

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Genética

Análise Cromossômica por Microarranjo aplicada ao
Diagnóstico das Síndromes Genômicas que envolvem a região
22q11.2

ANA JULIA DA CUNHA LEITE

Goiânia-GO
2016

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Genética

**Análise Cromossômica por Microarranjo aplicada ao
Diagnóstico das Síndromes Genômicas que envolvem a região
22q11.2**

ANA JULIA DA CUNHA LEITE

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz, *PhD*.
Co-orientador: Profa. Dra. Lysa Bernardes Minasi.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Goiânia-GO
2016

L533 Leite, Ana Julia da Cunha
Análise cromossômica por microarranjo aplicada ao
diagnóstico das síndromes genômicas que envolvem a
região 22q11.2 [manuscrito] / Ana Julia da Cunha Leite.--
2016.

56 f.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação STRICTO
SENSU em Genética, Goiânia, 2016

Inclui referências, f. 42-47

1. Genoma. 2. Genética. 3. Síndromes. 4. Doenças.
I.Cruz, Aparecido Divino da. II.Pontifícia Universidade
Católica de Goiás. III. Título.

CDU: Ed. 2007 -- 575.111(043)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 115/2016

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: ANA JULIA DA CUNHA LEITE

DEFENDIDA EM 14 DE MARÇO DE 2016 E Aprovada COM CONCEITO...A.....

O título foi alterado () não (X)sim Análise cromossômica por microarray
aplicada ao diagnóstico das Síndromes genômicas que
envolvem a região 22q11.2.

BANCA EXAMINADORA

.....
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz / PUC Goiás
(presidente-orientador)

.....
Profª. Dra. Kátia Karina V O Moura / PUC Goiás
(Membro interno)

.....
Profª. Dra. Thais Cidália Vieira Gigonzac/UEG
(membro externo)

Dedicatória
À minha mãe Aparecida Maria da Cunha.
Ao meu irmão Guilherme Augusto da Cunha
Aos meus sobrinhos Pedro Paulo Silva da Cunha e Luísa Silva da Cunha

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por ser o condutor de toda a minha vida, por me dar forças nos momentos difíceis.

Ao **Prof. Aparecido D. da Cruz (Peixoto)**, por sua amizade, apoio, incentivo, carinho e, também, por me orientar. E á minha querida co-orientadora **Prof^ª. Lysa Bernades Minasi**, pela sua amizade, incentivo, dedicação, apoio e toda paciência do mundo.

Aos **pacientes e suas famílias** que doaram voluntariamente as amostras para que este estudo pudesse acontecer. E a toda **Equipe** do Núcleo de Pesquisas Replicon que direta ou indiretamente fazem parte do sucesso desse trabalho.

À **Irene Plaza Pinto** por seu apoio na realização da CMA e pelo auxílio na análise e interpretação dos dados e por todo o carinho e amizade dedicado á mim. E ao **Cristiano Luiz Ribeiro** pela generosa contribuição com o bandeamento G e análise das metáfases.

À minha mãe **Aparecida Maria da Cunha**, por todo apoio, dedicação, intercessão e amor incondicional que sempre me manteve na direção certa.

Ao meu irmão, **Guilherme Augusto da Cunha**, por toda a sua Irmandade, apoio, por ser meu porto seguro e sempre estar ao meu lado.

Aos meus sobrinhos e afilhados **Pedro Paulo , Luísa e Miguel**, que mesmo sendo pequeninos, demonstram um amor incondicional.

Aos **meus amigos**, por me apoiarem á fazer o mestrado, por estarem ao meu lado, por me incentivarem e por entender a minha ausência em alguns momentos. A vocês, todo o meu amor, minha amizade e minha dedicação.

A toda **minha família**, por todo apoio e amor. Muito do que sou, devo a vocês.

Aos meus **colegas de Mestrado** da turma 7, o meu muito obrigado á toda amizade, incentivo, brincadeiras, lanches e conhecimentos divididos. Começamos juntos uma fase em nossas vidas e agora á concluímos com todo louvor.

À **FAPEG** pela bolsa de estudos e ao **CNPq** pelo fomento à pesquisa que garantiram a conclusão do curso e a consecução deste estudo.

Aos **Professores** do Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelos seus conhecimentos.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 – INTRODUÇÃO.....	12
2- REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. Síndrome de DiGeorge ou Síndrome da deleção do cromossomo 22q11.2..	14
2.2. Síndrome da Microduplicação do Cromossomo 22q11.2 ou Síndrome da duplicação do cromossomo 22q11.2	18
2.3. Genes envolvidos na região 22q11.2.....	19
2.4 Identificação das microdeleções e microduplicações em 22q11.2.....	21
3 – OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Seleção dos Participantes.....	25
4.2. Coleta e Processamento das Amostras.....	25
4.3. Cariótipo com Bandas G.....	25
4.4. Extração e Quantificação das Amostras.....	26
4.5. Análise Cromossômica por Microarranjos.....	26
4.5.1 Descrição do método de CMA.....	26
4.5.2. Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs.....	27
4.6. Busca de alterações e estabelecimento do padrão de herança.....	27
4.7. Análise das LCRs na região 22q11.2.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXO.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das LCRs na região 22q11.2 que estão envolvidas com mecanismo de formação das CNVs.

