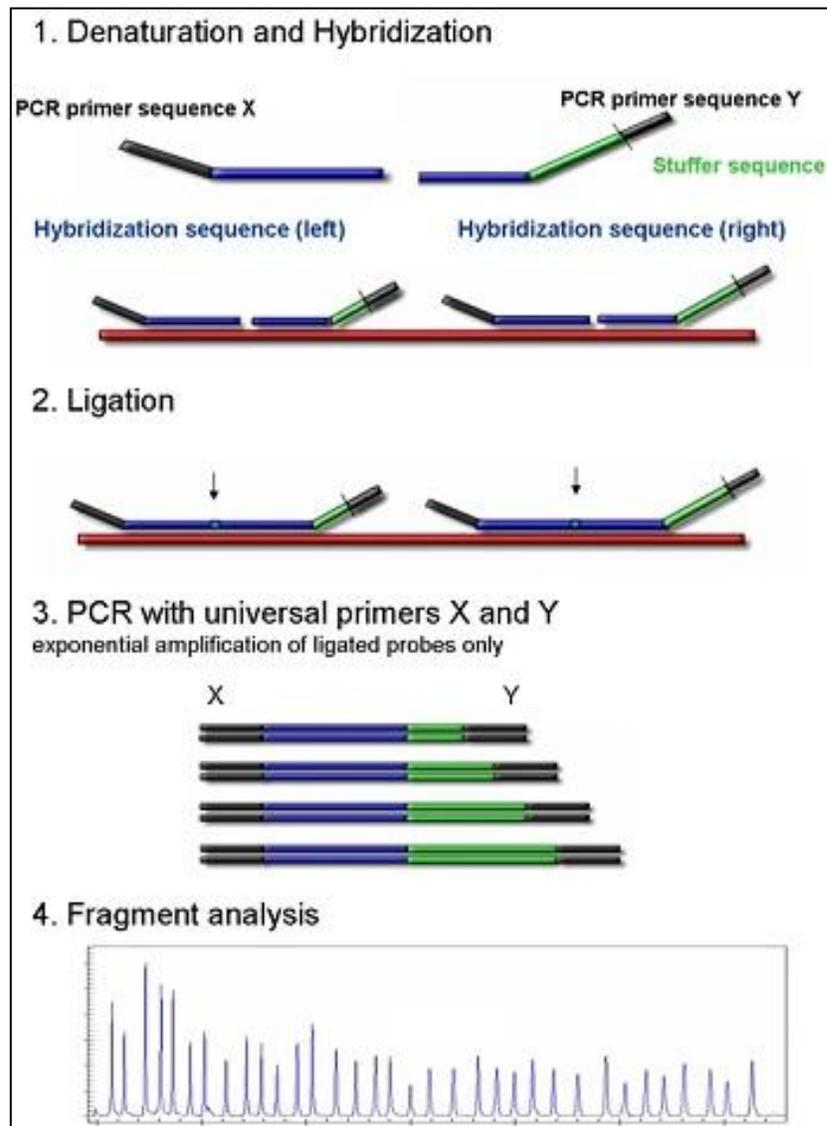
#### **4.3. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)**

Foi utilizado o Kit *P250-A1 DiGeorge (MRC-Holland MLPA*<sup>®</sup>) que contém 32 fragmentos (sondas) para o cromossomo 22, das quais 14 estão localizadas na região mais comumente deletada de 3Mb, outras em regiões de deleções atípicas ou utilizadas como controle e 16 para outros *loci* em diferentes cromossomos que funcionam como controle, ou cujas deleções também foram relatadas em pacientes com características clínicas da SVCF, conforme a tabela 1.

**Tabela 1.** Fragmentos que compõe o Kit de *MLPA P250-A1 DiGeorge* e respectivas localizações das sondas no DNA genômico.

| <b>SALSA MLPA P250-A1 DiGeorge probemix</b> |                                                                                   |                                                        |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Length (nt)</b>                          | <b>SALSA MLPA probe</b>                                                           | <b>Chromosomal position</b><br>other probes      22q11 |
| 64-70-76-82                                 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA          |                                                        |
| 88-92-96                                    | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation |                                                        |
| 100                                         | X-fragment: Specific for the X chromosome                                         |                                                        |
| 105                                         | Y-fragment: Specific for the Y chromosome                                         |                                                        |
| <b>130</b>                                  | <b>PPIL2 probe 7529-L04870</b>                                                    | <b>22q11 D-E</b>                                       |
| 136                                         | Reference (EHMT1) probe 5059-L07380                                               | 9q34.3                                                 |
| <b>142</b>                                  | <b>SLC25A18 probe 5457-L07613</b>                                                 | <b>22q11 CES</b>                                       |
| <b>148</b> ✕                                | <b>DGCR8 probe 8475-L08486</b>                                                    | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| 154                                         | Reference (EHMT1) probe 5058-L07382                                               | 9q34.3                                                 |
| <b>160</b> ✕#                               | <b>HIRA probe 1214-L02328</b>                                                     | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| <b>166</b>                                  | <b>SNRPD3 probe 8481-L08492</b>                                                   | <b>22q11 G-H</b>                                       |
| <b>172</b> ✕                                | <b>TBX1 probe 5408-L07614</b>                                                     | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| <b>178</b>                                  | <b>MICAL3 probe 5458-L04861</b>                                                   | <b>22q11 CES</b>                                       |
| 184                                         | Reference (KLKB1) probe 1217-L00694                                               | 4q35                                                   |
| <b>190</b> ✕                                | <b>CLTCL1 probe 5462-L05809</b>                                                   | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| <b>196</b> ✕                                | <b>CLDN5 probe 1218-L06270</b>                                                    | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| <b>202</b> ✕                                | <b>ZNF74 probe 5927-L07395</b>                                                    | <b>22q11 B-C</b>                                       |
| <b>208</b> ✕                                | <b>GP1BB probe 5464-L10114</b>                                                    | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| <b>214</b>                                  | <b>GNAZ probe 8478-L08489</b>                                                     | <b>22q11 E-F</b>                                       |
| <b>220</b>                                  | <b>SMARCB1 probe 5928-L07969</b>                                                  | <b>22q11 F-G</b>                                       |
| <b>226</b>                                  | <b>USP18 probe 7528-L04863</b>                                                    | <b>22q11 CES</b>                                       |
| 232                                         | Reference (SHANK3) probe 6787-L07383                                              | 22q13                                                  |
| <b>238</b> ✕                                | <b>TXNRD2 probe 1223-L05814</b>                                                   | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| <b>247</b>                                  | <b>RAB36 probe 8486-L09342</b>                                                    | <b>22q11 E-F</b>                                       |
| 254                                         | Reference (RPH3AL) probe 1735-L07385                                              | 17p13.3                                                |
| <b>259</b>                                  | <b>RTDR1 probe 8484-L09139</b>                                                    | <b>22q11 E-F</b>                                       |
| 268                                         | Reference (GATA3) probe 1225-L09140                                               | 10p15 DGR2                                             |
| 274                                         | Reference (GATA4) probe 1226-L03844                                               | 8p23.1                                                 |
| <b>283</b> ✕                                | <b>KLHL22 probe 1227-L05815</b>                                                   | <b>22q11 B-C</b>                                       |
| <b>292</b>                                  | <b>TOP3B probe 5930-L04871</b>                                                    | <b>22q11 D-E</b>                                       |
| <b>301</b> ✕                                | <b>TBX1 probe 7054-L06663</b>                                                     | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| <b>310</b>                                  | <b>HIC2 probe 5931-L04869</b>                                                     | <b>22q11 D-E</b>                                       |
| <b>319</b> ✕                                | <b>PCQAP probe 1231-L05816</b>                                                    | <b>22q11 B-C</b>                                       |
| 330 †                                       | FRG1 probe 6766-L08754                                                            | 4q35                                                   |
| <b>337</b>                                  | <b>IL17RA probe 1082-L00660</b>                                                   | <b>22q11 CES</b>                                       |
| <b>343</b>                                  | <b>RAB36 probe 5932-L04872</b>                                                    | <b>22q11 E-F</b>                                       |
| 349                                         | Reference (DKFZp566) probe 1232-L07388                                            | 10p15 DGR2                                             |
| <b>355</b>                                  | <b>BID probe 1767-L07389</b>                                                      | <b>22q11 CES</b>                                       |
| 364                                         | Reference (AI651963) probe 1234-L00781                                            | 10p15 DGR2                                             |
| <b>373</b> ✕                                | <b>SNAP29 probe 1235-L00773</b>                                                   | <b>22q11 C-D</b>                                       |
| 382                                         | Reference (CUGBP2) probe 1522-L00952                                              | 10p15 DGR2                                             |
| 391 †                                       | Reference (CRK) probe 0444-L00007                                                 | 17p13.3                                                |
| <b>400</b>                                  | <b>SMARCB1 probe 5933-L05812</b>                                                  | <b>22q11 F-G</b>                                       |
| 409                                         | Reference (GEMIN4) probe 1238-L07390                                              | 17p13.3                                                |
| <b>418</b> ✕                                | <b>LZTR1 probe 1521-L00951</b>                                                    | <b>22q11 C-D</b>                                       |
| 427                                         | Reference (MSRA) probe 1240-L00787                                                | 8p23.1                                                 |
| 434                                         | Reference (RPH3AL) probe 4081-L03465                                              | 17p13.3                                                |
| 445                                         | Reference (ARSA) probe 1093-L00661                                                | 22q13                                                  |
| <b>454</b>                                  | <b>RTDR1 probe 8479-L08490</b>                                                    | <b>22q11 E-F</b>                                       |
| <b>463</b> ✕                                | <b>CDC45L probe 5463-L05808</b>                                                   | <b>22q11 A-B</b>                                       |
| 472                                         | Reference (PPP1R3B) probe 1243-L07392                                             | 8p23.1                                                 |
| 481                                         | Reference (NEBL) probe 8480-L08491                                                | 10p12 DGR2                                             |

A técnica de *MLPA* se baseia na quantificação das sondas que se hibridam na sequência alvo e são posteriormente amplificadas por *primer* universal (Figura 4). Os produtos de amplificação são submetidos a eletroforese capilar e a análise consiste na comparação do padrão de picos entre as amostras referência e as amostras a serem investigadas. A partir da análise é possível identificar deleções ou duplicações das sequências alvo.



**Figura 4.** Esquemática das etapas da técnica de *MLPA*.

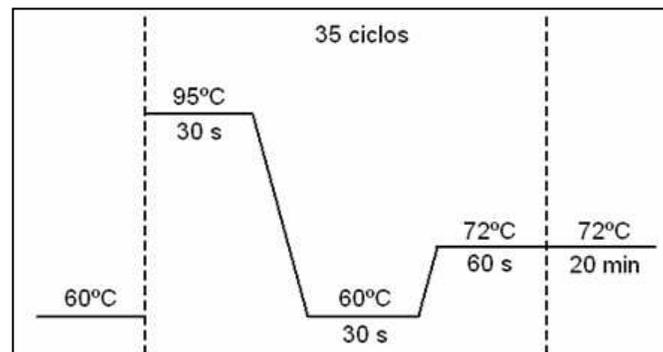
Fonte: <http://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZNWLtcfv9pVl/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y> acessado em 15/05/2011

A técnica de *MLPA* foi realizada segundo o protocolo original descrito por Schouten et al em 2002 [48] com pequenas modificações. Além do DNA genômico dos pacientes, foram utilizados quatro DNAs controles (um com e três sem deleção em 22q11.2) conforme recomendação do fabricante.

Para a desnaturação do DNA e hibridização das sondas, cada amostra de DNA utilizada para o experimento foi diluída em TE 1X, na proporção de aproximadamente 30ng/μL e mantida em termociclador em temperatura de 98°C por 5 minutos. Posteriormente, a 25°C, foram acrescentados 1,5 μL de *SALSA Probe-mix* e 1,5 μL de *MLPA buffer*. Após ressuspensão, foi mantida a 95°C por 1 minuto e incubada a 60°C de 12 a 16 horas.

Para a reação de ligação a temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C, quando 32 μL de *Mix Ligase-65* foram acrescentados a cada amostra, com posterior ressuspensão. Em seguida, cada amostra permaneceu incubada a uma temperatura de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos.

A reação de *PCR* foi realizada em novo tubo (para cada amostra) contendo 4 μL *SALSA PCR buffer*, 26 μL de H<sub>2</sub>O, 10 μL da reação de ligação de *MLPA* e mantido em termociclador a 60°C, conforme descrito na figura 5.



**Figura 5.** Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos.

Em seguida, 10 μL de *Mix Polymerase* foram acrescentados a cada tubo, podendo assim inicializar a reação de *PCR*.

Na separação e visualização dos produtos da amplificação foram utilizados dois sistemas de eletroforese em capilar, devido à substituição do equipamento no departamento onde se realizaram os experimentos.

Em primeiro momento, foram misturados 1,0µL da reação de *PCR*; 0,25 µL de *ET-550R (sizer)* e 7 µL de *Tween-20 0,1%* para cada amostra em microplaca. A separação dos produtos amplificados foi no sistema de eletroforese capilar automático *MegaBACE 1000™ (Amersham-Pharmacia®)*.

As análises dos resultados foram realizadas com o *software MegaBACE™ Fragment Profiler*. Em seguida a análise dos dados foi realizada com o programa *Excel (Microsoft®)*, em macros específicos fornecidos *online* pelo fabricante do kit de *MLPA (MRC-Holland®)*.

Após a substituição do equipamento *MegaBACE 1000™ (Amersham-Pharmacia®)*, pelo sistema de eletroforese capilar *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer®* estendido para 24 capilares, foram misturados 0,7 µL da reação de *PCR*; 0,3 µL *size standard LIZ 500* e 9µL de *Formamida Hi-Di*, em seguida, desnaturados a 80°C por 2 minutos.

As análises dos resultados foram realizadas com o *software GeneMapper® da Applied, Biosystems™*. Em seguida as análises dos dados foram realizadas com o programa *Excel (Microsoft®)*, em macros específicos fornecidos *online* pelo fabricante do kit de *MLPA (MRC-Holland®)*.

O protocolo detalhado encontra-se no anexo VI.

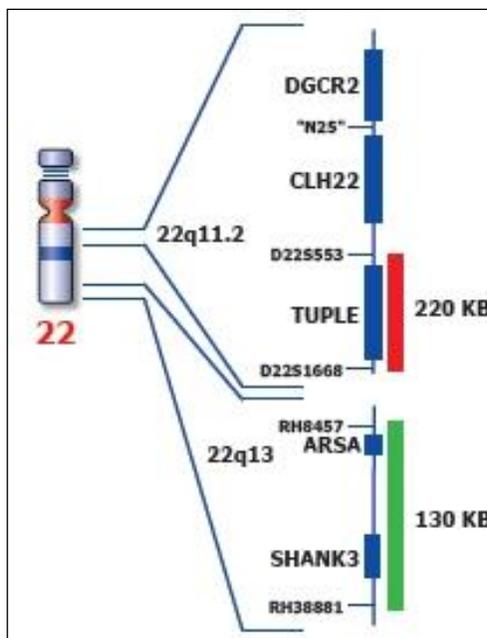
#### **4.4. FISH (Hibridação in situ com Fluorescência)**

Esta técnica permite o pareamento de segmentos de DNAs marcados por fluorescência (sondas) com seqüências de nucleotídeos complementares dentro da célula, permitindo verificar se a célula possui a seqüência, a quantidade de cópias que possui e a localização em que se encontra a mesma [49].

A *FISH* foi utilizada para confirmar os resultados obtidos pela técnica de *MLPA*. Para a realização da técnica foram utilizadas suspensões celulares obtidas a partir de cultura de linfócitos. O método utilizado foi o descrito por Pinkel et al em 1986 [50], com

modificações.

Na investigação da amostra utilizou-se sondas do tipo *locus-específica* para região 22q11.2 – DiGeorge/VCFS, na banda 22q11.2 (que compreende o gene *TUPLE1* com espectro *red*) e uma sonda controle telomérica na banda 22q13 (que compreende os genes *ARSA* e *SHANK3* com espectro *green*) da *Kreatech Diagnostics*®.



**Figura 6.** Regiões que compõe a sonda *TUPLE1*, utilizada na técnica de *FISH*.

Fonte : <http://www.kreatech.com/Default.aspx?tabid=307> acessado em 08/05/2011.

Na preparação das lâminas foram utilizadas suspensões de linfócitos de sangue periférico, estocadas em solução de metanol e ácido acético (3:1) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes do procedimento, as lâminas permaneceram a  $37^{\circ}\text{C}$  em média 24 horas. Em seguida, foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  de 20 minutos á 1 hora em solução de 2XSSC (pH 7,0). Na seqüência, as lâminas passaram por uma série de banhos em etanol (70%, 85% e 100%), por um minuto em cada concentração e foram secadas naturalmente em temperatura ambiente.

Após essa etapa, a sonda foi aplicada em uma área previamente selecionada e marcada com caneta diamante. Em seguida, a área de hibridação foi coberta com uma lamínula e selada com cola especial. Na seqüência, as lâminas foram aquecidas a  $75^{\circ}\text{C}$  por

sete minutos para a desnaturação dos cromossomos e do DNA da sonda. A hibridação ocorreu em caixa umedecida a 37°C por aproximadamente 16 horas. Após a hibridação, removeu-se a lamínula e iniciou-se um processo de lavagem rápida da lâmina mantendo-as sem agitação por dois minutos na solução 2X SSC/0,1% *Tween 20*, por um minuto em solução 0,4XSSC/0,3% *Tween 20* a 73 °C e por 30 segundos 2X SSC/0,1% *Tween 20* em temperatura ambiente. Deixou-se secar em temperatura ambiente e em seguida, foi aplicado o contracolorante *DAPI*.

As soluções utilizadas e o protocolo padronizado da técnica de *FISH* estão no anexo VII.

Foram analisadas 20 metáfases por amostra, em microscópio de fluorescência *BX51-BF-II/BX2 da Olympus*<sup>®</sup> com filtros de fluorescência adequados e as imagens foram capturadas utilizando o *software FISHView da Applied Spectral Imaging*<sup>®</sup>.

#### **4.5. Seqüenciamento dos genes *TBX1* e *FGF8***

Os oligonucleotídeos utilizados foram os desenhados por Simioni em 2008 [51] e Freitas em 2009 [52], e seguiram as recomendações de Mc Pherson e Moller em 2000 [53] de possuir tamanho de 18 – 30 nucleotídeos; possuir seqüências que não formem estruturas secundárias e que os pares de *primers* possuam temperaturas de anelamento semelhantes.