Figura 2. Paciente 02, encaminhado ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu Heredograma familiar.

Figura 3. Resultado da CMA do paciente 02.

Figura 4. Paciente 01, encaminhada ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu Heredograma familiar.

Figura 5. Resultado do Cariótipo e CMA do paciente 01.

Figura 6. Paciente 03, encaminhado ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu Heredograma familiar.

Figura 7. Resultado do Cariótipo e CMA do paciente 03.

Figura 8. Paciente 04, encaminhado ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu Heredograma familiar.

Figura 9. Resultado da CMA do paciente 04.

Figura 10. Paciente 05, encaminhada ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu Heredograma familiar.

Figura 11. Resultado da CMA do paciente 05.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características Clínicas e moleculares dos cinco probandos rastreados pela tecnologia de alta resolução CMA.

LISTA DE ABREVIACÕES

AGD – Atraso Global no Desenvolvimento

CAPE PUC / GO - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás

CATCH 22- do inglês, *Conotruncal heart defect, Abnormal face, T-cell deficiency, Clefting, e Hypocalcemia*

CES- do inglês, *Cat Eye Syndrome*- Síndrome do Olho do Gato

CMA - do inglês, *Chromosomal MicroArray* - Análise Cromossômica por Microarranjos

CNVs- do inglês, Copy Number Variants – Variação do Número de Cópias

COMT – Catecol O-Metiltransferase

CRKL – do inglês, v-crk avian sarcoma vírus CT10 oncogene homolog-like

DNA - do inglês, *DeoxyriboNucluc Acid* – Ácido DesoxirriboNucleico

EDTA – do inglês, *EthylenDdiamineTetraAcetic Acid* – Ácido EtilenoDiamino Tetra-Acético

FISH- do inglês, *Fluorescent in situ Hybridization* - Hibridização Fluorescente *in situ*

GTG- Bandas G por tripsina e giemsa

SCN – do inglês, *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

LaGene/LACEN/SES-GO- Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás

LCRs – do inglês, *Low Copy Repeats* – Baixas cópias de repetição

LINEs - do inglês, *Long Interspersed Elements* - elementos intercalados lineares longos

LOH- perda de heterozigose

MAPD – do inglês, *Median Absolute Pairwise Difference*

MGene – Mestrado em Genética

miRNAs- microRNAs

NAHR- do inglês, *Non-allelic homologous recombination* - recombinação homóloga não alélica

NPR/PUC Goiás - Núcleo de Pesquisas Replicon, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás

OMIM: do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*: Herança Mendeliana em Humanos Online

SD - do inglês, *Segmental Duplications* – Duplicações segmentais

SD22q11.2 - Síndrome da deleção 22q11.2

SDG - síndrome de DiGeorge

SR- sequência de Robin

SINEs – do inglês, *Short Interspersed Elements*- intercalados lineares curtos

SNPs- do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de um Único Nucleotídeo

SVCF - síndrome Velocardiofacial

TBX1 – T-box fator de transcrição 1

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

RESUMO

A região do cromossoma 22q11.2 tem sido implicada em doenças genômicas. Algumas regiões genômicas exibem numerosas regiões de repetições de pequeno número de cópias que proporcionam o aumento da instabilidade genômica e mediam deleções e duplicações em muitas desordens. A Síndrome de DiGeorge é a síndrome de deleção mais comum e as duplicações recíprocas ocorrem na metade da frequência das microdeleções. Nós descrevemos cinco pacientes com variabilidade fenotípica que possuem deleções ou duplicações recíprocas em 22q11.2 detectados pela Análise Cromossômica por Microarray. A tecnologia CytoScan HD foi usada para detectar alterações da variação do número de cópias no genoma de pacientes que tiveram indicação clínica de atraso global no desenvolvimento com cariótipo normal. Observamos no nosso estudo três microdeleções e duas microduplicações na região 22q11.2 com intervalos variáveis onde contém genes conhecidos e transcrições não estudadas, tais como as LCRS que muitas vezes flanqueiam estes rearranjos genômicos. A identificação destas variantes são de particular interesse para fornecer uma visão dos genes ou das regiões genômicas que são cruciais para as manifestações fenotípicas específicas e são úteis para auxiliar na busca pela compreensão dos mecanismos subjacentes à deleções e duplicações genômicas.

Palavras chaves: Rearranjos, LCRs, CMA, 22q11.2

ABSTRACT

The chromosome 22q11.2 region has long been implicated in genomic diseases. Some genomic regions exhibit numerous low copy repeat with high identity in which provide increased genomic instability and mediate deletions and duplications in many disorders. DiGeorge Syndrome is the most common deletion syndrome and reciprocal duplications could be occurring in a half of the frequency of microdeletions. We described five patients with phenotypic variability that carries deletions or reciprocal duplications at 22q11.2 detected by Chromosomal Microarray Analysis. The CytoScan HD technology was used to detect changes in the genome copy number variation of patients who had clinical indication to global development delay and a normal karyotype. We observed in our study three microdeletions and two microduplications in 22q11.2 region with variable intervals contained known genes and unstudied transcripts as well as the LCRs that are often flanking and within this genomic rearrangement. The identification of these variant are of particular interest due to it may provide insight in genes or genomic regions there are crucial for specific phenotypic manifestations and are useful to assist the quest for understanding the mechanisms subjacent to genomic deletions and duplications.