A partir do DNA genômico, foi realizada a técnica de reação em *cadeia da polimerase (PCR)* para amplificação dos fragmentos de interesse. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1%. Para a amplificação dos fragmentos de interesse desses genes, foram utilizados protocolos já anteriormente padronizados no laboratório por Simioni [51] e Freitas [52], com pequenas modificações.

##### **4.5.1. Amplificação dos fragmentos do gene *TBX1***

Os protocolos para as reações de *PCR* dos exons 1,5,6 e 9B incluíram tampão com KCl (10X), MgCl<sub>2</sub> (25µM), dNTP (2µM), *primer* (5pmoles), DMSO<sub>4</sub>, *Taq* DNA Polimerase (5U), DNA (200ng/µl) e água até completar o volume final de 15µL. No caso

dos exons 2, 3, 4, 7, 8 e 9C foi utilizado um tampão específico da Qiagen. Os componentes e volumes para a amplificação de cada exon encontram-se no anexo VIII.

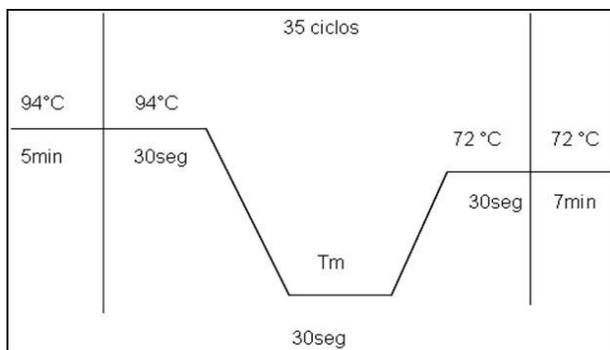
Nos éxons 2, 4, e 8 foram necessárias realizações de novos gradientes para encontrar a temperatura adequada para a amplificação de cada exon, porém não se obteve sucesso, fazendo necessário a utilização do ciclo TD - *touch down* de 64°C a 58°C.

Na tabela 2 estão representadas as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados e as respectivas temperaturas de anelamento.

**Tabela 2.** Seqüências dos oligonucleotídeos e suas temperaturas de anelamento.

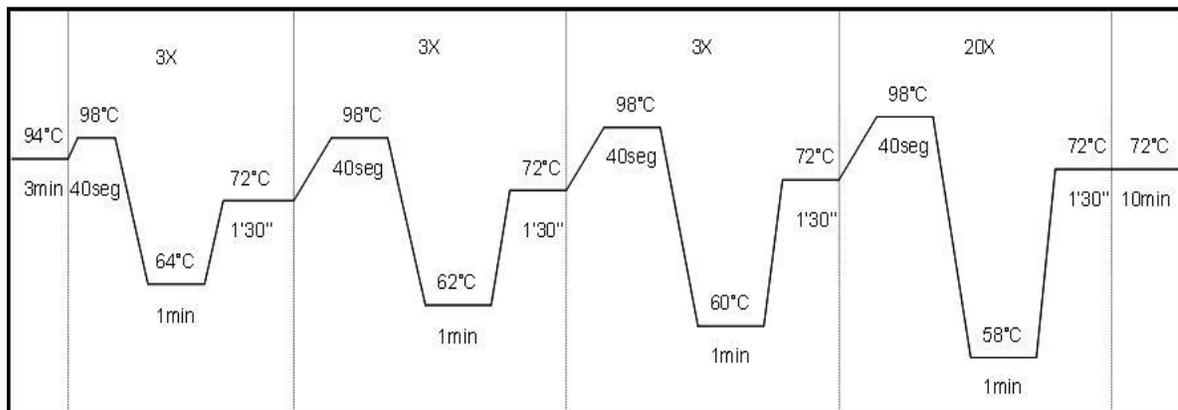
| Exon | Seqüência do primer (5'-3')                                                  | Tamanho (pb) | TM (°C)    |
|------|------------------------------------------------------------------------------|--------------|------------|
| 1    | <b>forward:</b> CTCCCAGTCAGGCCTCCTAT<br><b>reverse:</b> CCCACACTCCTCTTCACCTG | 243          | 59         |
| 2    | <b>forward:</b> CCATGACGCCATAATCCTCT<br><b>reverse:</b> CTTCTCTCTGCCCCAGAA   | 477          | TD 64 - 58 |
| 3    | <b>forward:</b> CAGCTCTCGCATTCTGTC<br><b>reverse:</b> CGGAGGATAGGTGTTAGGA    | 626          | TD 64 - 58 |
| 4    | <b>forward:</b> GCCAAGCTCCCAGTTGAGTA<br><b>reverse:</b> CTGAGAGGGCATGGAGTAGG | 494          | TD 64 - 58 |
| 5    | <b>forward:</b> GCAGCAGAGGGTTCAATCTC<br><b>reverse:</b> TAGCCTCGCAGGGACTCTAA | 458          | 56         |
| 6    | <b>forward:</b> CTCAGACCTCAGCCCATTTC<br><b>reverse:</b> TTTTCCAGAGGCGTTGAATC | 291          | 56         |
| 7    | <b>forward:</b> CTTGGTGCGCTTCTCCTAAC<br><b>reverse:</b> CCCGGCCCTACCTTTCTC   | 354          | TD 64 - 58 |
| 8    | <b>forward:</b> ACTGTGACCCTGAGGACTGG<br><b>reverse:</b> GGGGTAGAGCGCGCACAG   | 248          | TD 64 - 58 |
| 9B   | <b>forward:</b> GATGGTGTGTGAGGCTGATG<br><b>reverse:</b> AGCAGCATAACAGCCATTCT | 499          | 59         |
| 9C   | <b>forward:</b> GACTGGTCGGGGAACACC<br><b>reverse:</b> AACGTATTCCTTGCTTGCCC   | 693          | TD 64 - 58 |

Os exons 1, 5, 6 e 9B foram amplificados de acordo com o ciclo representado a seguir na figura 7.



**Figura 7.** Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos 1, 5, 6 e 9B.

Os éxons 2, 3, 4, 7, 8 e 9C foram amplificados de acordo com o ciclo representado na figura 8.



**Figura 8.** Ciclos utilizados na amplificação do exons 2, 3, 4, 7, 8 e 9C.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%.

#### 4.5.2. Amplificação dos fragmentos do gene *FGF8*

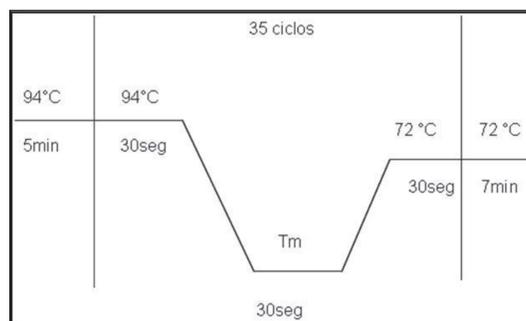
Os protocolos para as reações de *PCR* dos exons 3, 4, 5, e 6 incluíram tampão com KCl (10X), MgCl<sub>2</sub> (25μM), dNTP (2μM), *primer* (5pmoles), DMSO<sub>4</sub>, *Taq* DNA Polimerase (5U), DNA (200ng/μl) e água até completar o volume final de 15μL. No caso dos éxons 1 e 2 (contidos no mesmo par de *primers*) não foi possível encontrar as temperaturas ideais de anelamento e os componentes para a amplificação desses exons. Os componentes e volumes para a amplificação de cada exon encontram-se no anexo IX.

Na tabela 3 estão representadas as seqüências dos oligonucleotídeos utilizados e as respectivas temperaturas de anelamento.

**Tabela 3.** Seqüências dos oligonucleotídeos e suas temperaturas de anelamento.

| Exon | Seqüência do primer (5'-3')                                                   | Tamanho (pb) | Tm (°C) |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------|
| 3    | <b>forward:</b> CTCTCAACATTTGCTCCGTA<br><b>reverse:</b> CCCACCCACGCAAGTCGG    | 243          | 61      |
| 4    | <b>forward:</b> CTGGCGGCTTGGGGCAGT<br><b>reverse:</b> CGGCCAGTGCAGTTGGGAC     | 356          | 59      |
| 5    | <b>forward:</b> TTTGGAGCAGTTGCTGCTGG<br><b>reverse:</b> TACCTTGTTGGGATCAGAGCC | 300          | 57      |
| 6    | <b>forward:</b> GGGTGCCACCTGCTGTCT<br><b>reverse:</b> TCTCTGCGGTCTGGCATTGT    | 417          | 59      |

Os exons 3, 4, 5 e 6 foram amplificados de acordo com o ciclo representado a seguir na figura 9.



**Figura 9.** Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos 3, 4, 5 e 6.

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%.

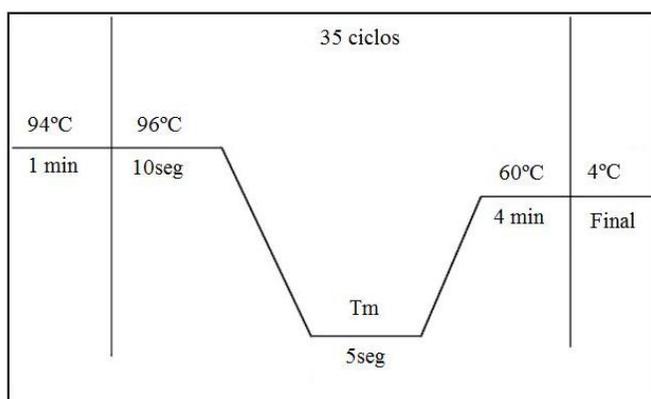
#### 4.6. Seqüenciamento automático

A leitura das seqüências dos genes *TBX1* e *FGF8* foram realizadas no sistema de eletroforese capilar *Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer*® de 16 capilares no Laboratório Nacional de Biociências – pertencente ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas - SP.

Para a análise das seqüências, os fragmentos obtidos pela técnica de *reação em cadeia da polimerase (PCR)* foram diretamente seqüenciados. Foi necessária uma purificação anterior com a enzima *Exo-Sap (GE™)* no intuito de se removerem restos de oligonucleotídeos, *DNTPs*, e outros reagentes que pudessem atrapalhar a qualidade da reação de acordo com as recomendações do fabricante (anexo X).

Utilizou-se o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* da *Applied Biosystems* para seqüenciamento. O protocolo para a reação de seqüenciamento inclui *Big Dye*, *sequencing buffer 5 X - big dye termination*, *PCR*, *Primer* e  $H_2O$ . O protocolo utilizado encontra-se no anexo XI.

A condição para a reação de seqüenciamento está representada na Figura 10.



**Figura 10.** Ciclos utilizados na reação de seqüenciamento no *ABI*.

Posteriormente as reações foram purificadas utilizando-se isopropanol e etanol, também para remover as impurezas que poderiam atrapalhar a qualidade do seqüenciamento. As seqüências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa *Chromas Lite<sup>TM</sup>* para a visualização da seqüência linear do eletroferograma e com o auxílio do programa *Gene Runner®* para comparar as seqüências obtidas com as seqüências de referência dos genes que foram retiradas do banco de dados *Ensembl Genome Browser* disponibilizado através do endereço <http://www.ensembl.org/index.html>.

As alterações encontradas serão pesquisadas em bancos de dados genéticos para verificação de descrições anteriores como, por exemplo, o *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>), o *Single Nucleotide Polymorphism database* (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) e o *Human Gene Mutation database* (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

#### **4.7. SNParray**

Dois pacientes apresentaram alterações cromossômicas não relacionadas à SVCF, necessitando investigação complementar por *SNParray*, que foi realizado em outro projeto de pesquisa complementar (aprovação Comitê de Ética em Pesquisa/FCM/Unicamp nº. 714/2008). Para a realização desta técnica foi utilizado o *GeneChip Genome-Wide Human SNParray 6.0* (*Affymetrix®*) e o kit de reagentes compatível *Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty Assay Kit 5.0/6.0* (*Affymetrix®*).

Essa técnica permitiu observar ganho de material genético, identificação do material adicional e caracterização das aberrações cromossômicas visualizadas no cariótipo, além de alguns pontos de quebra envolvidos.

## ***RESULTADOS***



## 5. Resultados

### 5.1. Dados clínicos

Embora não seja o foco deste estudo, no anexo XII, estão descritos os sinais clínicos mais comuns encontradas em nossa amostra. Estes foram obtidos a partir do formulário de coleta de dados clínicos padronizados (checklist, anexo III).

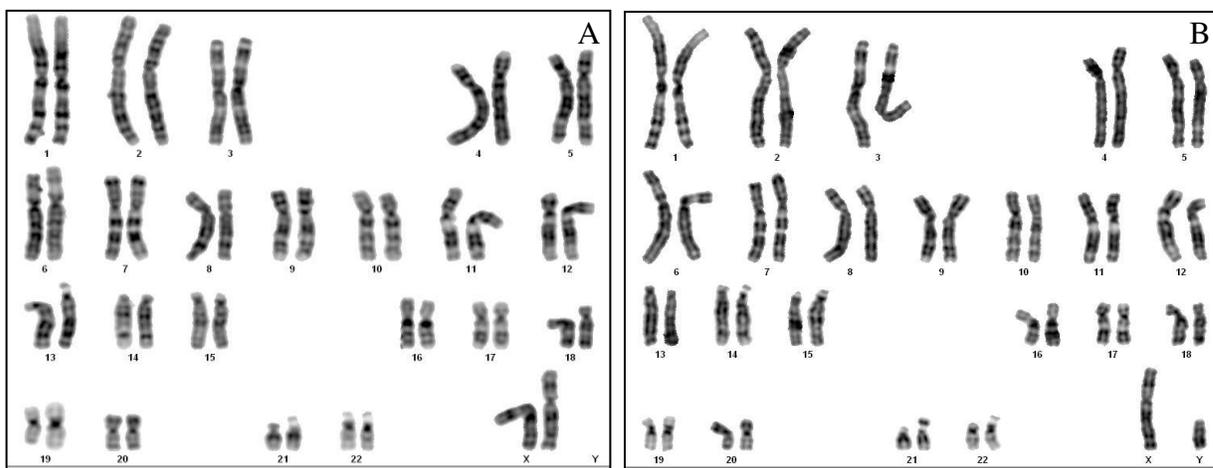
### 5.2. Análise Citogenética por bandamento G

Foram investigados 109 pacientes com suspeita clínica de SVCF. Desses, 37 já tinham resultado de cariótipo normal realizado no serviço de genética clínica de origem. Realizou-se a cultura de linfócito de sangue periférico de 64 pacientes para exame de cariótipo com banda G; em 08 pacientes não foi possível realizar o cariótipo devido à falta de material. Os resultados obtidos da análise esta descrito na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados de cariótipo.

| <i>Resultados</i>                          | <i>Indivíduos</i> | <i>Percentual</i> |
|--------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 46, XY                                     | 43                | 39,5%             |
| 46,XX                                      | 48                | 44,0%             |
| 47,XX,+mar                                 | 02                | 1,8%              |
| 46,XY,inv(9)                               | 03                | 2,8%              |
| 46,XX,9qh+                                 | 01                | 0,9%              |
| 46,XY,16qh+                                | 01                | 0,9%              |
| 46,XY,del(22)(q11q11)                      | 01                | 0,9%              |
| 46,XYder(9)ins(9;15)(q33;q21.1-q22.31)     | 01                | 0,9%              |
| 46,XY,der(11)ins(11;15)(p13;q24q26)        | 01                | 0,9%              |
| Indivíduos que não foi realizado a técnica | 08                | 7,4%              |

Na Figura 11 encontram-se exemplos dos exames de cariótipos sem aberrações cromossômicas detectadas.



**Figura 11.** Em A um cariótipo normal feminino e em B um cariótipo normal masculino.

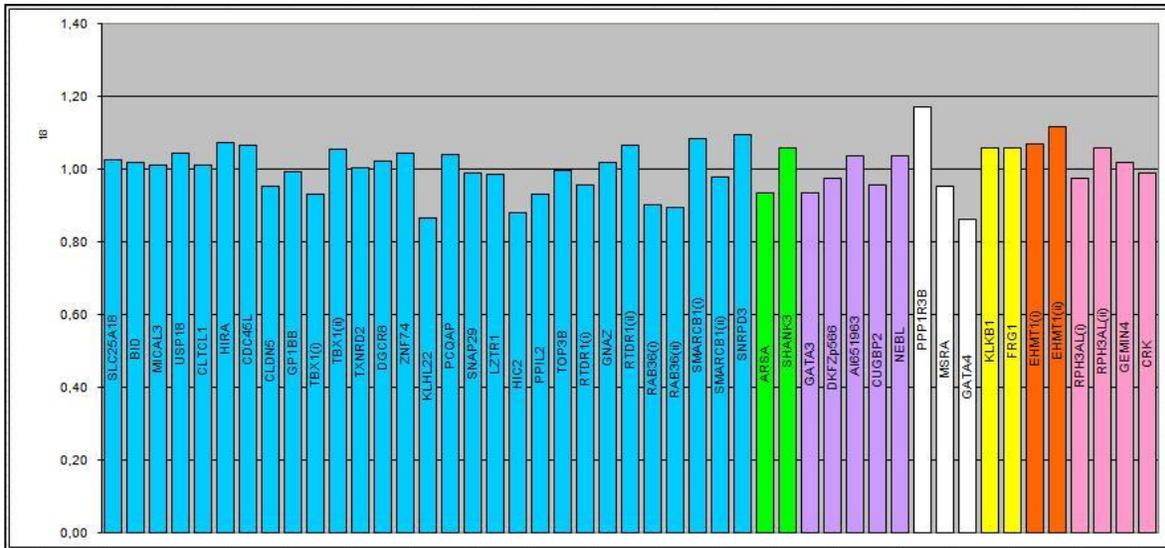
### 5.3. Análise de MLPA

A triagem para a microdeleção 22q11.2 por *MLPA* foi realizada em 106 pacientes, incluindo os 02 casos com alterações cromossômicas não relacionados à SVCF. A tabela 5 descreve os resultados obtidos por esta técnica.

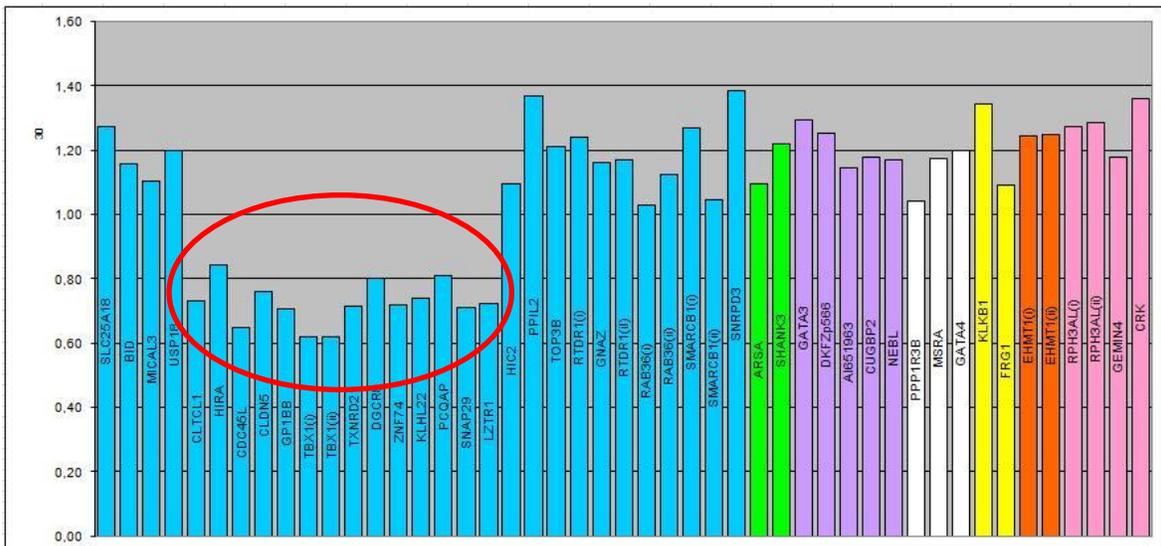
**Tabela 5.** Resultados de *MLPA*.

| <i>Resultados</i>                                            | <i>Indivíduos</i> | <i>Percentual</i> |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Indivíduos com microdeleções típicas (3Mb) na região 22q11.2 | 29                | 26,6%             |
| Indivíduo com microdeleção (3Mb) e duplicação em 22q11.2     | 01                | 0,9%              |
| Indivíduo com microdeleção com pontos de quebra variável     | 01                | 0,9%              |
| Indivíduos com duplicação 8p23                               | 01                | 0,9%              |
| Indivíduos sem microdeleção na região 22q11.2                | 74                | 67,9%             |

Os padrões de análises, obtidos para o para o Kit P250-A1 – *MRC-Holland*<sup>®</sup> encontram-se nas Figuras 12 e 13.



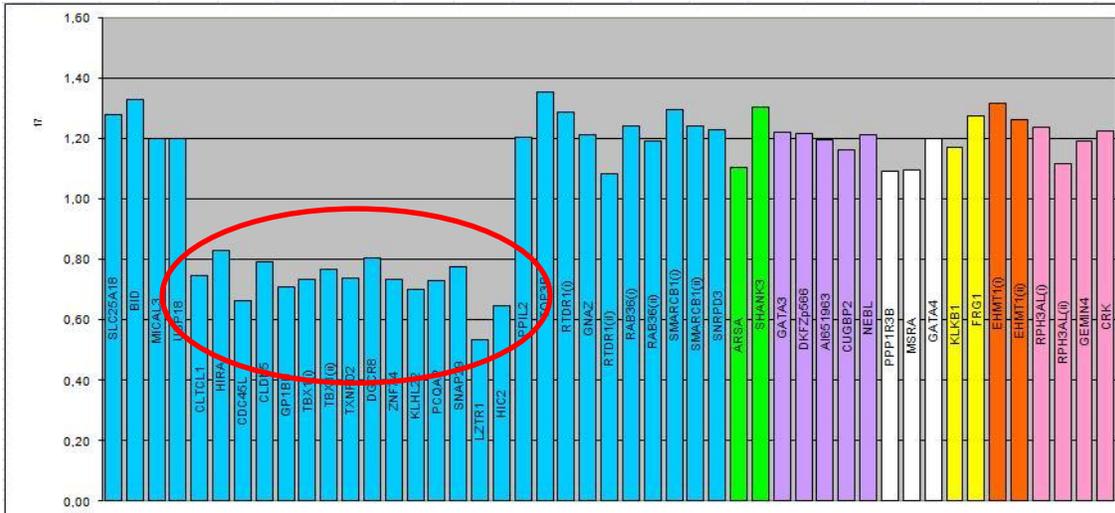
**Figura 12.** Padrão de resultados das análises de indivíduos normais (sem microdeleção da região 22q11.2) para o Kit P250-A1 – *MRC-Holland*<sup>®</sup>.



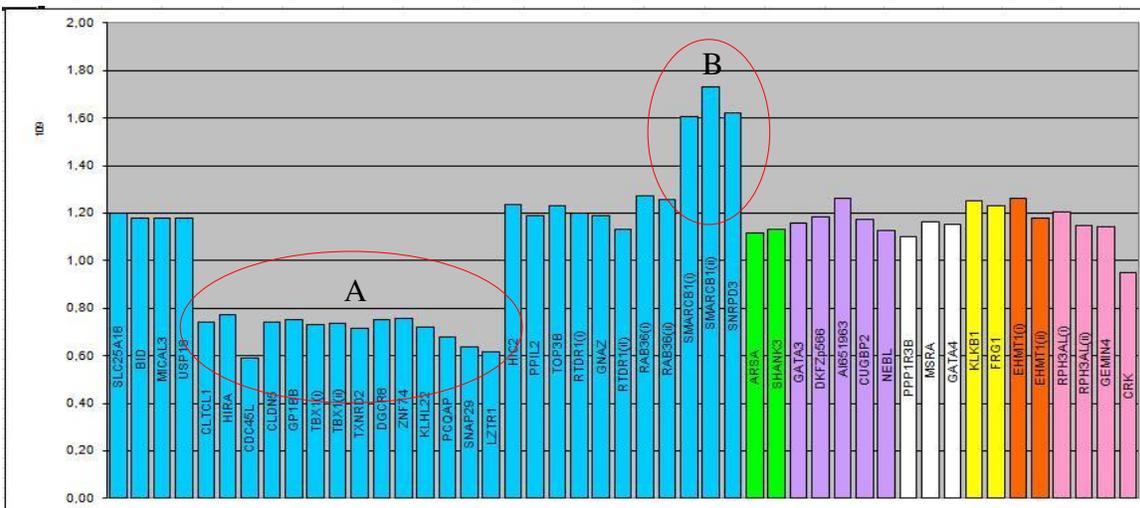
**Figura 13.** Padrão de resultado das análises de indivíduos com deleção típica de aproximadamente 3Mb (sondas *CLTCL1* a *LZTR1*) para o Kit P250-A1 – *MRC-Holland*<sup>®</sup>.

Foram identificadas três alterações diferentes da deleção típica de 3Mb envolvendo a região 22q11.2. Em um caso foi observado duplicação de sondas controle na região 8p23.1 que será descrito posteriormente, e nos outros dois casos foram observados uma

deleção com pontos de quebra variável (Figura 14) e um caso de deleção e duplicação (Figura 15), ambos envolvendo a região 22q11.2, conforme ilustrado abaixo.



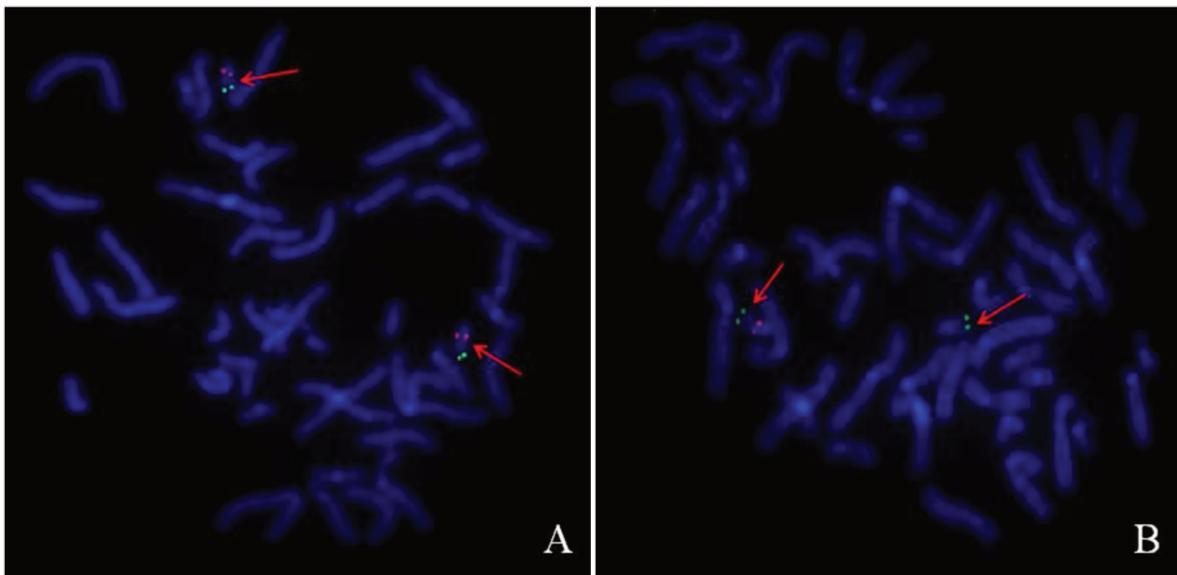
**Figura 14.** Deleção com pontos de quebra variável na região 22q11.2.



**Figura 15.** Deleção de típica 3Mb (A) e duplicação (B) na região 22q11.2.

#### 5.4. Análise de FISH

Foi realizada a técnica de *FISH* utilizando a sonda *TUPLE1* Kreatech Diagnostics® em 87 indivíduos para a confirmação dos resultados obtidos pela técnica de *MLPA*. Em 22 pacientes não foi possível a realização da técnica devido à ausência de material. A sonda *TUPLE1* marca em vermelho a região de interesse 22q11.2 e em verde a região controle 22qter. Abaixo a Figura 16 exemplifica um indivíduo sem a deleção e outro indivíduo com a deleção da região 22q11.2.



**Figura 16.** Indivíduo sem deleção (A) e com deleção (B) da região 22q11.2.

Os resultados obtidos por meio de *FISH* estão descritos na tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados de *FISH*.

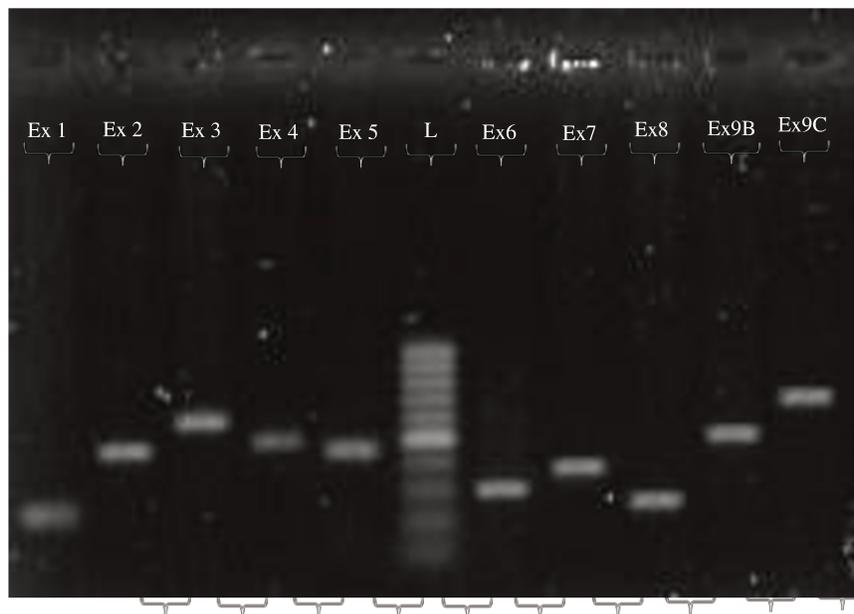
| <i>Resultados</i>                                            | <i>Indivíduos</i> | <i>Percentual</i> |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Indivíduos com microdeleções típicas (3Mb) na região 22q11.2 | 25                | 22,9%             |
| Indivíduos sem microdeleção na região 22q11.2                | 62                | 56,9%             |

### 5.5. Análise de Seqüenciamento

Dos casos negativos para a deleção 22q11.2, utilizou-se como critério de inclusão para o seqüenciamento das regiões codificantes dos genes *TBX1* e *FGF8*, a reavaliação clínico-dismorfológica com hipótese de SCVF persistente, incluindo alguns indivíduos com defeitos cardíacos relacionados à SVCF, selecionando 31 indivíduos.

#### 5.5.1. Gene *TBX1*

A amplificação dos fragmentos de interesse desse gene foi realizada por *PCR* e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, como demonstrada na Figura 17.

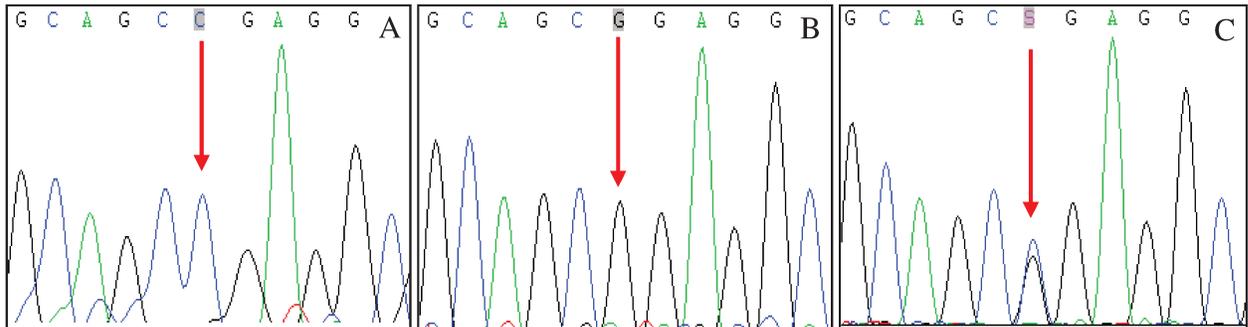


**Figura 17.** Eletroforese dos fragmentos do gene *TBX1*. L: marcador de peso molecular 100pb.

A leitura do seqüenciamento dos éxons 1, 3, 6, 7 e 9B do gene *TBX1* não mostrou alterações entre os indivíduos analisados. As alterações encontradas nos demais éxons estão descritas a seguir.

### 5.5.1.1. Alteração 01 - rs737868

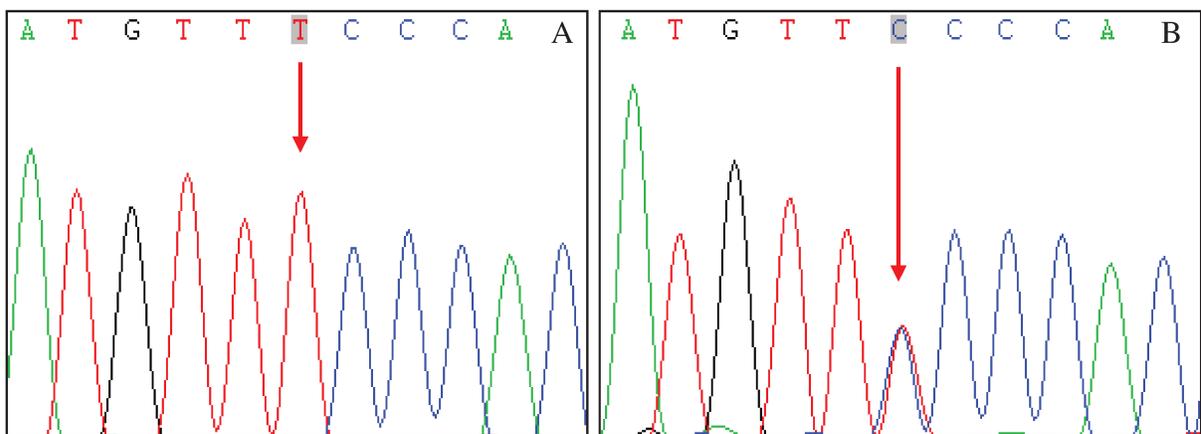
Troca C → G no exon 2 do gene *TBX1* (rs737868). Dois pacientes apresentaram a alteração em homozigose e os outros dois pacientes apresentaram alteração em heterozigose (Figura 18).



**Figura 18.** A – seqüência normal, B – alteração em homozigose e C – alteração em heterozigose.

### 5.5.1.2. Alteração 02 - rs41298814

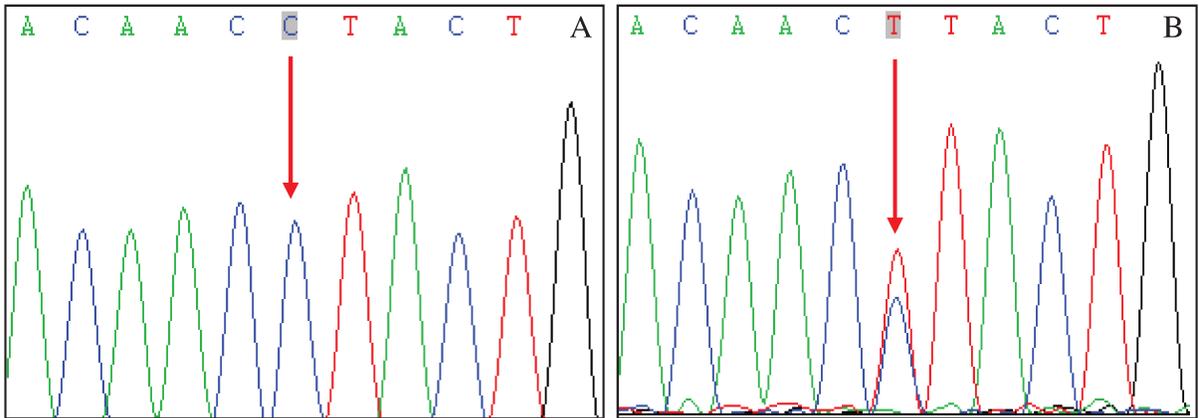
Troca T → C no exon 4 do gene *TBX1* (rs41298814). Entre os analisados, seis pacientes apresentaram a alteração em heterozigose (Figura 19).