Key words: rearrangements, LCRs, CMA, 22q11.2

1. INTRODUÇÃO

Microdeleções e microduplicações também denominadas de Variações no Número de Cópias (CNVs) podem ocorrer por meio de recombinação homóloga não alélica (NAHR), inter ou intracromossômica, causada pela presença de várias regiões de repetições de pequeno número de cópias denominadas de LCRs – *Low Copy Repeats* (BLENNOW *et al.*, 2008). Certas regiões do genoma são enriquecidas com múltiplas LCRs em vários módulos com alto grau de homologia (95-99%) em suas sequências, resultando em instabilidade nessa região (VERGÉS *et al.*, 2014), dando origem a uma série de síndromes denominados de distúrbios genômicos, dentre estes estão incluídos a Síndrome de DiGeorge/Síndrome Velocardiofacial ou Síndrome da deleção 22q11.2 e a Síndrome da duplicação 22q11.2 (ENSENAUER *et al.*, 2003).

A síndrome de DiGeorge ou Síndrome da deleção 22q11.2 (SD22q11.2) é considerada uma das síndromes de microdeleção genética mais frequentes em seres humanos, com a incidência de aproximadamente 1 caso para cada 4.000 á 6.000 nascidos vivos (VERHAGEN *et al.*, 2012). E apenas um número muito pequeno de indivíduos com duplicação nessa região já foi descrito até o momento, provavelmente devido ao fenótipo brando e altamente variável o que pode fazer com que a síndrome da duplicação passe despercebida (OU *et al.*, 2008).

Diversas manifestações clínicas podem ser encontradas na SD22q11.2 incluindo dismorfismo facial, hipocalcemia, imunodeficiências, hipoplasia tímica, alterações da linguagem e do desenvolvimento (YAMAGISHI, 2002). O fenótipo dos pacientes com a microduplicação, assim como o das microdeleções, é bastante variável, incluindo atraso no desenvolvimento, anomalias congênitas múltiplas, atraso de crescimento, perda de audição e ainda compartilha algumas características fenotípicas da SD22q11.2 como defeitos cardíacos, fenda palatina, insuficiência velo faríngea, fala hipernasal e anomalias urogenitais (PORTNOI, 2009).

A maior disponibilidade de testes genéticos e o crescente conhecimento sobre as síndromes genéticas têm aumentado o número de casos descritos, levando a uma ampliação do espectro clínico, permitindo, dessa forma, o diagnóstico em pacientes com manifestações não clássicas (SILVA *et al.*, 2010).

Conhecer a causa genética destas condições são fundamentais para a adequada avaliação e manejo clínico, tanto deles como de suas famílias, pois irá permitir um diagnóstico, que em contrapartida poderá trazer conforto para a família. Além de contribuir para prever a evolução clínica com relativa segurança e delinear um plano de tratamento

adequado, com o objetivo de melhorar o estado geral desta criança e a sua qualidade de vida e da sua família. Assim o reconhecimento da síndrome não apenas permite identificar e tratar anormalidades associadas, mas também influencia no aconselhamento genético aos familiares (GREENHALGH *et.al.*, 2003; HOPKIN *et.al.*, 2000).

Apesar dos estudos citogenéticos através do cariótipo de alta resolução serem capazes de identificar uma pequena parcela de pacientes com a SD22q11 (15% ou menos) (KOSHIYAMA *et.al.*, 2009), a maioria destes indivíduos apresentam deleções menores (microdeleções) que podem ser detectadas pela técnica de FISH, porém em aproximadamente 2% a 3% dos casos, os pacientes podem apresentar rearranjos ou deleções ainda menores em 22q11.2 identificados somente através de técnicas moleculares diferentes do FISH (CARLSON, *et.al.*, 1997). Atualmente existem metodologias mais sensíveis e abrangentes que possibilitam uma análise genômica de maior extensão mais adequadas neste caso, como a técnica de CMA (do inglês, *Chromosomal MicroArray*).

A CMA consiste em uma técnica de citogenômica, aplicadas para a detecção de microdeleções e/ou microduplicações de um amplo espectro de regiões clinicamente significativas do genoma humano (LU *et al.*, 2008; KONG *et al.*, 2013). A CMA é capaz de detectar variações genômicas em regiões críticas dos cromossomos, geralmente não detectados através da investigação por citogenética convencional. (COULTER *et al.*, 2011).

Os casos que apresentam sinais clínicos de síndromes genéticas que envolvem a região 22q11.2 e apresentam cariótipo sem alteração, ficam sem conclusão do diagnóstico pelos médicos assistentes. A técnica da CMA traz resoluções para esta questão, pois possibilita o fornecimento de informações adicionais que auxiliarão no fechamento do diagnóstico e consequentemente no manejo do paciente. Com isso, o objetivo geral do presente estudo foi relatar cinco casos com variabilidade fenotípica e que apresentam microduplicações e microdeleções recíprocas em 22q11.2 detectas pela técnica de Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Síndrome de DiGeorge ou Síndrome da deleção do cromossomo 22q11.2

A síndrome de DiGeorge (SDG) ou Síndrome da Deleção 22q11.2 (SD22q11) (OMIM #188400) é uma das desordens genômicas mais comuns nos seres humanos e ocorre em aproximadamente 1:4000 nascidos vivos, afetando igualmente os sexos masculino e feminino. Devido à alta variabilidade clínica e uma incidência comum na população, a Síndrome de Deleção 22q11.2 (SD 22q11.2) foi descrita de várias formas independentes, incluindo Síndrome Velocardiofacial (SVCF; OMIM#192430), Síndrome do Olho do Gato (CES; OMIM#188400), Síndrome de Shprintzen (#182212), Síndrome de DiGeorge, CATCH 22 (*Conotruncal heart defect, Abnormal face, T-cell deficiency, Clefting, and Hypocalcemia*) e Síndrome da Anomalia Facial Conotruncal, entre outras. Estas diferentes designações promovem erros ou confusão diagnóstica, pois apesar da impressão equivocada de que são doenças distintas elas apresentam a mesma condição gênica com expressões clínicas variadas (FOMIN, 2009; TKACHENKO *et al.*, 2015).

A primeira descrição da Síndrome foi feita por SEDLAČKOVA em 1955 onde relatou um grupo de pacientes com voz anasalada e diminuição da mímica facial. Em 1968, um cardiologista pediátrico Robert Strong descreveu uma família na qual apresentava arco aórtico à direita, dismorfismo facial e déficit cognitivo. Em seguida, Angelo DiGeorge, um endocrinologista pediátrico, relatou três crianças com deficiência imune letal de células T associada à hipoplasia das paratireoides. Em 1969, CAYLER descreveu uma série de pacientes com anomalias cardíacas conotruncais e face assimétrica ao choro, enquanto Kinouchi *et al* relataram, no Japão, em 1976, uma síndrome caracterizada por cardiopatia congênita e aparência facial típica à qual denominaram “Síndrome da Anomalia Facial Conotruncal”. Em 1978, SHPRINTZEN descreveu 12 indivíduos com um quadro de cardiopatia congênita, voz anasalada com anomalias de palato, aparência facial característica e dificuldades de aprendizagem. Na época, ele usou o termo “Síndrome Velocardiofacial” para caracterizar o quadro, que também ficou conhecido como Síndrome de Shprintzen (ROSA *et al.*, 2009).

Devido aos muitos termos designados, em 1998 BASSET *et al* sugeriram o termo Síndrome da Deleção 22q11 (SD22q11), onde unifica etiologicamente as nomenclaturas SDG/VCF e é utilizado até os dias atuais (SORENSEN *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2010; SANDRI, 2011).

Mais de 180 achados clínicos já foram descritos para a SD22q11, tanto do ponto de vista físico como comportamental, onde podemos destacar dismorfismo facial, malformações cardíacas, hipocalcemia, imunodeficiências, fenda lábio-palatina, hipoplasia tímica, deficiência intelectual, alterações da linguagem, aprendizado e do desenvolvimento. Porém nenhuma dessas características são patognomônicas ou obrigatórias para a síndrome, entretanto algumas delas são cardinais e deveriam levar a um alto índice de suspeita clínica, como a presença de fissura palatina e a Sequência de Robin (SR; OMIM%261800) (YAMAGISHI, 2002; SILVA *et.al.*,2010; SANDRI, 2011; MCDONALD-MCGINN AND SULLIVAN, 2011) A Sequência de Robin é descrita na literatura como uma anomalia craniofacial caracterizada por hipoplasia mandibular, glossoptose e fissura de palato levando a apneia obstrutiva e dificuldades alimentares com risco de vida durante o período neonatal (TAN *et al.*, 2013; OLIVEIRA and DOMINGUES, 2015) e aproximadamente 11% dos casos ocorrem na SD22q11.

Embora o cromossomo 22 represente apenas 2% do genoma haploide humano, rearranjos envolvendo o cromossomo 22 estão associados tanto com alterações constitucionais do desenvolvimento, quanto com múltiplas desordens malignas como leucemia linfocítica aguda, mieloma múltiplo e linfoma. A maioria destes rearranjos envolvem a região 22q11.2 o que sugere uma maior instabilidade estrutural desta região (SHAIKH *et al.*, 2000). A identificação de sequências de DNA repetidas em poucas cópias no cromossomo 22, denominadas de LCRs (*Low Copy Repeats*), levou a suspeita de que estas regiões poderiam ser responsáveis pela instabilidade de 22q11.

As LCRs são constituídas por grandes sequências idênticas e fornecem substrato para a recombinação homóloga. São também chamadas de duplicações segmentais (SD, *Segmental Duplications*) ou duplicons, consistindo de blocos de DNA de aproximadamente 10-400 kb com mais de 97% de identidade, que se originam por duplicações de segmentos genômicos resultando em regiões parálogas, e compreendem de 5% a 10% do genoma (BAILEY et al; CAMPBELL et al., 2013. Estão localizadas próximas, mas não adjacentes umas as outras, e geralmente são separadas por menos do que 10 Mb de sequência única (INOUE AND LUPSKI, 2002; SHAW AND LUPSKI, 2004).