**Figura 19.** A – seqüência normal e B – alteração em heterozigose.

### 5.5.1.3. Alteração 03 - rs2301558

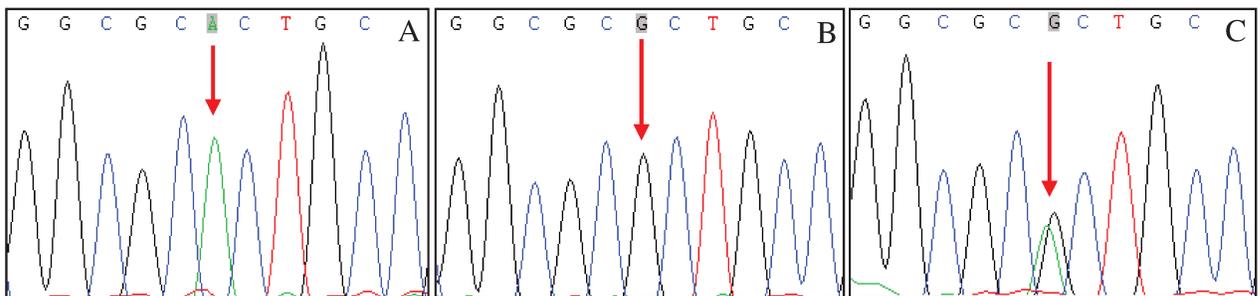
Troca C→T, exon 5 do gene *TBX1* (rs2301558). Dez pacientes apresentaram a alteração em heterozigose (Figura 20).



**Figura 20.** A – seqüência normal e B – alteração em heterozigose.

### 5.5.1.4. Alteração 04 - 41298840

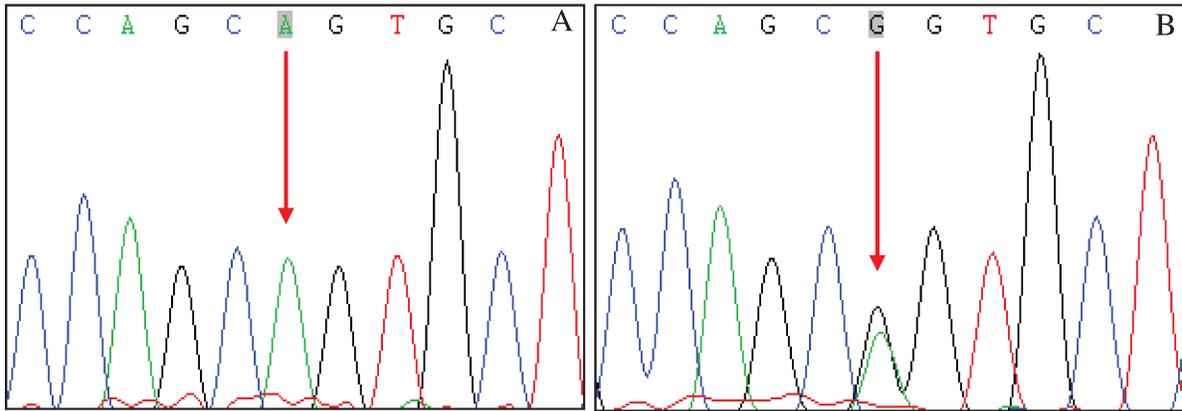
Troca A→G, exon 8 do gene *TBX1* (rs41298840). Dois pacientes apresentaram a alteração em homozigose e outros quatro pacientes apresentaram alterações em heterozigose (Figura 21).



**Figura 21.** A – seqüência normal, B – alteração em homozigose e C – alteração em heterozigose.

#### 5.5.1.5. Alteração 05 - rs13054377

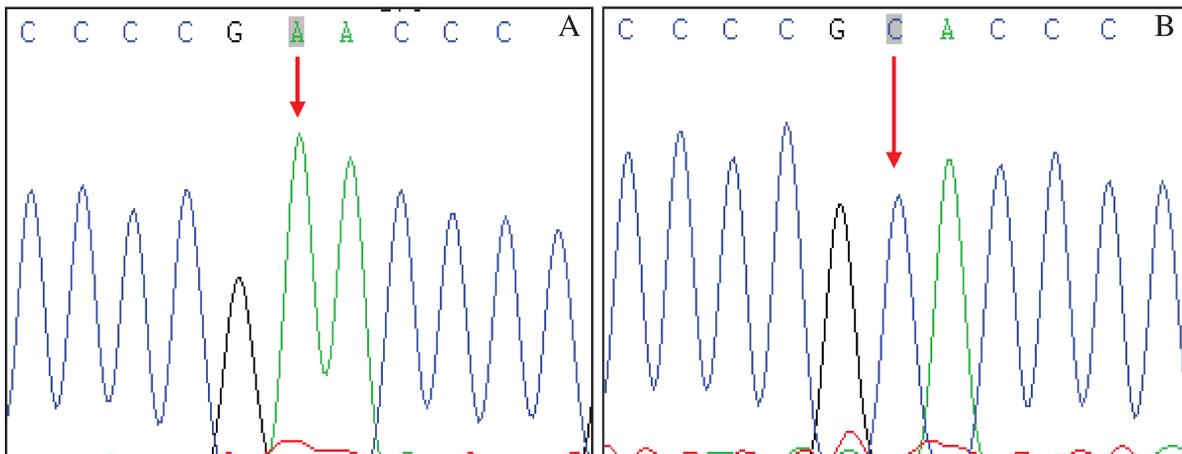
Troca A → G no exon 9C do gene *TBX1* (rs13054377). Um paciente apresentou a alteração em heterozigose (figura 22).



**Figura 22.** A – seqüência normal e B – alteração em heterozigose.

#### 5.5.1.6. Alteração 06 - rs72646967

Troca A → C no exon 9C do gene *TBX1* (rs72646967). Um paciente apresentou a alteração em homozigose (Figura 23).

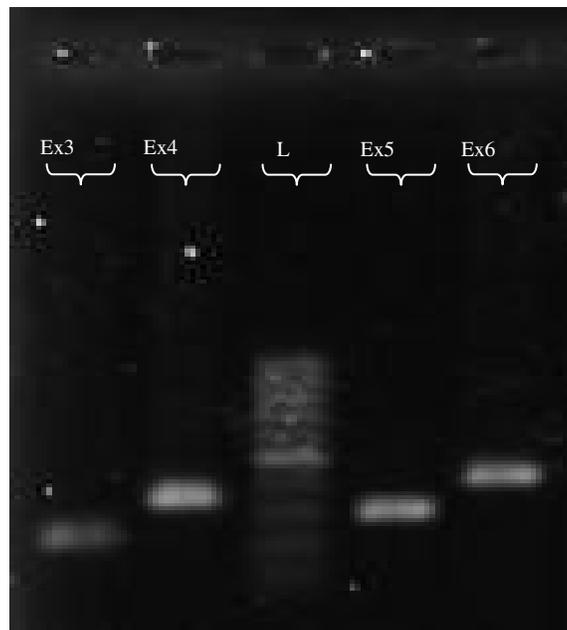


**Figura 23.** A – seqüência normal e B – alteração em homozigose.

Todas as alterações encontradas no gene *TBX1* estão descritas como *SNPs* não patológicos e estão descritas na base de dados *Ensembl* <http://www.ensembl.org/index.html>.

### 5.5.2. Gene *FGF8*

A amplificação dos fragmentos de interesse desse gene foi realizada por *PCR* e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, como demonstrada na Figura 24. Foram amplificados 90% das regiões codificantes deste gene. Os éxons 1 e 2 apesar de inúmeras tentativas, não foi possível encontrar as temperaturas ideais de anelamento, não possibilitando a amplificação desses fragmentos e, conseqüentemente, estes não foram analisados até o momento.



**Figura 24.** Eletroforese dos fragmentos do gene *FGF8*. L: marcador de peso molecular 100pb.

A leitura do seqüenciamento das regiões codificantes deste gene não mostrou alterações entre os indivíduos analisados e as seqüências de referência.

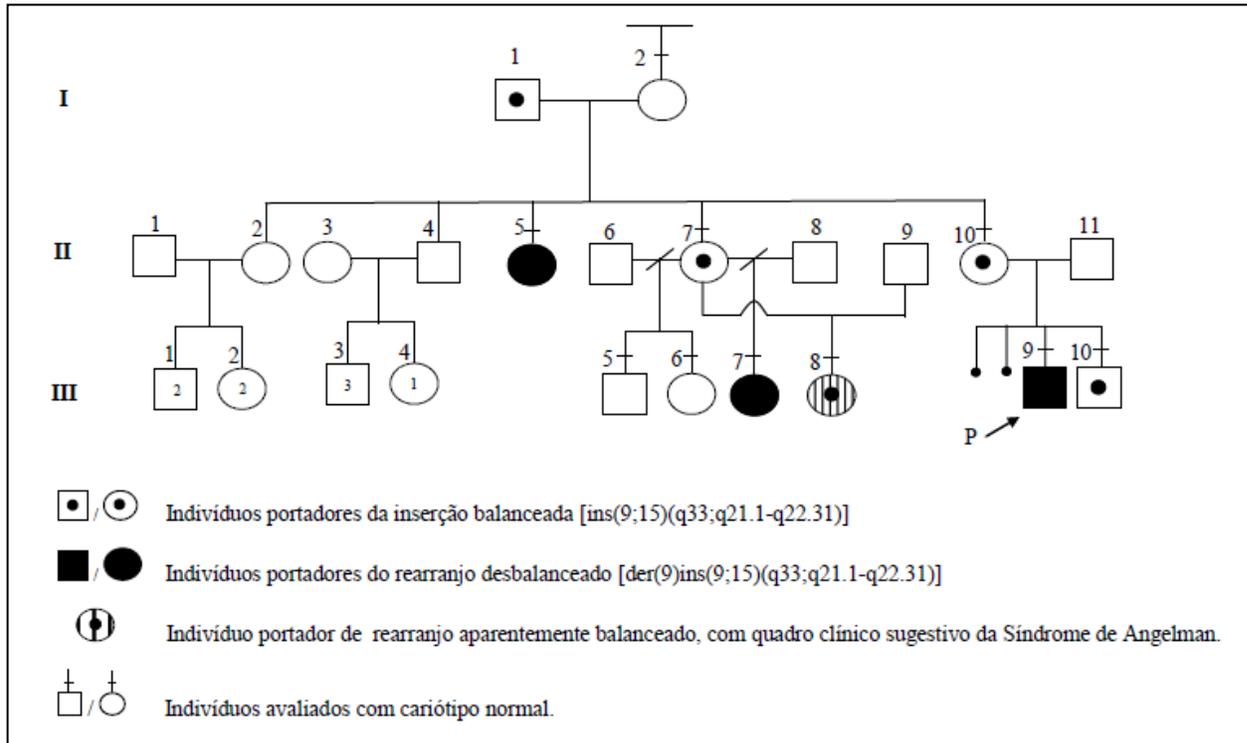
### 5.6. Alterações cromossômicas não relacionadas à SVCF

1º Caso – Trata-se de um caso de recorrência familiar de deficiência mental em que, o propósito apresentava alguns sinais de SVCF. O cariótipo de sangue periférico por bandamento G revelou uma inserção no braço longo do cromossomo 9. Com a análise citogenética de outros membros desta família, identificou-se a origem do segmento inserido no cromossomo 9 (Figura 25), definindo seu cariótipo como 46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q12q21).



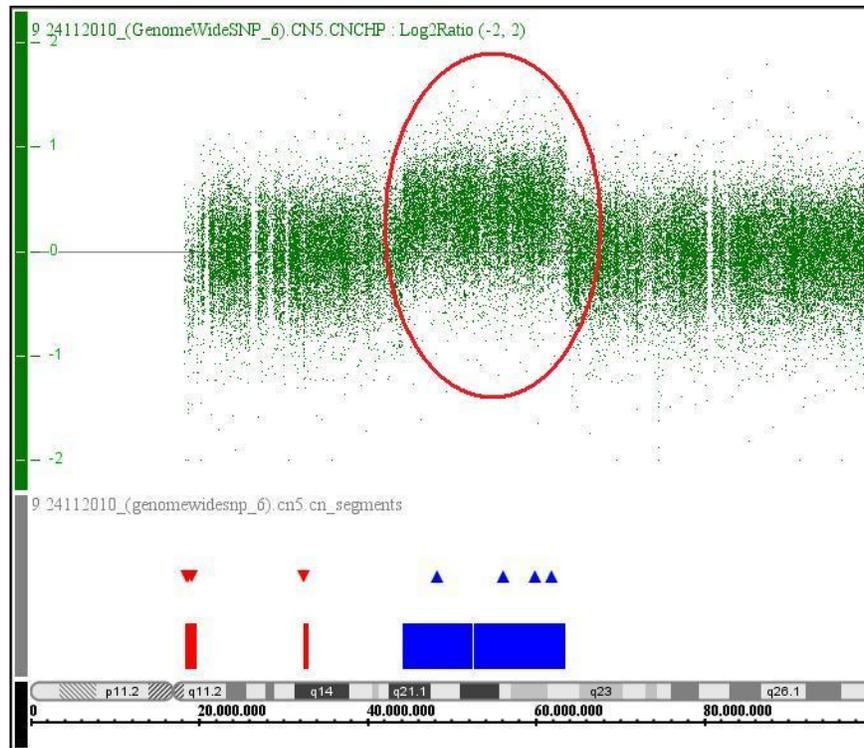
**Figura 25.** Cariótipo 46,XY,der(9)ins(9;15)(q32;q12q21), identificando o cromossomo derivado 9.

Não foi detectada microdeleção em 22q11 pelas técnicas de *FISH* e *MLPA*. Os demais membros da família estudados e respectivos cariótipos encontram-se representados na figura 26.



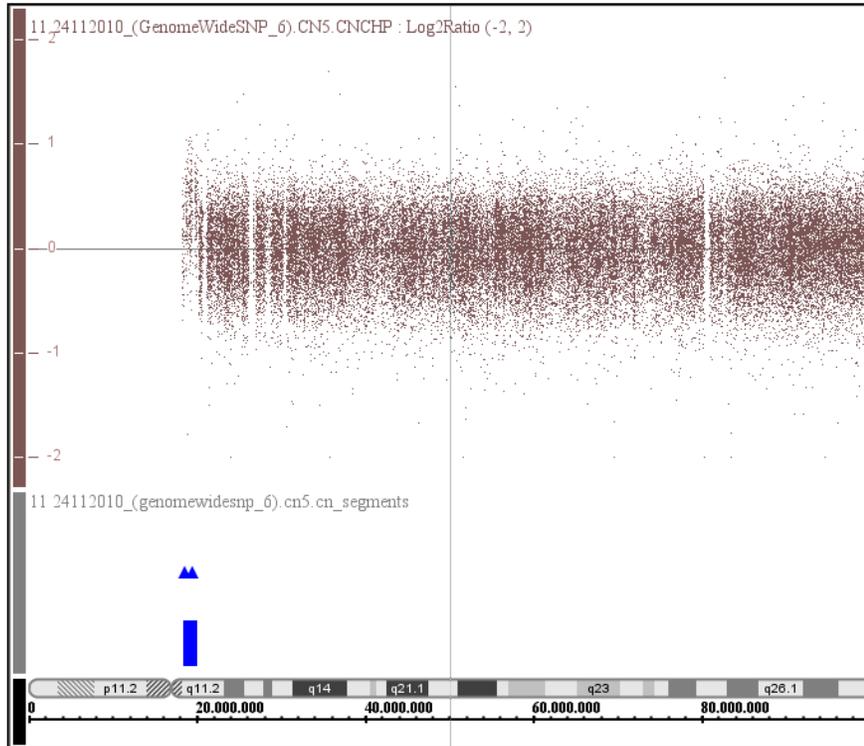
**Figura 26.** Heredograma relatando membros afetados e membros portadores da inserção aparentemente balanceada.

A partir destes resultados, foi possível complementar a investigação dos membros portadores do rearranjo desequilibrado (indivíduos II5, III7 e III9 do heredograma), nos quais foram obtidos o perfil de hibridação de *array* abaixo (Figura 27), confirmando a duplicação de 19.3Mb do cromossomo 15 desde q21.1 até q22.31 [44275184-63567267 – hg18] que esta inserido no cromossomo 9.



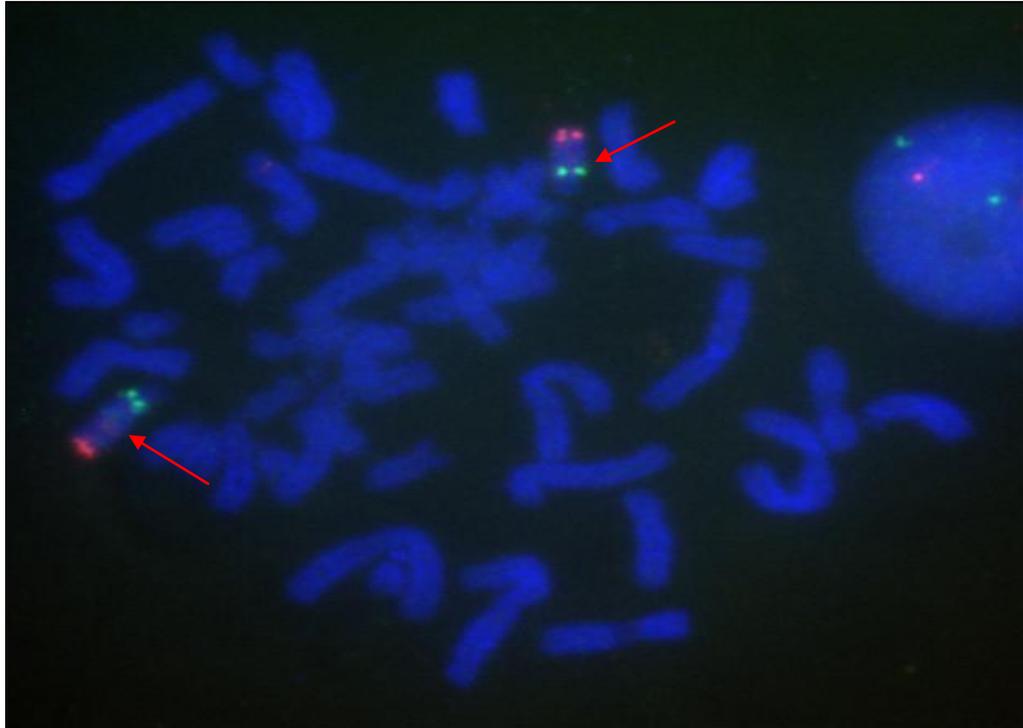
**Figura 27.** Perfil de hibridação do *array* dos indivíduos com o rearranjo desbalanceado [der(9)ins(9;15)(q32;q12q21)].