Devido à alta similaridade, as LCRs se alinham durante a divisão celular meiótica ou mitótica, e esse alinhamento pode ocorrer entre cromossomos distintos, homólogos ou não, ou entre diferentes loci de um mesmo cromossomo. Quando as LCRs estão localizadas em um mesmo cromossomo nós temos deleções, duplicações e inversões. Já quando as LCRs estão

localizadas em cromossomos diferentes nós vamos ter o que chamamos de translocações. (LUPSKI, 2003; LUPSKI, 2004).

A região 22q11.2 apresenta um número elevado de LCRs que aumentam a instabilidade genômica nesta região favorecendo o surgimento de rearranjos cromossômicos. Evidências recentes têm demonstrado que essas LCRs são mediadas por recombinação homóloga não alélica (NAHR) que resulta nos rearranjos do 22q. Em tese, os eventos de deleção e duplicação podem ocorrer em proporções iguais, como resultado da NAHR causado por crossover desigual das LCRs (ENSENAUER *et al.*, 2003).

Mais 90% das deleções proximais são *de novo*, e estudos tem demonstrado que há uma maior contribuição materna nestas deleções *de novo* que estão atribuídas a altas taxas de cruzamento meiótico em mulheres (BURNSIDE, 2015). A deleção pode ser herdada em 10% dos casos e segrega nas famílias com um padrão de herança autossômico dominante, ou seja, indivíduos com a deleção tem um risco de 50% de transmitirem aos seus filhos (VAN ENGELEN *et al.*, 2010; SANDRI, 2011).

A deleção é causada por um evento de recombinação homóloga durante o primeiro estágio da prófase da meiose, na maioria das vezes secundário a um erro de pareamento das sequencias de DNA entre dois cromossomos 22, de forma que a LCR proximal de um deles reconhece a distal do outro. Como os cromossomos estão próximos e alinhados ocorre um crossing-over desigual, fazendo com que um dos cromossomos 22 sofra uma deleção e o outro receba o material cromossômico extra (SWILLEN *et al.*, 2000; KOBRYNSKI AND SULLIVAN, 2007; SANDRI, 2011).

Na região 22q11.2, oito grupos de LCRs foram identificadas e são chamadas de LCR22 A até H. Estas LCRs estão flanqueando ou dentro da região de microdeleção. São quatro LCR22s centroméricas (LCR22 A- D) que estão relacionadas com microdeleção recíproca e SDG/ SVCF. Em contrapartida, as LCR22s teloméricas, denominadas de LCR22s D - H, localizadas na porção distal da região 22q11.2, foram relacionadas com microdeleções distal e microduplicações recíprocas (SHAIKH *et al.*, 2001; MIKHAIL *et al.*, 2014) (Figura 1). Cerca de 85-90% dos indivíduos com a SDG apresentam uma deleção de aproximadamente 3MB, conhecida como a região tipicamente deletada (*typically deleted region*, TDR) que se estende da LCR22s A – D onde engloba mais de 60 genes entre eles o *TBX1* e cerca de 8 -10% possuem uma deleção de 1,5MB, conhecida de região crítica de Digeorge (DGRC), flanqueadas pelas LCRS22 A- B. Indivíduos com deleções atípicas também tem sido relatado (BURNSIDE, 2015) (Figura 1).

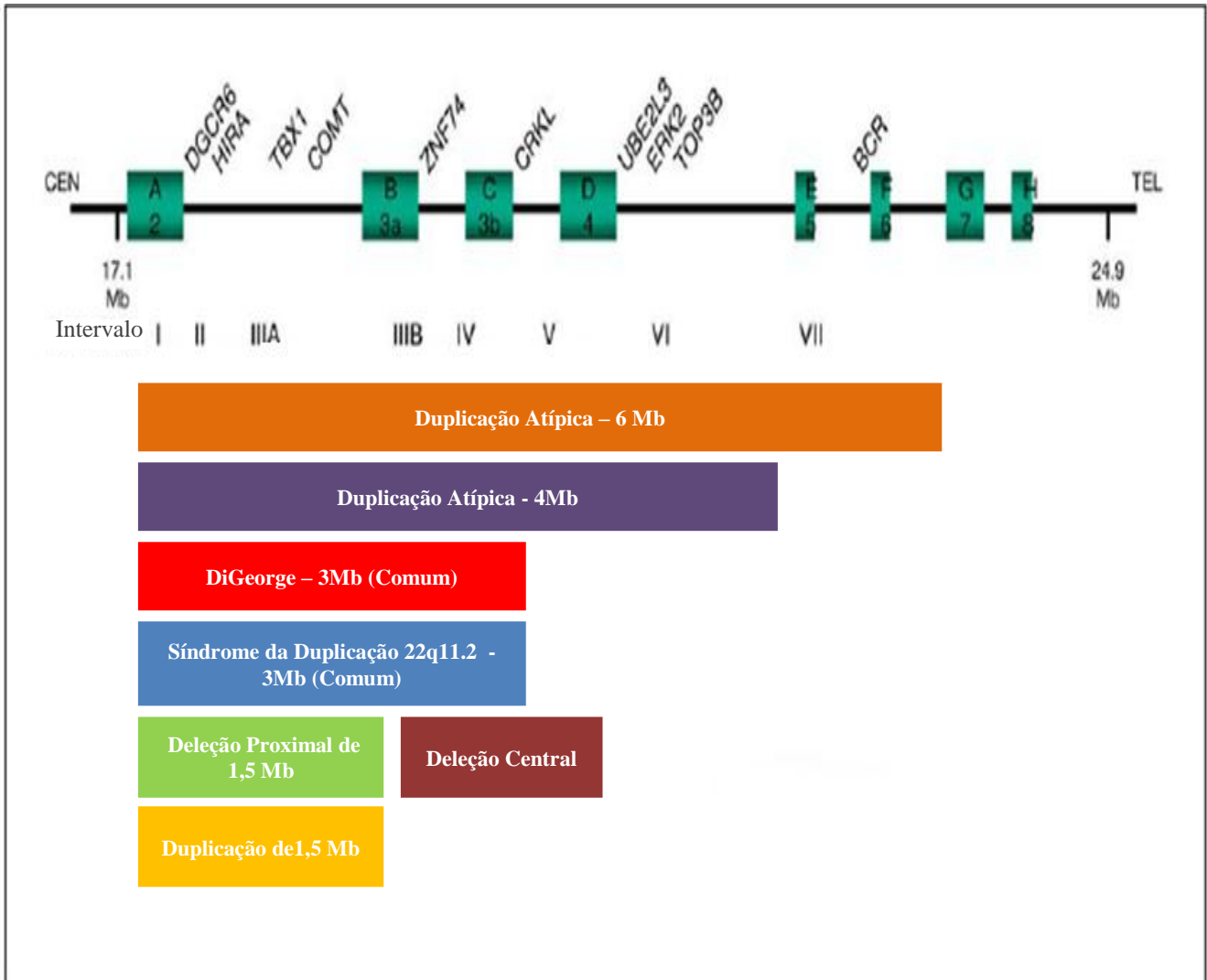


Figura 1. Representação esquemática das LCRs na região 22q11.2 que estão envolvidas com mecanismo de formação das CNVs. As LCRs estão representadas em verde desde a posição centromérica à posição telomérica do cromossomo 22, assim como os genes descritos para esta região. Os retângulos coloridos abaixo representam as microdeleções e microduplicações típicas para esta região.

Fonte: Leite, 2016

Em um estudo feito por RUMP *et al.*, 2014, propôs chamar de Deleção Central 22q11.2 as deleções localizadas entre as LCR22 B- D, denominadas na literatura de deleções 22q11.2 atípicas ou distal. A identificação dessas deleções centrais é relevante não apenas para o aumento das taxas de diagnóstico, mas para a identificação de genes específicos que poderiam estar envolvidos em diferentes fenótipos da SD22q11.2. Alguns estudos têm indicado que a deleção do gene *CRKL* localizado dentro da região central 22q11.2 podem causar as características fenotípicas da síndrome da deleção 22q11.2 (GURIS *et al.*, 2001; MOON *et al.*, 2006, STACHON *et al* 2007).

2.2. Síndrome da Microduplicação do Cromossomo 22q11.2 ou Síndrome da Duplicação do Cromossomo 22q11.2

A Síndrome da Microduplicação 22q11.2 (*OMIM* #608363) é uma síndrome relativamente nova, em contrapartida, a síndrome de microdeleção 22q11.2, é relativamente comum (estimada em 1:4000 nascimentos). A microduplicação 22q11.2 foi relatada pela primeira vez em 1999 desde então, menos de 100 indivíduos com este achado genético já foram relatados na literatura médica. No entanto, ele provavelmente não é tão raro quanto parece, porque a tecnologia sensível o suficiente para detectar as microduplicações só tornou-se amplamente disponível nos últimos anos (SHAFFER AND LUPSKI, 2000).

A frequência das microduplicações 22q11.2 é aproximadamente a metade da frequência das deleções, o que pode ser explicado pela baixa investigação de indivíduos afetados ou devido aos métodos utilizados para a identificação (ROSA *et al.*, 2009; PORTNOI, 2009). Em um estudo com 7.000 indivíduos com deficiência intelectual e déficit do desenvolvimento foi identificado em 10 indivíduos uma duplicação de 3Mb em 22q11.2 o que correspondeu a prevalência de cerca de 1:700 na população de referência (OU *et al.*, 2008). Outro estudo estimou a incidência de 1:320 em uma população de mais de 15.000 indivíduos com atraso no desenvolvimento (VAN CAMPENHOUT *et al.*, 2012).

A duplicação 22q11.2 pode ser herdada de forma autossômica dominante, ou seja, têm uma chance de 50% de herdar a duplicação ou ocorrer como uma condição *de novo*. A maioria dos indivíduos diagnosticados com a duplicação 22q11.2 herdou a duplicação de um dos pais, estes podem apresentar um fenótipo normal ou bastante leve, embora a alteração genômica pareça ser a mesma na criança, é observado a manifestação das características fenotípicas da síndrome (FIRTH, 2013).

As manifestações clínicas observadas em pacientes com duplicações 22q11.2 variam de fenótipos mais leves á manifestações graves como atraso no desenvolvimento, atraso de linguagem, anomalias congênitas múltiplas e atraso de crescimento (PORTNOI, 2009). Além disso, compartilham algumas características fenotípicas observadas na SD22q11.2 como defeitos cardíacos, insuficiência velofaríngea com ou sem fenda palatina, fala hipernasal e anormalidades urogenital (MOLCK *et al.*, 2014; WENTZEL *et al.*, 2008).