Os membros portadores do rearranjo equilibrado (indivíduos II1, II7, II10, III8 e III10 do heredograma), obtiveram o perfil de hibridação do *array* abaixo (Figura 28), não evidenciando perda ou ganho de material genômico, inclusive o indivíduo com quadro clínico sugestivo da Síndrome de Angelman.



**Figura 28.** Perfil de hibridação do *array* dos indivíduos com o rearranjo balanceado [ins(9;15)(q32;q12q21)].

O indivíduo III8 apresenta fenótipo sugestivo da Síndrome de Angelman, porém o *SNParray* não revelou nenhum desequilíbrio genômico (figura 15). Para confirmar o resultado negativo para microdeleção, foi realizada *FISH* com uma sonda *locus-específica* que marca a região 15q11 que compreende o gene *UBE3A* (envolvido na Síndrome de Angelman) contendo *locus* de 900 Kb com espectro *green* e uma sonda controle, que engloba o gene *IRFIG* na região 15q26 contendo *locus* de 530 kb e espectro *red* da *Kreatech Diagnostics*<sup>®</sup>. (Figura 29).



**Figura 29.** *FISH* mostrando as duas cópias das regiões 15q11 (gene *UBE3A*) e 15q26 (gene *IRF1G*).

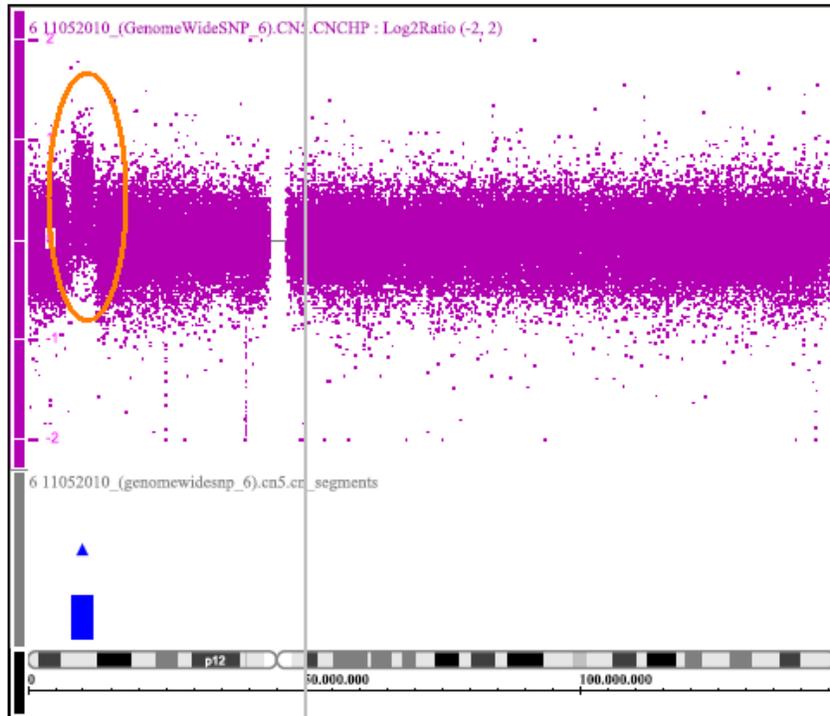
Os resultados da análise de *array* e a confirmação destes pela técnica de *FISH* descartam a deleção da região 15q11 que compreende o gene *UBE3A* (envolvido na Síndrome de Angelman) e permite a localização do fragmento. Esse indivíduo continua sendo investigado, uma vez que os resultados das técnicas utilizadas não possibilitaram um diagnóstico preciso.

2º Caso – Trata-se de um indivíduo com resultado de cariótipo anterior normal que teve resultado de *FISH* para 22q11 normal e, por meio da análise por *MLPA*, encontrou-se uma duplicação na região 8p23.1 de controle do *Kit P250 – A1* (Figura 30).

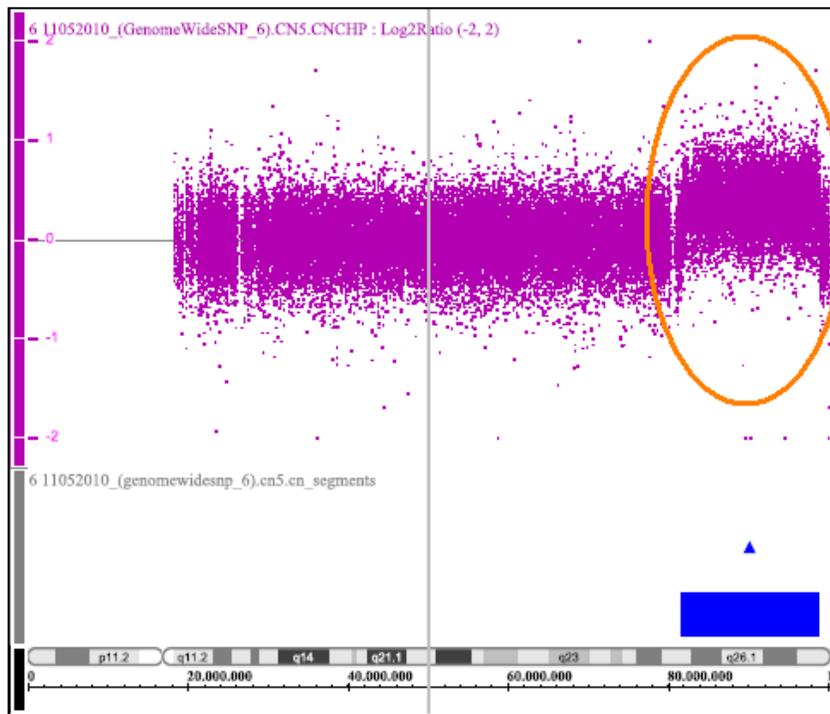


**Figura 30.** Duplicação das sondas *PPP1R3B*, *MSRA* e *GATA4* que representam a região 8p23.1.

A partir deste resultado, este paciente foi investigado através da técnica de *SNP-array* que permitiu confirmar e refinar o tamanho da alteração encontrada no cromossomo 8 de 3.8 Mb na região p23.1 (8.129.435-11.934.586[hg18]) (Figura 31) e revelou uma duplicação de 17.09 Mb na região 15q25-26 (81.869.248-98.962.477[hg18]) do cromossomo 15 (Figura 32).



**Figura 31.** Perfil de hibridação do *array* evidenciando uma duplicação de 3.8 Mb na região p23.1.



**Figura 32.** Perfil de hibridação do *array* evidenciando uma duplicação de 17.09 Mb na região 15q25-26 do cromossomo 15.

Após este resultado, realizou-se novo exame de cariótipo (Figura 33) que revelou a inserção da região duplicada do cromossomo 15 no cromossomo 11, definindo o cariótipo do propósito como 46,XY,der(11)ins(11;15)(p13;q24q26).

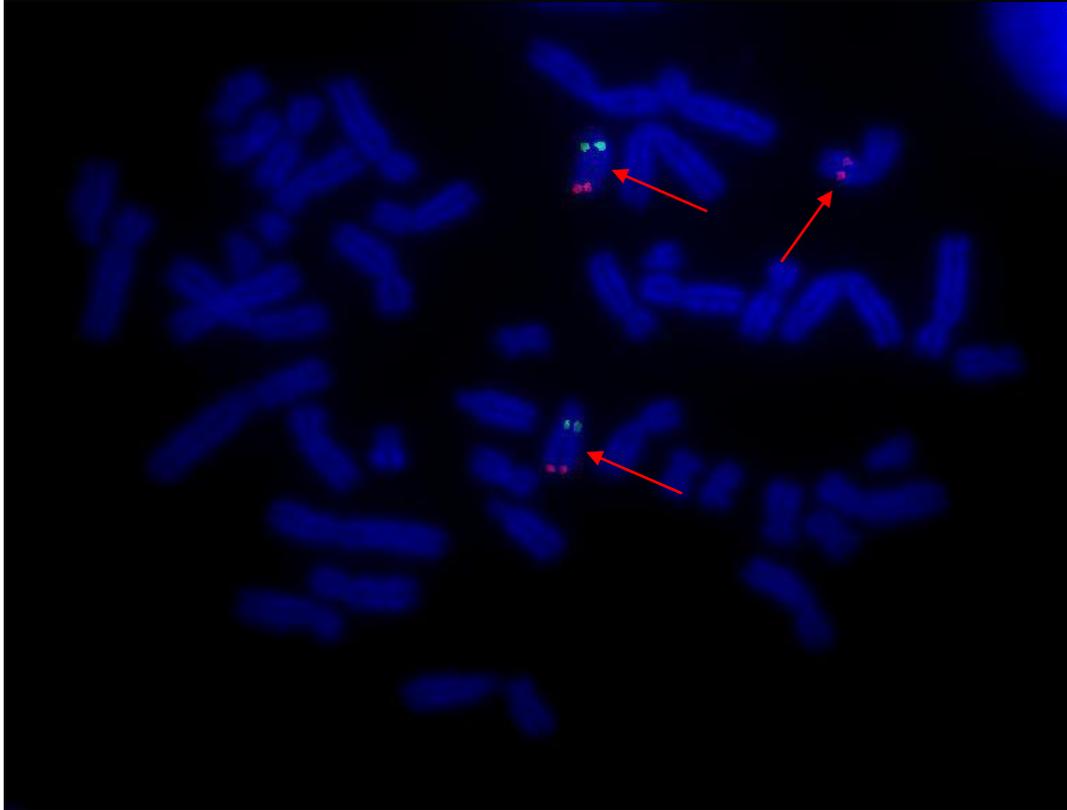


**Figura 33.** Cariótipo 46,XY,der(11)ins(11;15)(p13;q24q26).

Foi realizado *SNP-array* dos genitores, porém ambos não apresentaram perda ou ganho de material genômico. Em seguida, foi realizado cariótipo por banda G dos mesmos a fim de identificar algum rearranjo equilibrado. Os resultados se apresentaram normais para ambos os genitores.

Para confirmação da quantidade e localização do fragmento duplicado encontrado por *SNP-array*, foi utilizada *FISH* com uma sonda *lócus-específica* que marca a região 15q11 com espectro *green* e uma sonda controle em 15q26 com espectro *red* da *Kreatech Diagnostics*<sup>®</sup>. (Figura 34). A realização da *FISH* confirma a duplicação envolvendo a

região 15q26, mostrando três cópias desta região que estão marcadas em vermelho e também permite a localização do fragmento.



**Figura 34.** *FISH* confirmando quantidade e localização do fragmento duplicado.



## ***DISCUSSÃO***



## 6. Discussão

Há uma grande variabilidade fenotípica inter e intra-familiar e mais de 100 diferentes sinais clínicos já foram associados à SVCF, mas não existe uma característica clínica única ou um grupo de características clínicas que está presente em todos os indivíduos afetados [11, 12]. Com isso, até este momento, não foi possível determinar precisamente as indicações para investigação laboratorial. Assim, a estratégia deste estudo foi incluir todos os casos em que houve suspeita clínica definida por médico geneticista.

Em vista da grande heterogeneidade clínica, não é raro encontrar em pacientes com SVCF outras aberrações cromossômicas, ou mesmo microdeleções em outras regiões genômicas também podem ser encontradas em pacientes com diagnóstico clínico de SVCF sem deleção em 22q11. No presente trabalho, isto ocorreu em 9,177% dos casos. Diferentes trabalhos encontraram outras aberrações cromossômicas não envolvendo o cromossomo 22 em 1,7% a 3,7% dos pacientes [1, 5, 54]. Microdeleções em 10p14-15, 4q34 e 17p13.3 já foram encontradas em pacientes com fenótipo sugestivo de SVCF [55, 56, 57]. Contudo, mesmo utilizando-se a técnica de *MLPA*, a visualização do conjunto cromossômico é necessário cariótipo.

De 109 indivíduos, 58 tiveram seu cariótipo realizado neste estudo e 37, já o tinham dos serviços de origem. Não houve resultados para sete indivíduos por falta de material e nove indivíduos apresentaram aberrações cromossômicas passíveis de diagnóstico por citogenética clássica. Destas, quatro com heteromorfismos dos cromossomos 9 e 16 que são variações consideradas normais [58], 2 indivíduos com cromossomo marcador em 100% das células analisadas, o que não permite inferência quanto ao fenótipo, pois não sabemos o conteúdo genômico envolvido e três casos que levaram às conclusões citogenéticas, sendo que em duas delas, não envolve a região 22q11.2. Estes dados se assemelham a literatura descrita por Jehee et al em 2011 [59] e reforçam o exame de cariótipo como necessário para a investigação preliminar, quando os ensaios de *arrays* não são realizados inicialmente.

Em um estudo realizado por Brunet et al em 2006 [1], entre 295 pacientes, foram encontradas outras anomalias cromossômicas não envolvendo a região 22q11.2 em cinco pacientes. Outro estudo realizado por Fernández em 2008 [5] encontrou que 3,7% dos

pacientes tinham outras anomalias cromossômicas, envolvendo deleções, duplicações, cromossomos derivados, cromossomos marcadores, translocações recíprocas e não recíprocas e aneuploidia de cromossomos sexuais, o que sugere correlações entre outros *loci* com os achados clínicos semelhantes com os casos positivos para microdeleção 22q11.2. As principais regiões cromossômicas nas quais foram encontradas alterações foram 4q34, 8p12, 14q2-q23 e 10p15 [21]. Em um estudo realizado por Fernandez et al em 2005 [21], a técnica de *MLPA* mostrou-se uma ferramenta eficiente e rápida para a triagem de deleções em pacientes com SVCF.

Na presente amostra, a técnica de *MLPA* foi realizada em 106 indivíduos, sendo que, em 74, a deleção na região 22q11.2 não foi identificada, reforçando a extensa gama de sinais clínicos inespecíficos que podem não estar associados a esta aberração cromossômica do 22q [5]. Em trinta e um (31) casos houve a confirmação laboratorial da SVCF por deleção da região 22q11.2, sendo que em 24 casos, houve a confirmação desta técnica também por *FISH*.

O *MLPA* se mostrou eficiente para a triagem de deleção da região 22q11.2 em nossa amostra e ainda permitiu a detecção de uma duplicação 8p23 não relacionado à SVCF, portanto, ressaltando a vantagem de se testar várias regiões em um mesmo experimento.

A técnica de *MLPA* mostrou-se eficiente na detecção de microdeleções e outros rearranjos no estudo realizado por Jehee et al. 2011 [59], esta aumenta o percentual de diagnóstico de pacientes com anomalias congênitas múltiplas e retardo mental previamente investigados por exame de cariótipo.

Semelhante aos resultados apresentados por Jehee em 2011 [59]; a técnica de *MLPA* apresentou melhor efetividade para o diagnóstico de SVCF na presente amostra, visto que possibilitou detectar 33,3% dos pacientes que não haviam sido diagnosticados através do cariótipo convencional, três vezes mais que o percentual de 8,8% diagnosticado por bandamento G e maior que os 23% utilizando *FISH*. Assim, com a utilização das técnicas de cariótipo com banda G e *MLPA*, foi possível diagnosticar 42,1% da amostra, permitindo uma conduta direcionada aos pacientes e seus familiares.

A técnica de *FISH* foi utilizada para confirmar os resultados obtidos por *MLPA*. Optou-se por realizá-la, pois esta técnica é bem estabelecida para o diagnóstico da SVCF e a de *MLPA* havia sido recentemente padronizada no laboratório.

Foi realizada a *FISH* em um total de 87 pacientes, dos quais 25 apresentaram deleção e 62, não a apresentaram; 22 não foram investigados por esta técnica, devido à falta de material biológico. A técnica de *FISH* apesar de já ser bem estabelecida para a triagem da microdeleção 22q11.2, é realizada utilizando sonda *locus-específica*, não testando várias regiões em um único experimento, o que não permitiria a detecção da duplicação 8p23 detectada pela técnica de *MLPA*. A *FISH* também permitiu a localização do fragmento dentro do conjunto cromossômico, isso foi de extrema importância em nosso estudo para os casos com aberrações cromossômicas não relacionadas à SVCF, pois permitiu confirmar nos dois casos a inserção do material duplicado em outro cromossomo.

Beaujard e colaboradores (2009) [60] relataram que investigações de deleções típicas com as ferramentas mais utilizadas para a região 22q11.2, como a sonda *TUPLE1* de *FISH* que não engloba a região do gene *TBX1*, pode resultar em diagnósticos com resultados falso negativo, uma vez que haja uma deleção atípicas envolvendo o gene *TBX1*. Isso evidencia a necessidade de investigações para alterações ou deleções envolvendo o gene *TBX1* com ferramentas diagnósticas diferenciadas, por exemplo, o *MLPA* ou *FISH* com sonda que compreenda a região do gene *TBX1*.

Além de outras aberrações cromossômicas ou microdeleções, mutações no gene *TBX1* já foram descritas em pacientes sem microdeleção em 22q11.2 [22]. Desse modo, considerou-se o sequenciamento das regiões codificantes do gene *TBX1*, realizado para pacientes que foram negativos para a microdeleção da região 22q11.2 por *MLPA* e *FISH*.

Em 2001, Jerome e Papaioannou [61] relataram que camundongos heterozigotos para uma mutação nula no gene *TBX1* apresentaram anomalias no sistema cardíaco. Assim, após reavaliação clínico-dismorfológica, foram incluídos 31 pacientes com hipótese clínica de SVCF persistente, incluindo alguns indivíduos com defeitos cardíacos relacionados à SVCF. Os dados obtidos evidenciaram apenas alterações não patogênicas. Gong et al em 2001 [62], relata que apesar do gene *TBX1* ser um forte gene candidato, os estudos realizados com uma amostra de mais de 100 indivíduos com suspeita clínica de SVCF, não foram identificadas mutações patogênicas do gene *TBX1*.

Modelos animais indicarem quadro clínico similar à SVCF em mutações do gene *FGF8* [31], o que o torna gene candidato. Porém, até o momento, alterações neste gene não foram verificadas em humanos com fenótipo de SVCF. Neste estudo 90% da região

codificante não evidenciaram alterações. Até a forma final deste estudo, não foi possível analisar toda a região codificante por problemas técnicos. De todo modo, considerando os resultados obtidos neste estudo, não se pôde relacionar a presença de mutações no gene *FGF8* e o fenótipo de SVCF em humanos, e também não há descrições na literatura que comprove mutações no gene *FGF8* e a SVCF em humanos.