O número limitado de pacientes com duplicações atípica ou distal e a presença dessas duplicações nos pais fenotipicamente normais, restringem a capacidade de fazer afirmações sobre as potenciais consequências fenotípicas destes pequenos rearranjos, o que pode causar

certa dificuldade no aconselhamento genético, levando a uma maior cautela na interpretação do significado clínico de alguns rearranjos genômicos (OU *et al.*, 2008).

A caracterização molecular das microduplicações em 22q11 mostrou que os indivíduos apresentam uma duplicação de aproximadamente 3Mb, se estendendo da LCR22 A- D, onde abrange cerca de 40 genes, e é recíproca a região tipicamente deletada em indivíduos com a SD22q11, enquanto que poucos indivíduos apresentam uma duplicação de 1,5 Mb, estendendo da LCR22A- B. Microduplicações envolvendo as LCR22D e LCR22H (distal a região envolvida na microduplicação 22q11.2 clássica) tem sido descrita (DUPONT *et al.*, 2015). Duplicações atípicas e maiores de 4Mb e 6Mb também já foram relatadas e envolvem LCRA-LCRE e LCRA-LCRG, respectivamente (PORTNOI, 2009; SANDRI, 2009) (Figura 1).

2.3. Genes envolvidos na região 22q11.2

Na região 22q11 tipicamente deletada em 3Mb, há cerca de 60 genes e 8% dos casos que resultam na deleção de 1,5 Mb envolvem aproximadamente 28 genes (PARKER *et al.*, 2015), nos quais podem ser os responsáveis pelas características clínicas encontradas na SD22q11.2. Dentre este grupo de genes, alguns estão melhor descritos na literatura que são: *TBX1* (*T-box fator de transcrição 1*), *COMT* (*Catecol O-Metiltransferase*), *CRKL* (*v-crk avian sarcoma vírus CT10 oncogene homolog-like*), *MAPK1* (*mitogen-activated protein kinase 1*), *UFD1L* (*ubiquitin fusion degradation 1- Like*), *HIRA/TUPLE 1* (*HIR histone cell cycle regulation defective*), *SNAP29* (*synaptosomal associated protein 29KDa*) e *PIK4CA* (*phosphatidylinositol 4- kinase alpha*).

O principal gene candidato para a modulação dos fenótipos de pacientes com duplicações e deleções é o *TBX1*, responsável pela formação da crista neural. Em alguns estudos com ratos, a haploinsuficiência do *TBX1* pode resultar nos fenótipos da SD22q11.2 como alterações faciais, hipoplasia do timo e paratireoide e alterações cardíacas (GENNERY, 2012). Ainda não são muito bem compreendidos os mecanismos regulatórios do *TBX1*, mas devido à heterogeneidade fenotípica inter e intrafamiliar, foi postulado que a expressão desse gene é fortemente regulada por outros mecanismos genéticos, epigenéticos e por fatores ambientais (OU *et al.*, 2008, WEISFELD-ADAMS *et al.*, 2012).

O *COMT* (*Catecol O-Metiltransferase*) é um dos genes suprimidos na SD22q11.2. Ele fornece as instruções necessárias para que se produza a enzima chamada catecol-O-metiltransferase que ajuda a manter os níveis adequados de neurotransmissores no cérebro

(Córtex pré-frontal). A perda de uma cópia do gene *COMT* conduz a regulação anormal dos níveis de catecol-O-metiltransferase no cérebro, e alguns pesquisadores acreditam que mudanças envolvendo essa enzima pode ajudar a explicar o aumento do risco de problemas comportamentais e doenças mentais associadas à síndrome de deleção 22q11.2. Portanto o gene *COMT* é um candidato para diversos fenótipos neurológicos da SD22q11 (site GRH, 2007).

O efeito da haploinsuficiência do *COMT* pode ser exacerbada por interações reguladoras diferenciais seja pela diminuição, pela deleção ou afetam o alelo 22q11.2 intacto na SD22q11. A organização da cromatina é um regulador chave da expressão gênica e ZEITZ et al., 2014 sugerem a hipótese de que poderia contribuir para a variabilidade fenotípica inexplicável associado com SD22q11. A desregulação de importantes genes de desenvolvimento podem resultar em diferentes fenótipos.

O gene *CRKL* também tem sido relacionado aos mecanismos moleculares subjacentes à síndrome de deleção 22q11. O gene *CRKL* já foi mapeado na metade distal da região típica suprimida, mas é altamente abundante na região da faringe, tecido neurais e derivados da crista neural (GURIS et al., 2001) sugerindo que a deleção deste gene pode ser responsável por alguns casos com deleções mais distais que não envolvem gene *TBX1* (GARCIA-MIÑAUR et al. 2002). A haploinsuficiência do *CRKL* pode contribuir para os defeitos cardíacos e fenótipos presentes na deleção típica de 3Mb assim como nas deleções atípicas (OGILVIE et al., 2009; BRECKPOT et al., 2012).