Quanto às outras aberrações cromossômicas não relacionadas à SVCF encontradas neste trabalho, a investigação laboratorial complementar permitiu melhor caracterização das alterações citogenéticas encontradas.

No caso 1, detectou-se aberração cromossômica familiar. O cariótipo por banda G do propósito revelou uma inserção no braço longo do cromossomo 9 na região q33. Foi iniciado a investigação da família através do cariótipo da mãe, que revelou ser portadora de uma inserção balanceada [*ins(9;15)(q33;q21.1-q22.31)*]. A análise citogenética de outros membros da família identificou seis indivíduos portadores do rearranjo aparentemente balanceado, sendo que um apresenta fenótipo sugestivo de Síndrome de Angelman e outros dois membros portadores do mesmo rearranjo desbalanceado semelhante ao do propósito, definido como [*der(9)ins(9;15)(q33;q21.1-q22.31)*]. A partir dos resultados obtidos por citogenética clássica, continuou-se a investigação por *SNParray* com o *chip Genome-Wide Human Array 6.0, Affymetrix®* dos três indivíduos desbalanceados e de duas portadoras balanceadas. A análise de *array* dos indivíduos com rearranjos desbalanceados revelou uma duplicação de 19.3Mb do cromossomo 15, compreendendo de q21.1 a q22.31 [44275184-63567267 – hg18]. A análise de *array* das duas portadoras do rearranjo balanceado mostrou resultados normais, incluindo a portadora que apresenta fenótipo sugestivo de Síndrome de Angelman, entretanto esta portadora continua sendo investigada. Apesar de alguns relatos raros de duplicações do cromossomo 15 [63], esta família descrita parece ser a primeira com a duplicação desta região específica.

No caso 2, identificou-se uma aberração cromossômica *de novo*. Este indivíduo foi encaminhado ao projeto com um exame de cariótipo previamente realizado e com resultado normal. A análise de *MLPA* foi normal para a região 22q11.2, porém foi observada duplicação de três sondas controles em 8p23.1. Foi realizado o *SNParray* com o *chip Genome-Wide Human Array 6.0, Affymetrix®*, confirmando uma duplicação de 3.8 Mb na região 8p23.1(8.129.435-11.934.586[hg18]) e revelou uma duplicação de 17.09 Mb do

cromossomo 15 entre q25-26 (81.869.248-98.962.477 [hg18]). Para confirmar a extensa duplicação detectada, foi realizada a análise de cariótipo por banda G em nosso laboratório, que revelou a inserção do fragmento do cromossomo 15 duplicado no braço curto do cromossomo 11, definindo o resultado de cariótipo como 46,XY,der(11)ins(11;15)(p13;q25q26). As análises por citogenética clássica e *arrays* dos genitores apresentaram resultados normais.

As duplicações 8p e 15q estão bem caracterizadas na literatura [64, 65] e esse paciente apresenta sinais clínicos relacionado as duas alterações - anomalia cardíaca, conforme descrito por Barber et al em 2008 [64] em pacientes com duplicação 8p e anomalia renal como descrito por Tatton-Brown K et al em 2009 [65] em indivíduos com duplicação de 15q25-26.

Além disso, a ins(11,15) pode ter alterado a expressão normal do gene *PAX6* por um efeito posicional ou por exclusão de um elemento regulador, o que explica o fenótipo de aniridia, visto que esta condição não é descrita em outros indivíduos com duplicações 8p e 15q, portanto este paciente continua sendo investigado em outro projeto em andamento.

Os resultados obtidos neste estudo, especialmente os dois casos descritos acima, destacam a importância da citogenética clássica apesar dos avanços moleculares e reforçam as evidências de que as técnicas de citogenética clássica e genética molecular são complementares. De fato, com os resultados normais de *arrays* obtidos, a citogenética clássica foi fundamental para identificação de rearranjos balanceados, permitindo o aconselhamento genético adequado.

Os exames de *arrays*, utilizados em alguns países como triagem de aberrações cromossômicas, considerando que o treinamento de pessoal é mais simples que para a realização de exame de cariótipo, revela-se uma estratégia adequada e rápida avaliação do conjunto cromossômico geral, incluindo a região 22q11.2 [7]. Porém, o alto custo desta técnica, aliado à escassez de laboratórios e especialistas em nosso país não permite sua utilização rotineira.

Assim, considerando a infra-estrutura já existente e a presença de recursos humanos treinados, o exame de cariótipo é uma excelente alternativa para investigação inicial. Entretanto, não existem normas regulamentadas para controle de qualidade em nosso país.

Modelos de custo-efetividade são importantes para ajudar os profissionais de saúde nas estratégias de investigação. Assim, a característica econômica do país é fundamental para a escolha do método diagnóstico a ser empregado [59].

Em estudo realizado por Vasconcelos et al em 2007 [66] destaca a alta frequência de aberrações cromossômicas, o que relata a importância do exame de cariótipo com bandamento G para o diagnóstico e o aconselhamento genético aos pacientes e familiares. Ressalta-se que o cariótipo com resultado normal, não afasta a possibilidade de rearranjos submicroscópicos [66]. Isso reforça a necessidade de utilização de outras técnicas específicas em conjunto com o cariótipo por banda G, para identificação de resultados não evidenciados por citogenética clássica.

Mediante ao vasto avanço tecnológico, é importante saber fazer uso das técnicas disponíveis e acessíveis. Com a conclusão diagnóstica laboratorial, é possível contribuir na qualidade de vida dos pacientes e suas famílias, por meio de condutas clínicas direcionadas.

## ***CONCLUSÕES***



## 7. Conclusões

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

1. A heterogeneidade de sinais clínicos da SVCF acarreta dificuldade em determinar indicações precisas para investigação laboratorial e pode ser um dos motivos para os resultados negativos encontrados em parte desta amostra.
2. As técnicas de cariótipo, *FISH* e *MLPA* são complementares. O exame de cariótipo de boa qualidade pode contribuir na identificação etiológica de quadros de fenocópias e a investigação por meio de *MLPA* e *FISH*, isoladamente, podem não ser suficiente para o esclarecimento do caso. Utilização de *MLPA* e cariótipo, em conjunto, foi útil para o esclarecimento diagnóstico de 42,1% da amostra.
3. Alterações patogênicas nos genes *TBX1* não foram detectadas nesta amostra. Além da heterogeneidade clínica, tamanho amostral, não se pode afastar a presença de deleções intragênicas e alterações em regiões promotoras ou em regiões adjacentes, as quais não seriam detectadas através do seqüenciamento apenas das regiões codificantes.
4. Apesar de existir quadro semelhante à SVCF em modelos animais com mutações no gene *FGF8*, estas não foram detectadas na presente amostra. A ausência de alterações patogênicas pode ser relacionada à heterogeneidade clínica, técnicas utilizadas e o tamanho amostral. Além disso, é possível que relação deste gene e a SVCF seja pouco provável em humanos.



## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



## 8. Referências Bibliográficas

1. BRUNET A, GABAU E, PERICH RM, VALDESOIRO L, BRUN C, CABALLIN MR, GUITART M. Microdeletion and Microduplication 22q11.2 Screening in 295 patients With Clinical Features of DiGeorge/Velocardiofacial Syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 2006; Part A (140A):2426-32.
2. MCDERMID HE, MORROW BE. Genomic disorders on 22q11. *American Journal Human Genetics*, 2002; 70:1077–1088.
3. BOTTO LD, MAY K, FERNHOFF PM, CORREA A, COLEMAN K, RASMUSSEN SA, MERRITT RK, O’LEARY LA, WONG LY, ELIXSON EM, MAHLE WT, CAMPBELL RM. A population-based study of the 22q11.2 deletion: Phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics*, 2003; 112:101–107.
4. SHPRINTZEN RJ, HIGGINS AM, ANTSHEL K, FREMONT W, ROIZEN N, KATES W. Velo-cardio-facial Syndrome. *Curr Opin Pediatr*, 2005; 17:725-30.
5. FERNÁNDEZ L, LAPUNZINA P, PAJARES IL, PALOMARES A, MARTINEZ I, FERNÁNDEZ B, QUERO J, GUERETA LG, ALIX AG, BURGUEROS M, GOMEZ EG, PÉREZ JMC, GRANERO AP, JUAN LT, SUNER DH, ROSELL J, DELICADO A. Unrelated Chromosomal Anomalies Found in Patients With Suspected 22q11.2 deletion. *American Journal of Medical Genetics*, 2008; Part A (146A):1134-41.
6. SHPRINTZEN RJ. Velo-Cardio-Facial Syndrome: 30 years of study. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 2008; 14: 3 – 10.

7. MCDONALD-MCGINN DM, AND SULLIVAN KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome) *Medicine*. 2011;90:1-14.
8. KOBRYNSKI L, SULLIVAN K. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *The Lancet*, 2007; 370:1443-52.
9. OSKARSDÓTTIR S, PEARSSON C, ERIKSSON BO, FASTH A. Presenting Phenotype in 100 Children With the 22q11 Deletion Syndrome. *European Journal Pediatr*, 2005; 164:146-53.
10. PEREZ E, SULLIVAN KE. Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (DiGeorge and Velocardiofacial Syndromes). *Curr Opin Pediatr*, 2002; 14:578-83.
11. OH AK, WORKMAN LA, WONG GB. Clinical correlation of chromosome 22q11.2 Fluorescent In Situ Hybridization Analysis and Velocardiofacial Syndrome. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 2007; 44: 62-66.
12. SIVERTSEN A, LIE RT, WILCOX AJ, ABYHOLM F, VINDENES H, HAUKNES BI, HOUGE G. Prevalence of duplications and deletions of the 22q11.2 DiGeorge Syndrome region in a population-based sample of infants with cleft palate. *American Journal of Medical Genetics*, 2007; 143A: 129-134.
13. SWILLEN A, VOGELS A, DEVRIENDT K, FRYNS JP. Chromosome 22q11 Deletion Syndrome: Update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 2000; 97:128-135.
14. BEVERLY HN. Deletion 22q11: Spectrum of Associated Disorders. Elsevier, *Seminars in Pediatric Neurology*, 2007; 14:136-39.

15. DRISCOLL DA, SPINNER NB, BUDARF ML, MCDONALD-MCGINN DM, ZACKAI EH, GOLDBERG RB, SHPRINTZEN RJ, SAAL HM, ZONANA J, JONES MC, MASCARELLO JT, EMANUEL BS. Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1992; 44: 261-268.
16. WILSON DI, CROSS IE, GOODSHIP JA, COULTHARD S, CAREY AH, SCAMBLER PJ, BAIN HH, HUNTER AS, CARTER PE, BURN J. DiGeorge syndrome with isolated aortic coarctation and isolated ventricular septal defect in three sibs with a 22q11 deletion of aternal origin. *Brit. Heart J.* 1991; 66: 308-312.
17. STEVENS CA, CAREY JC, SHIGEOKA AO. DiGeorge anomaly and velocardiofacial syndrome. *Pediatrics* 1990; 85: 526-530.
18. EMANUEL BS. Molecular Mechanisms and Diagnosis of Chromosome 22q11.2 Rearrangements. *Developmental Disabilities Research Review*, 2008; 14(1): 11–18.
19. URBAN AE, KORBEL JO, SELZEN R, RICHMOND T, HACKER A, POPESCU GV, CUBELLS JF, GREEN R, EMANUEL BS, GERSTEIN MB, WEISSMAN SM. High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays. *PNAS*, 2006, 103: 4534–4539
20. BITEL DC, YU S, NEWKIRK H, KIBIRYEVA N, HOLT III A, BUTLER MG. *Cytogenetic and genome research*, 2009; 124: 223-120.
21. FERNÁNDEZ L, LAPUNZINA P, ARJONA D, LÓPEZ PAJARES I, GARCÍA-GUERETA L, ELORZA D, BURGUEROS M, DE TORRES ML, MORI MA, PALOMARES M, GARCÍA-ALIX A, DELICADO A. Comparative study of three diagnostic approaches (*FISH*, STRs and *MLPA*) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet*, 2005; 68(4):373-8.

22. ZWEIER C, STICHT H, YAYLAGÜL I A, CAMPBELL CE, RAUCH A. The American Journal of Human Genetics, 2007; 80:510-17.
23. CHIEFFO C, GARVEY N, GONG W, ROE B, ZHANG G, SILVER L, EMANUEL BS, BUDARF ML. Isolation and Characterization of a Gene from the DiGeorge Chromosomal Region Homologous to the MouseBXGene. Genomics, 1997; 43:267-277.
24. CHAPMAN, D. L., GARVEY, N., HANCOCK, S., ALEXIOU, M., AGULNIK, S. I., GIBSON-BROWN, J. J., CEBRA-THOMAS, J., BOLLAG, R. J., SILVER, L. M., AND PAPAIOANNOU, V. E. Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. Developmental Dynamics, 1996; 206: 379–390.
25. KELLY RG, JEROME-MAJEWSKA LA, PAPAIOANNOU VE. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomic myogenesis. Human Molecular Genetics 2004; Vol. 13, n°. 22.
26. YAGI H, YOSHIYUKI F, HAMADA H, SASAKI T, ASAKAWA S, MINOSHIMA S, ICHIDA F, HOOK, KIMURA M, IMAMURA SI, KAMATANI N, MOMMA K, TAKAO A, NAKAZAWA M, SHIMIZU N, MATSUOKA R. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. The Lancet, 2003; 362:1366-73.
27. GARG V, YAMAGISHI C, HU T, KATHIRIYA IS, YAMAGISHI H, SRIVASTAVA D. *TBX1*, a DiGeorge Syndrome Candidate Gene, Is Regulated by Sonic Hedgehog during Pharyngeal Arch Development. Developmental Biology, 2001; 235: 62-73.
28. ZHANG L, ZHONG T, WANG Y, JIANG Q, SONG H, GUI Y. *TBX1*, a DiGeorge syndrome candidate gene, is inhibited by retinoic acid. Int J Dev Biol, 2006; 50:55-61.

29. VITELLI F, ZHANG Z, HUYNH T, SOBOTKA A, MUPO A, BALDINI A. *FGF8* expression in the *TBX1* domain causes skeletal abnormalities and modifies the aortic arch but not the outflow tract phenotype of *TBX1* mutants. Elsevier, *Developmental Biology*, 2006; 295:559-70.
30. HU T, YAMAGISHI H, MAEDA J, MCANALLY J, YAMAGISHI C, SRIVASTAVA D. *TBX1* regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. *Development* 2004; 131: 5491-5502.
31. FRANK DU, FOTHERINGHAM LK, BREWER JA, MUGLIA LJ, TRISTANI-FIROUZI M, CAPECCHI MR, MOON AM. An *Fgf8* Mouse Mutant Phenocopies Human 22q11 Deletion Syndrome. *Development*. 2002; 129(19): 4591–4603.
32. TANAKA, A.; MIYAMOTO, K.; MINAMINO, N.; TAKEDA, M.; SATO, B.; MATSUO, H.; MATSUMOTO, K. Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(19):8928-8932, 1992.
33. COHN, M.J.; IZPISUA-BELMONTE, J.C.; ABUD, H.; HEATH, J.K.; TICKLE, C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80(5):739-746, 1995.
34. SLACK, J. Role of fibroblast growth factors as inducing agents in early embryonic development. *Mol Reprod Dev* 39(1):118-124, 1994.
35. ORNITZ, D.M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2(3):REVIEWS3005, 2001.

36. BOBICK, B.E.; THORNHILL, T.M.; KULYK, W.M. Fibroblast growth factors 2, 4, and 8 exert both negative and positive effects on limb, frontonasal, and mandibular chondrogenesis via MEK-ERK activation. *J Cell Physiol* 211(1):233-43, 2007.
37. LORENZI, M.V.; LONG, J.E.; MIKI, T.; AARONSON, S.A. Expression cloning, developmental expression and chromosomal localization of fibroblast growth factor-8. *Oncogene* 10(10):2051-2055, 1995.
38. WHITE, R.A.; DOWLER, L.L.; ANGELONI, S.V.; PASZTOR, L.M.; MACARTHUR, C.A. Assignment of FGF8 to human chromosome 10q25-q26: mutations in FGF8 may be responsible for some types of acrocephalosyndactyly linked to this region. *Genomics* 30(1):109-111, 1995.
39. YOSHIURA, K.; LEYSENS, N.J.; CHANG, J.; WARD, D.; MURRAY, J.C.; MUENKE, M. Genomic structure, sequence, and mapping of human FGF8 with no evidence for its role in craniosynostosis/limb defect syndromes. *Am J Med Genet* 72(3):354-362, 1997.
40. NISWANDER, L. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet.* 4(2):133-143, 2003.
41. RICHMAN, J.M.; LEE, S.H. About face: signals and genes controlling jaw patterning and identity in vertebrates. *Bioessays* 25(6):554-568, 2003.
42. HEIKINHEIMO, M.; LAWSHE, A.; SHACKLEFORD, G.M.; WILSON, D.B.; MACARTHUR, C.A. Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech Dev* 48(2):129-138, 1994.

43. CROSSLEY, P.H. e MARTIN, G.R. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121(2):439-451, 1995.
44. AGGARWAL VS, MORROW BE. Genetic Modifiers of thr physical Malformations in Velo-Cardio-Facial Syndrome/DiGeorge Syndrome. *Developmental Disabilities*, 2008; 14:19-25.
45. AASE JM. Diagnostic dismorphology. New York: Plenum Medical Book Company, 1990. 2999p.
46. MOORHEAD PS, NOWELL PC, MELLMAN WJ, BATTIPS DM, HUNGERFORD DA. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*, 1960; 20:613-6.
47. ARAÚJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA, J.R.G.; FARAH, S.B.; MELLO, M.P. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 29: 1-13, 1996.
48. SCHOUTEN JP, MCELGUNN CJ, WAAIJER R, ZWIJNENBURG D, DIEPVENS F, PALS G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(12):e57.
49. GUERRA M. FISH Conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004.
50. PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci*, 1986; 83 (9):2934-8.

51. SIMIONI, M. Investigação da Região 22q11.2 em Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo. [Tese - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2008.
52. FREITAS, EL. Estudos Moleculares em Anomalias Craniofaciais Raras: Síndrome Blefaroqueilodôntica e Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo. [Tese-Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.
53. MC PHERSON MJ, MOLLER SG. PCR: The basics from background to bench. BIOS Scientific Publishers Limited. 2000; 27-29.
54. SMITH A, ST HEAPS L, ROBSON L. Apparently unrelated cytogenetic abnormalities among 462 probands referred for the detection of del(22q) by FISH. Am J Med Genet 2002;113(4):346-50.
55. GREENBERG F, ELDER FF, HAFFNER P, NORTHRUP H, LEDBETTER DH. Cytogenetic findings in a prospective series of patients with DiGeorge anomaly. Am J Hum Genet 1988;43(5):605-11.
56. 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.
57. LINDSTRAND A, MALMGREN H, VERRI A, BENETTI E, ERIKSSON M, NORDGREN A, ANDERLID BM, GOLOVLEVA I, SCHOUMANS J, BLENNOW E. Molecular and clinical characterization of patients with overlapping 10p deletions. Am J Med Genet A 2010;152A(5):1233-43
58. SCHMIDT S, CLAUSSEN U, LIEHR T, WEISE A. Evolution versus constitution: differences in chromosomal inversion. Hum Genet 2005;117:213-219.

59. JEHEE FS, TAKAMORI JT, MEDEIROS PFV, PORDEUS ACB, LATINI FRM, BERTOLA DR, KIM CA, PASSOS-BUENO MR. Using a combination of *MLPA* kits to detect chromosomal imbalances in patients with multiple congenital anomalies and mental retardation is a valuable choice for developing countries. *European Journal of Medical Genetics*, 2011;(55)e1-e8.
60. BEAUJARD MP, CHANTOT S, DUBOIS M, KEREN B, CARPENTIER W, MABBOUX P, WHALEN S, VODOVAR M, SIFFROI JP, PORTNOI MF. Atypical deletion of 22q11.2: Detection using the *FISH TBX1* probe and molecular characterization with high-density *SNP arrays*. *European Journal of medical Genetics*, 2009; 52(5):321-7.
61. JEROME, L.A. AND PAPAIOANNOU, V.E. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene *Tbx1*. *Nature Genetics*, 2001; 27: 286 – 291.
62. GONG W, GOTTLIEB S, COLLINS J, BLESCIA A, DIETZ H, GOLDMUNTZ E, MCDONALD-MCGINN D, ZACKAI EH, EMANUEL BS, DRISCOLL DA, BUDARF ML. Mutation analysis of *TBX1* in non-deleted patients with features of DGS/VCFS or isolated cardiovascular defects. *Journal Medical Genetics*, 2001; 38, e45.
63. ROGGENBUCK JA, MENDELSON NJ, TENENHOLZ B, LADDA RL, FINK JM. Duplication of the Distal Long Arm of Chromosome 15: Report of Three New Patients and Review of the Literature. *Am J Med Genetics*, 2004; 126A:398-402.
64. BARBER JC, MALONEY VK, HUANG S, BUNYAN DJ, CRESSWELL L, KINNING E, BENSON A, CHEETHAM T, WYLLIE J, LYNCH SA, ZWOLINSKI S, PRESCOTT L, CROW Y, MORGAN R, HOBSON E. 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. *Eur J Hum Genet* 2008;16(1):18-27.

65. TATTON-BROWN K, PILZ DT, ORSTAVIK KH, PATTON M, BARBER JC, COLLINSON MN, MALONEY VK, HUANG S, CROLLA JA, MARKS K, ORMEROD E, THOMPSON P, NAWAZ Z, LESE-MARTIN C, TOMKINS S, WAITS P, RAHMAN N, MCENTAGART M. 15q overgrowth syndrome: a newly recognized phenotype associated with overgrowth, learning difficulties, characteristic facial appearance, renal anomalies and increased dosage of distal chromosome 15q. *Am J Med Genet A* 2009;149A(2):147-54.
66. VASCONCELOS B, ALBANO LMJ, BERTOLA DR, SBRUZZI I, HONJO RS, MOREIRA M, BRASIL AS, CASTRO C, KOIFFMANN C, KIM CA. Anormalidades cromossômicas nos pacientes atendidos em serviço de genética. *Pediatria (São Paulo)*;2007;29(1):26-32.
67. OPITZ, JM. The developmental field concept in clinical genetics. *J Pediatr*, 1982; 101:805-809.
68. SANCHEZ O, ESCOBAR JJ, YUNIS JJ. A simple G-banding technique. *Lancet*, 1973; 2(7823):269.
69. STACHON AC, BASKIN B, SMITH AC, SHUGAR A, CYTRYNBAUM C, FISHMAN L, LONDONO RM, KLATT R, TEEBI A, RAY PN, WEKSBERG R. Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *American Journal of Medical Genetics*, 2007; Part A (143A):2924-30.
70. SUNG-HO H, ORNITZ DM.  $\beta$ -catenin deficiency causes DiGeorge syndrome-like phenotypes through regulation of *TBX1*. *Development*, 2010; 137:1137-1147.

***ANEXOS***



## 9. Anexos

### Anexo I. Parecer do Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 03/07/09.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 487/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0391.0.146.000-09

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA SÍNDROME VELOCARDIOFACIAL E POSSÍVEIS FENOCÓPIAS”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Ilária Cristina Sgardioli.

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 04/06/2009

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 03/07/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

#### II - OBJETIVOS

Identificar anormalidades em cromossomos ou genes de indivíduos com suspeita de Síndrome Velocardiofacial.

#### III - SUMÁRIO

Participará do estudo, pacientes atendidos no serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica/FCM/UNICAMP. Serão incluídos no estudo 15 pacientes com hipótese diagnóstica da SVCF sem que a microdeleção tenha sido identificada pela técnica de FISH e 50 pacientes com hipótese diagnóstica de SVCF, para os quais ainda não foi realizada a técnica. O estudo ainda relata que talvez sejam usados pacientes de outro projeto multicêntrico. Será ainda armazenado o sangue para prováveis estudos futuros.

#### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VI I- DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de junho de 2009.

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

## Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Projeto: **Investigação laboratorial da Síndrome Velocardiofacial e possíveis fenocópias**

Coordenadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Responsável local/ Hospital participante: \_\_\_\_\_

#### Qual o objetivo desse estudo?

Este estudo tem como objetivo identificar anormalidades em cromossomos ou genes de indivíduos com suspeita de Síndrome Velocardiofacial.

#### Como esse estudo será feito?

Todos os pacientes são primeiramente avaliados por um médico geneticista que realiza avaliação clínica, registro fotográfico e história familiar. Além da avaliação médica serão realizados exames complementares, que poderão ser todos ou alguns dos seguintes, dependendo da necessidade: nasofibrosopia, ecocardiografia, ressonância magnética ou tomografia computadorizada, ultra-som abdominal e de vias urinárias, avaliação oftalmológica e auditiva. Após a avaliação médica será realizada coleta de sangue por punção venosa. O sangue do paciente será utilizado para extração do DNA ou para cultivo celular, a partir dos quais serão investigadas perdas ou ganhos de pequenos fragmentos dos cromossomos.

Se houver algum achado no exame que necessite mais investigação, poderá ser necessária nova coleta, para confirmação dos resultados. Todas as amostras de sangue coletadas serão processadas e guardadas nos Laboratórios de Genética Molecular e Citogenética do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP.

Para todos os pacientes está previsto o armazenamento de DNA para estudos futuros, no entanto, o responsável pelo paciente poderá escolher entre autorizar ou não o armazenamento do DNA. De todo modo, antes de se realizar qualquer estudo futuro, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para tal.

**Existe risco ou desconforto?**

Para as avaliações pelo médico geneticista, não haverá riscos ou desconfortos para os pacientes e suas famílias.

Os exames complementares serão realizados por profissionais habilitados, sendo que para a realização da Ressonância Magnética, as crianças menores de cinco anos e aquelas de difícil controle necessitarão receber um calmante. Normalmente, isso já é realizado. A anestesia pode, em alguns casos, fazer o coração bater mais rápido, dificuldade para respirar, aumento de saliva na boca e agitação. Todos esses são sintomas temporários.

A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e com material adequado, com risco apenas de dor leve durante a coleta e a possibilidade de formação de manchas rochas no local onde for realizada a coleta.

**Quais as vantagens em participar deste estudo?**

A avaliação do médico geneticista, juntamente com a realização dos exames complementares, pode contribuir para identificação de outras alterações associadas à anomalia palatal, possibilitando orientações quanto a condutas antecipatórias mais específicas.

Os exames realizados no DNA e nos cromossomos podem mostrar se existe ou não alterações pequenas em um dos cromossomos do paciente, podendo ajudar o geneticista a realizar uma orientação mais específica sobre risco de acontecer novamente na família. Por outro lado, os conhecimentos obtidos com esta pesquisa poderão ajudar a entender as causas desses defeitos congênitos.

Não haverá qualquer forma de pagamento ou remuneração aos indivíduos que participarem deste estudo.

**A participação é obrigatória?**

**NÃO!** Só participarão os interessados. Mesmo assim, se durante o estudo não houver mais interesse, a participação poderá ser interrompida. Se a participação nesse estudo for interrompida, os cuidados médicos rotineiros **não** serão interrompidos ou modificados, atualmente ou no futuro.

**Quem terá acesso aos resultados?**

Todos os resultados dos exames serão transmitidos ao responsável pelo paciente pelo médico geneticista em consulta médica previamente agendada. Se os resultados e informações forem

utilizados para fins de publicação em congressos ou revistas científicas, nenhuma identificação do paciente será utilizada.

**Com quem posso esclarecer minhas dúvidas?**

As dúvidas poderão ser esclarecidas, em qualquer fase do estudo, com o médico assistente que o convidou para o estudo, com os biomédicos Társis P. Vieira e Ilária Sgardioli, ou com a Dra. Vera Lopes Gil da Silva Lopes. O esclarecimento deverá ser feito durante as consultas ou pelo telefone da UNICAMP (19) 35218908.

A secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp, também poderá ser contatada, em caso de informação ou reclamações, pelo telefone (19) 35217232.

**AUTORIZAÇÃO**

**Sua autorização significa que você permite a inclusão do paciente pelo qual é responsável no estudo. Portanto, autoriza a utilização dos dados para a pesquisa. Fica claro, também, que os resultados dos exames deste paciente serão entregues aos responsáveis pelo médico geneticista responsável pelo atendimento.**

Assinando este documento, confirmo que o (a) Dr. (a): \_\_\_\_\_ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos, os riscos, desconforto e possíveis vantagens em participar desse estudo. Eu li, foi explicado e compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo.

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

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou responsável

\_\_\_\_\_  
Data

**RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR**

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

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador ou associado

\_\_\_\_\_  
Data

**AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA**

Eu concordo que o DNA de minha família seja estocado

Eu não concordo que o DNA de minha família seja estocado

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

*Anexo III. Checklist*



**Investigação laboratorial da Síndrome Velocardiofacial  
e possíveis fenocópias**

**Coordenadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes  
Departamento de Genética Médica / FCM / UNICAMP**

Nome do paciente: \_\_\_\_\_  
Número de registro: \_\_\_\_\_  
Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: ( )M ( )F  
Hospital Participante: \_\_\_\_\_  
Médico Responsável Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Critérios de inclusão**

Indivíduos com suspeita clínica de Síndrome Velocardiofacial e:

- Ecocardiografia
- Nasofibroscopia (casos sem fenda palatal)

**Outros exames desejáveis:** avaliação oftalmológica, avaliação auditiva; ultra-som abdominal e de vias urinárias; ressonância magnética ou tomografia computadorizada de crânio.

### Dados antropométricos

|               |          |    |                 |    |                  |    |
|---------------|----------|----|-----------------|----|------------------|----|
| Ao nascimento | Peso: Kg | pt | Comprimento: cm | pt | PC: cm           | Pt |
| Atual         | Peso: Kg | pt | Estatura: cm    | pt | PC: cm           | Pt |
| DICE: cm      |          |    | DICI: cm        |    | Dedo médio/Mão % | Pt |

### Sinais clínicos

#### 1 – Cardiopatia congênita

Realizou ecocardiografia? ( ) Sim ( ) Não ( ) Aguarda resultado

- ( ) Normal  
 ( ) Anomalias Conotruncais (Tetralogia de Fallot, interrupção de arco aórtico)  
 ( ) Defeito de septo interventricular  
 ( ) *Truncus arteriosus*  
 ( ) Anel vascular  
 ( ) Outras: \_\_\_\_\_

#### 2 – Anomalias palatais

Realizou nasofibroscopia? ( ) Sim ( ) Não ( ) Aguarda resultado

- ( ) Normal  
 ( ) Insuficiência velo-faríngea  
 ( ) Fenda palatal ou ( ) fenda palatal submucosa  
 ( ) Fenda labial com ou sem fenda palatal: ( ) FL, ( ) FLP  
 ( ) Úvula bifida  
 ( ) Voz anasalada  
 ( ) Disfagia  
 ( ) Outras: \_\_\_\_\_

#### 3 – Fácies característica

- ( ) Sim ( ) Não  
 ( ) Orelhas baixas/dismórficas  
 ( ) Face alongada  
 ( ) Hipertelorismo  
 ( ) Queda palpebral  
 ( ) Nariz típico (raiz proeminente, hipoplasia alar, ponta bulbosa/bifida)  
 ( ) Microcefalia  
 ( ) Outras: \_\_\_\_\_

#### 4 – Alterações imunológicas

- ( ) Sem sinais e sintomas  
 ( ) Não avaliado  
 ( ) Imunodeficiência: ( ) diminuição de linfócitos T, ( ) deficiência de IgA, ( ) deficiência humoral, ( ) infecções de repetição  
 ( ) Doenças auto-imunes: ( ) Artrite reumatóide juvenil, ( ) PTI (Púrpura trombocitopênica idiopática), ( ) hipo/hipertireoidismo  
 ( ) Hipocalcemia secundária a hipoparatiroidismo

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>5 – Desenvolvimento neuro-cognitivo e comportamental</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <input type="checkbox"/> Normal<br><input type="checkbox"/> RDNPM<br><input type="checkbox"/> Atraso/ distúrbio de linguagem<br><input type="checkbox"/> Dificuldade de aprendizagem<br><input type="checkbox"/> Distúrbio comportamental/psiquiátrico: <input type="checkbox"/> TDAH (Transtorno de déficit de atenção/ Hiperatividade), <input type="checkbox"/> traços autísticos, <input type="checkbox"/> esquizofrenia, <input type="checkbox"/> impulsividade, <input type="checkbox"/> perseveração    |
| <b>6 – Desenvolvimento somático</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <input type="checkbox"/> Normal<br><input type="checkbox"/> Dificuldade alimentar<br><input type="checkbox"/> Baixa estatura<br><input type="checkbox"/> Alterado – descrever: _____                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>7 – Hipoacusia</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <input type="checkbox"/> Sem sinais e sintomas<br><input type="checkbox"/> Não avaliado<br><input type="checkbox"/> Avaliado:<br><input type="checkbox"/> normal<br><input type="checkbox"/> Neurosensorial<br><input type="checkbox"/> Condutiva<br><input type="checkbox"/> Outros: _____                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>8 – Alterações oftalmológicas</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <input type="checkbox"/> Sem sinais e sintomas<br><input type="checkbox"/> Não avaliado<br><input type="checkbox"/> Avaliado:<br><input type="checkbox"/> normal<br><input type="checkbox"/> <i>Embriotoxon</i> posterior<br><input type="checkbox"/> Tortuosidade de vasos retinianos<br><input type="checkbox"/> Estrabismo<br><input type="checkbox"/> Outros – coloboma, hipoplasia de nervo óptico, catarata, alterações de íris                                                                          |
| <b>9 – Alterações neurológicas</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <input type="checkbox"/> Não avaliado<br><input type="checkbox"/> Avaliado por tomografia computadorizada<br>Descrever: _____<br><input type="checkbox"/> Avaliado por ressonância magnética:<br><input type="checkbox"/> Atrofia cerebral<br><input type="checkbox"/> Anomalias de corpo caloso<br><input type="checkbox"/> Hipoplasia cerebelar<br><input type="checkbox"/> Alterações de substância branca<br><input type="checkbox"/> Polimicrogiria<br><input type="checkbox"/> Outros – descrever: _____ |
| <b>10 – Alterações de trato urinário</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <input type="checkbox"/> Sem sinais e sintomas<br><input type="checkbox"/> Não avaliado<br><input type="checkbox"/> Avaliado por ultrassonografia<br><input type="checkbox"/> Alterações anatômicas: <input type="checkbox"/> rins em ferradura, <input type="checkbox"/> duplicação renal, <input type="checkbox"/> agenesia renal, <input type="checkbox"/> duplicação sistema coletor                                                                                                                       |

- Nefrocalcinose  
 RVU (Refluxo vesico-ureteral)  
 Outros – descrever: \_\_\_\_\_

**11 – Alterações de trato gastrointestinal**

- Sem sinais e sintomas  
 Não avaliado  
 Avaliado por ultrassonografia  
 Constipação  
 Malrotação intestinal  
 RGE (Refluxo gastroesofágico)  
 Outros: ( ) ânus imperfurado, ( ) atresia esofágica, ( ) Hirschsprung – descrever:  
\_\_\_\_\_

**12 – Alterações esqueléticas**

- Sem sinais e sintomas  
 Avaliação clínica  
 Avaliação radiológica  
 Escoliose  
 Pés tortos  
 Polidactilia  
 Alterações costo-vertebrais  
 Outros: \_\_\_\_\_

**Descrever resultados dos exames realizados:**

Cariótipo:

FISH:

**Heredograma:**

#### **Anexo IV. Protocolo de Cariótipo de sangue periférico por banda G**

Coletar de 2 a 5ml de sangue através de punção venosa com seringa previamente heparinizada (0,2 – 0,4 ml de heparina sódica), ou em tubos de coleta a vácuo contendo heparina sódica (tubos com tampa verde), após assepsia local com álcool 70%. Também pode ser utilizado tubo com citrato de sódio para a coleta.

Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar todos os materiais necessários (conforme número de amostras), ligar o fluxo, a luz UV do mesmo e a luz UV da câmara asséptica por 15 – 20 minutos.

Para preparação do meio de cultura adicionar, em um frasco de 50 ou 100 ml – 80% a 90% do meio de cultura RPMI-1640; 10% a 20% de soro fetal bovino; adicionar 0,2ml de fitohemaglutinina e ajustar o pH para 6,8 – 7,1 adicionando HCl 1M.

Distribuir 5 ml do meio em cada frasco âmbar de 15 ml e adicionar de 0,5ml a 1ml de sangue total heparinizado e tampar com rolhas de silicone.

Incubar os frascos de cultura a 37°C por 72 horas. Entre 1,5h a 2h antes do término das 72 horas, adicionar 0,02ml (1 gotas) de brometo de etídio 1mg/ml e 40 minutos antes do término das 72 horas 0,04ml (2 gotas) de colchicina  $4 \times 10^{-5}M$  à cultura de linfócitos.

Hipotonia Direta: Após retirar os tubos de cultura da estufa, centrifugar a 1.700 rpm por 5 minutos e retirar o sobrenadante. Ressuspender no vórtex (por aproximadamente 10 segundos), adicionar 6 ml de KCl 0,075M a 37°C, ressuspender novamente no vórtex (por aproximadamente 10 segundos) e colocar em incubadora a 37°C por 30 minutos.

Interromper a hipotonia adicionando 0,5ml de solução fixadora (metanol 3:1 ácido acético), ressuspender no vórtex até que todo o material esteja com a coloração homogênea e centrifugar a 1700 rpm por 5 minutos. Retirar o sobrenadante, deixando apenas 1 ml no tubo, adicionar 4 ml de solução fixadora, ressuspender e centrifugar novamente por 1700 rpm durante 5 minutos. Repetir o passo anterior por mais 3 vezes, ou até o *pellet* “ficar limpo” (incolor). Colocar os tubos no freezer por no mínimo 1 hora ou, preferencialmente, deixar por 24 horas.

Deixar as lâminas em uma cuba com álcool 70% por alguns minutos. Após esse período, enxugar as lâminas com papel macio, identificar e colocar em uma cuba com água

deionizada. Retirar o material do freezer, centrifugar, retirar o sobrenadante e adicionar 4 ml de “fixador novo”, centrifugar novamente e retirar o sobrenadante deixando apenas 1 ml ou menos do material. Pingar de três a quatro gotas do material, com pipetas Pasteur, sobre as lâminas molhadas. Colocar as lâminas em uma estufa a 50°C - 56°C, durante alguns minutos e observar em microscópio óptico comum com o diafragma fechado, ou em microscópio de fase.

### ***Composição das soluções necessárias***

#### **Brometo de etídio 1mg/ml**

Pesar de 0,001 a 0,005 g e diluir na proporção de 1mg/1ml em água de injeção, solução fisiológica estéril ou meio RPMI.

#### **Colchicina $4 \times 10^{-5} M$**

***Solução mãe:*** pesar 0,004 g de colchicina e diluir em 10ml de solução salina 0,9% estéril. Manter congelada.

***Solução de uso (1:50):*** diluir 1ml da solução mãe em 49ml de solução salina 0,9% estéril.

#### **Cloreto de potássio (KCl) 0,075M.**

Pesar 1,398g de KCl e dissolver em 250ml de água deionizada.

#### **HCl 37% a 1N – 100 mL**

Diluir 8,28 mL em 100 mL de água deionizada. Essa solução precisa ser autoclavada.

#### **Solução fixadora**

Metanol (3): Ácido acético (1)

## ***Anexo V. Protocolo de extração de DNA pelo método Fenol-Clorofórmio***

### Extração de DNA – 1ª fase

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

### Extração de DNA – 2ª fase

1. Adicionar 3mL de fenol saturado. Misturar, invertendo o tubo gentilmente, e homogeneizar por 10min. Centrifugar por 10min a 2500rpm.

2. Remover a porção superior do tubo (transparente) com uma pipeta Pasteur para outro tubo falcon. Tomar cuidado para não agitar a porção inferior, a qual foi descartada.
3. Adicionar 1,5mL de clorofórmio álcool isoamílico e 1,5mL de fenol saturado. Homogeneizar por 10min e centrifugar por 10min, 2500rpm. Remover a porção inferior do tubo (fenol) com pipeta Pasteur e descartar.
4. Adicionar 3mL de clorofórmio álcool isoamílico, misturar a solução e homogeneizar por 10min. Centrifugar a 2500rpm por 10min. Remover completamente a porção inferior do tubo e descartar.
5. Adicionar 6mL de etanol 100% gelado e misturar levemente, até observar a precipitação do DNA.
6. Levar o frasco para a geladeira overnight.
7. “Pescar” o DNA precipitado com pipeta Pasteur de vidro e ressuspendê-lo em 200-250 $\mu$ L de TE 1x.

## **Anexo VI. Protocolo de MLPA**

Desnaturação do DNA e hibridação das sondas: As amostras de DNA serão diluídas (para obter-se uma concentração de 50 a 200 ng de DNA) em 5 µL de TE. Os DNAs diluídos serão submetidos a uma temperatura de 95°C por cinco minutos, e em seguida a 25°C antes de serem retiradas do termociclador. Após a desnaturação, serão acrescentados 1,5 µL do SALSA *Probemix* e 1,5 µL do *MLPA buffer* a cada tubo. O *mix* será incubado a 95°C por um minuto e em seguida permanecerá a 60°C por 16 horas.

Reação de ligação: No termociclador, em uma temperatura de 54°C, serão adicionados 32 µL de *mix* ligase-65 às amostras. As amostras serão incubadas a 54°C por 15 minutos e em seguida a 98°C por cinco minutos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Em um novo tubo serão adicionados 4 µL de SALSA PCR *buffer*, 26 µL de água estéril e 10 µL do produto da reação de ligação. A uma temperatura de 60°C, será adicionada a enzima (Polymerase *mix*) e imediatamente se iniciará a reação de PCR nas seguintes condições: 35 ciclos → 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C. Ao final dos ciclos → 20 minutos a 72°C.

Separação dos produtos amplificados: Em uma placa de seqüenciamento serão adicionados de 0,6 a 1,0 µL do produto da PCR, 0,25 µL de ET-550R (*sizer*) e 7 µL de *Tween-20* 0,1%. A leitura dos produtos amplificados será no seqüenciador automático Megabace 1000 (Amersham-Pharmacia®).

## **Anexo VII. Protocolo da FISH**

### **a) Preparação e pré-tratamento das lâminas:**

1. Pingar o material em lâminas limpas em álcool;
2. Deixar a lâmina envelhecer por uma noite em temperatura ambiente ou em estufa a 37°C;
3. Observar a lâmina no microscópio de contraste de fase e marcar com caneta diamante a área da lâmina onde deverá ser aplicada a sonda;
4. Colocar as lâminas em uma solução de 2x SSC (pH 7,0) a 37° C (+/- 1°C) durante 60 minutos\*;
5. Desidratar as lâminas em uma série de etanóis a 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada;
6. Deixar as lâminas secarem naturalmente.

\* O tempo em que a lâmina permanece nessa solução é inversamente proporcional à idade da lâmina.

### **b) Co-denaturação:**

1. Deixar a sonda em temperatura ambiente por alguns minutos;
2. Ressuspender a sonda no *vórtex* e dar um *spin* antes de pipetá-la\*;
3. Aplicar 10 µl da sonda sobre a área previamente selecionada da lâmina;
4. Cobrir com uma lamínula de 22x22mm;
5. Selar a lamínula com cola especial;
6. Colocar as lâminas em uma placa aquecida a 75°C (+/- 1°C) e deixar durante 7 minutos.

### **c) Hibridação:**

1. Colocar as lâminas em uma caixa úmida;
2. Colocar em estufa a 37°C (+/- 1°C) por uma noite (de 12 a 16 horas).

### **d) Pós-hibridação:**

1. Remover a lamínula e toda a cola, cuidadosamente;

2. Colocar as lâminas em uma solução de 2x SSC/0.1% Tween 20 (pH 7,0) por 2 minutos em temperatura ambiente;
3. Colocar as lâminas em uma solução de 0,4xSSC/0.3% Tween 20 a 72°C (+/-1°C) (pH 7,0) por 1 minuto, sem agitação;
4. Colocar as lâminas em uma solução de 2xSSC/0,1% Tween 20 (pH 7,0) por 30 segundos em temperatura ambiente, sem agitação;
5. Deixe secar em temperatura ambiente;
6. Aplicar 15 µl de DAPI.
7. Cobrir com lamínula (24x32) e guardar a lâmina em uma caixa escura, por no mínimo 10 minutos, antes de observar em microscópio de fluorescência.

As lâminas devem ser armazenadas em caixas escuras por no máximo 1 mês em geladeira.

### *Composição das Soluções necessárias*

#### Etanol 100%

50mL

#### Etanol 85%

42,5 mL etanol 100%

7,5 mL água destilada estéril

#### Etanol 70%

35 mL etanol 100%

15 mL água destilada estéril

#### Ácido Acético 70%

35mL de ácido acético 100%

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

87,67g NaCl

44,12g citrato de sódio

Dissolver o NaCl e o citrato de sódio em 400mL de água destilada, ajustar o pH com HCL 1M e depois colocar 100mL de água destilada (volume final de 500mL) ajustando o pH novamente para 5,3, filtrar e conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

Solução 2xSSC

10mL 20xSSC

90mL água destilada estéril

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

Solução PBS 10X pH 7,4 (Solução mãe)

80g NaCl

2g KCl

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

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

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

Solução PBS 1x pH 7,2

450mL de água destilada

50 PBS 1x

Solução Formadído 1% /PBS 1x

2,7 mL de formaldeído 37%

100mL de PBS 1x pH 7,2

Solução 2x SSC/ 0,1 % Tween 20

90mL de água destilada

10mL de 20Xssc

100 µl Tween 20

Solução 0,4XSSC/0,3% Tween 20

2mL de 20x SSC

300 µl de Tween 20

Água destilada para completar 100mL

**Anexo VIII. Componentes e volumes das reações de PCR para amplificação dos exons do gene *TBX1***

Exons 1, 5, 6 e 9B:

| <b>Reagentes</b>                     | <b>Exon 01</b> | <b>Exon 05</b> | <b>Exon 06</b> | <b>Exon 9B</b> |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ddH <sub>2</sub> O                   | 8,6µl          | 9,0µl          | 9,0µl          | 8,8µl          |
| Tampão (10X)                         | 1,5µl          | 1,5µl          | 1,5µl          | 1,5µl          |
| MgCl <sub>2</sub> (25µM)             | 0,6µl          | 0,6µl          | 0,6µl          | 0,8µl          |
| dNTP (2µM)                           | 1,5µl          | 1,5µl          | 1,5µl          | 1,5µl          |
| <i>primer sense</i><br>(5pmoles)     | 0,35µl         | 0,35µl         | 0,35µl         | 0,35µl         |
| <i>primer antisense</i><br>(5pmoles) | 0,35µl         | 0,35µl         | 0,35µl         | 0,35µl         |
| DMSO <sub>4</sub>                    | 0,9µl          | 0,5µl          | 0,5µl          | 0,5µl          |
| <i>Taq</i> DNA Polimerase<br>(5U)    | 0,2µl          | 0,2µl          | 0,2µl          | 0,2µl          |
| DNA (200ng/µl)                       | 1µl            | 1µl            | 1µl            | 1µl            |

Exons 02, 03, 04, 07, 08 e 9C:

| <i>Reagentes</i>                     | <i>Exons 02, 03, 04, 07, 08 e 9C</i> |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| ddH <sub>2</sub> O                   | 2,85μl                               |
| Tampão Qiagen (10X)                  | 1,0μl                                |
| Qiagen Q-solution (5X)               | 2,0μl                                |
| dNTP (2μM)                           | 1,0μl                                |
| <i>primer sense</i> (5pmoles)        | 1,0μl                                |
| <i>primer antisense</i><br>(5pmoles) | 1,0μl                                |
| <i>Taq</i> DNA Polimerase<br>(5U)    | 0,15μl                               |
| DNA (200ng/μl)                       | 1,0μl                                |

**Anexo IX. Componentes e volumes das reações de PCR para amplificação dos exons do gene *FGF8***

Exons 3, 4, 5 e 6:

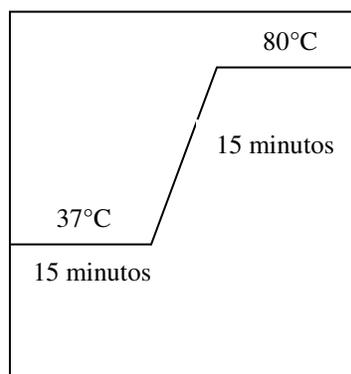
| <b><i>Reagentes</i></b>              | <b><i>Exon 03</i></b> | <b><i>Exon 04</i></b> | <b><i>Exon 05</i></b> | <b><i>Exon 6</i></b> |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| ddH <sub>2</sub> O                   | 8,5µl                 | 9,0µl                 | 8,0µl                 | 8,8µl                |
| Tampão (10X)                         | 1,5µl                 | 1,5µl                 | 1,5µl                 | 1,5µl                |
| MgCl <sub>2</sub> (25µM)             | 0,9µl                 | 0,6µl                 | 0,6µl                 | 0,8µl                |
| dNTP (2µM)                           | 1,5µl                 | 1,5µl                 | 1,5µl                 | 1,5µl                |
| <i>primer sense</i><br>(5pmoles)     | 0,35µl                | 0,35µl                | 0,35µl                | 0,35µl               |
| <i>primer antisense</i><br>(5pmoles) | 0,35µl                | 0,35µl                | 0,35µl                | 0,35µl               |
| DMSO <sub>4</sub>                    | 0,7µl                 | 0,5µl                 | 1,5µl                 | 0,5µl                |
| <i>Taq</i> DNA Polimerase<br>(5U)    | 0,2µl                 | 0,2µl                 | 0,2µl                 | 0,2µl                |
| DNA (200ng/µl)                       | 1µl                   | 1µl                   | 1µl                   | 1µl                  |

**Anexo X. Protocolo da reação de Exo-Sap (GE™)**

Purificação com a enzima Exo-Sap (GE™)

| <b>Reagentes</b> | <b>Volume</b> |
|------------------|---------------|
| PCR              | 1,5µl         |
| Exo-Sap (GE™)    | 1,5µl         |

A condição para a reação de Exo-Sap (GE™) está representada a seguir:

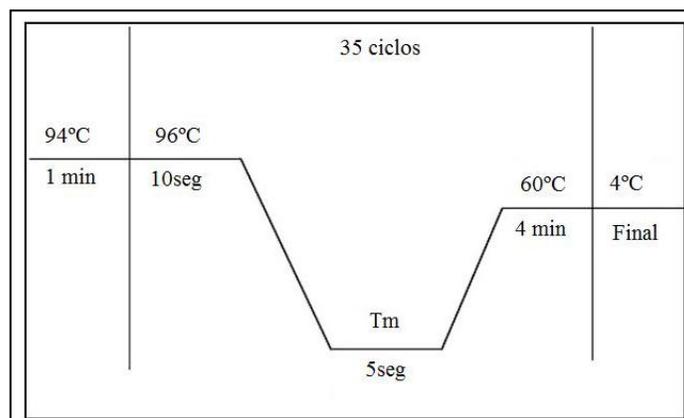


## Anexo XI. Protocolo da reação de seqüenciamento

Componentes e volumes dos reagentes utilizado na reação de seqüenciamento.

| Reagente                           | Volume      |
|------------------------------------|-------------|
| Big Dye                            | 1 $\mu$ l   |
| Tampão 5X - sequencing buffer 5 X. | 3 $\mu$ l   |
| PCR                                | 2 $\mu$ l   |
| Primer                             | 0,5 $\mu$ l |
| H2O                                | 3,5 $\mu$ l |

A condição para a reação de seqüenciamento está representada a seguir.



### Purificação da reação de seqüenciamento

#### Lavagem com Isopropanol:

Para uma reação com volume final de 10  $\mu$ l, utilizar 40 $\mu$ l de isopropanol – MERCK® a 75%. Preparar esta solução sempre na hora de usar. Após adicionar o isopropanol, dar spin down e deixar em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida centrifugar por 45 minuto a 4000 rpm (placas).

### Lavagem com Etanol

Remover o isopropanol invertendo a placa em um local de descarte. Após adicionar 200  $\mu$ l de etanol – MERCK© a 70%. Preparar esta solução sempre na hora de usar. Dar spin down e centrifugar por 45 minutos a 4000 rpm (placas).

Em seguida, remover TODO o etanol, realizando um spin down invertido na placa.

Após, secar as amostras em placa quente a 64° por 3 minutos no termociclador, não fechar a máquina, colocar apenas um papel sobre a placa.

Ressuspender 10 $\mu$ l de formamida Hi-Di, colocar 5 minutos no termociclador a 95°C e inserir no seqüenciador automático.

**Anexo XII. Dados clínicos obtidos através da avaliação clínica e do checklist.**

| <b><i>Características Fenotípicas</i></b>        | <b><i>Sim</i></b> | <b><i>Não</i></b> | <b><i>Não avaliado</i></b> |
|--------------------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| Cardiopatía Congênita                            | 46,8%             | 37,6%             | 15,6%                      |
| <i>Tetralogia de Fallot</i>                      | 7,8%              |                   |                            |
| <i>Defeito de Septo interventricular</i>         | 35,3%             |                   |                            |
| <i>Outros</i>                                    | 56,9%             |                   |                            |
| Anomalias palatais                               | 87,2%             | 1,8%              | 11,0%                      |
| <i>Insuficiência Velo-faríngea</i>               | 35,8%             |                   |                            |
| <i>Fenda Submucosa</i>                           | 21,1%             |                   |                            |
| <i>Fenda Palatal</i>                             | 20,0%             |                   |                            |
| <i>Fenda Labio-Palatina</i>                      | 13,7%             |                   |                            |
| <i>Fenda Labial</i>                              | 8,3%              |                   |                            |
| <i>Outros</i>                                    | 1,1%              |                   |                            |
| <i>Facies característica</i>                     | 82,6%             | 17,4%             | -                          |
| Alterações imunológicas                          | 33,9%             | 26,6%             | 39,5%                      |
| Desenvolvimento neuro-cognitivo e comportamental | 83,5%             | 13,8%             | 2,7%                       |
| Desenvolvimento somático                         | 56,9%             | 35,8%             | 7,3%                       |
| Hipoacusia                                       | 45,0%             | 33,9%             | 21,1%                      |
| Alterações oftalmológicas                        | 25,7%             | 45,0%             | 29,3%                      |
| Alterações neurológicas                          | 21,2%             | 39,4%             | 39,4%                      |
| Alterações de trato urinário                     | 34,9%             | 12,8%             | 52,3%                      |
| Alterações de trato gastrointestinal             | 32,1%             | 51,4%             | 16,5%                      |
| Alterações esqueléticas                          | 36,7%             | 54,1%             | 9,2%                       |