O *MAPK 1* é mapeado distalmente a partir da LCR22– D. Anomalia craniofacial e cardíaca são observados em pacientes com deleções distal 22q11 e são atribuídas a deficiência da sinalização do *MAPK1* na crista neural (NEWBERN et al., 2008). Entretanto, mais estudos são necessários para investigar se haploinsuficiência de *MAPK1* pode inferir um risco aumentado de hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca precoce em pacientes com deleções 22q11.2 que ultrapassam LCR 22-4 (BRECKPOT et al., 2012).

O gene *PIK4CA*, quando deletado em pacientes com 22q11.2 associado a SDG, pode ser associado com esquizofrenia, uma vez que mutações nesse gene pode interromper a via de mielina e perturbar a integridade da mesma, aumentando o risco de desenvolvimento da esquizofrenia (PARKER, et al., 2015). MCDONALD-MCGINN et al., 2013, relatou que deleções hemizigóticas de 22q11.2, combinadas com mutações prejudiciais no *SNAP29* contribui para os achados clínicos atípicos em pacientes com SD22q11.2. Mutações no gene

UFD1L tem sido associado com a deleção 22q11.2 e com defeitos cardíacos e craniofaciais (PHILLIP e BASSET, 2011).

A haploinsuficiência do produto do gene *HIRA/TUPLE 1* (*HIR histone cell cycle regulation defective*) localizado no final proximal da região tipicamente deletada da SD22q11, leva ao acúmulo de proteínas e afeta o desenvolvimento das células da crista neural craniana e do coração e apoptose de timócitos imaturos, portanto a sua deleção pode causar interrupção do arco aórtico, fissura de palato, displasia do timo e outras anomalias craniofaciais (LEE et al., 2009 ; TAO et al., SANDRI, 2011).

2.4 Identificação das microdeleções e microduplicações em 22q11.2

O cariótipo com bandeamento G é o exame citogenético inicial indicado para pacientes com suspeita de alterações cromossômicas. Apesar do aperfeiçoamento das metodologias de bandeamento, a resolução dos estudos cromossômicos, pela cariotipagem, é de baixa sensibilidade já que atinge uma resolução de aproximadamente 450-550 bandas por genoma. Em 1976, Yunis desenvolveu o bandeamento de alta resolução com 650 a 850 bandas onde aumentou o poder de resolução do cariótipo para cerca de 1000 bandas por genoma (TRASK, 2002), facilitando a detecção de alterações que ainda não haviam sido observadas, mesmo assim, muitas vezes não é possível detectar, a nível citogenético, inúmeras aberrações cromossômicas.

A identificação dos cromossomos se faz pela similaridade das bandas observadas visualmente em comparação com o padrão estabelecido pelo *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN), como também pela homologia entre as sequências de DNA (KAMIYA,2009). A análise citogenética com resolução de 450 bandas é o procedimento citogenético mais indicado em indivíduos com suspeita de alteração cromossômica numérica ou estrutural. Já anomalias cromossômicas que envolvem segmentos de 5Mb ou menores, podem não ser detectados nesse tipo de resolução (RODRIGUES, 2010; SANDRI,2011). Com isso o cariótipo convencional vem sendo cada vez mais complementado por outras metodologias moleculares de maior resolução (PEREIRA, 2014).

Na década de 1980 surgiu uma técnica locus-específica que permitiu a identificação de pequenos rearranjos genômicos tanto em cromossomos metafásicos quanto em interfásicos, denominada FISH (Hibridação Fluorescente em *in situ*) (LICHTER *et al.*, 1988). Esta técnica é considerado padrão ouro para a detecção de microdeleções cromossômicas onde são utilizadas sondas específicas para identificar a região de interesse. Nas análises de FISH,

sondas de DNA de sequências homologas às sequências-alvo são marcadas com fluorocromos e hibridadas em cromossomos metafísicos ou em células interfásicas do paciente para determinar presença, localização e número das sequências genômicas analisadas. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para identificar anomalias cromossômicas submicroscópicas, como nas síndromes de microdeleção (LINHARES, *et al.*, 2011).

A resolução do FISH depende do tamanho da sonda (> 50 kb - 2 Mb), mas é cerca de 20 a 40 vezes superior à do cariótipo convencional (WIEGANT *et al.*, 1992, PEREIRA, 2014). Entretanto alguns autores tem considerado a técnica de FISH dispendiosa além de requerer equipamentos e treinamento substancial. Outra desvantagem é a demora nos resultados e a impossibilidade de detectar algumas deleções atípicas (MCDONALD-MCGINN *et al.*, 2011).

Em 2004 começaram a surgir técnicas de análise cromossômica por microarranjo-CMA que possibilitaram um rastreamento de todo o genoma para CNVs, aumentando o número de diagnósticos de anormalidades genéticas (CHRISTIAN, 2011). As técnicas de CMA permitem verificar se há perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos no genoma de um indivíduo, detectando alterações cromossômicas 10 a 100 vezes menores do que é visível pelo microscópio óptico, dependendo da plataforma utilizada. Sendo assim, o CMA é uma ferramenta poderosa para detectar desequilíbrios cromossômicos pequenos, logo a investigação e detecção de anormalidades submicroscópicas são aprimoradas, ampliando, portanto a identificação de microdeleções e microduplicações que não eram identificadas por outras metodologias convencionais (ROSA, 2015).

Usando-se o Chas[®], foi possível investigar alterações estruturais ao longo do genoma. Este programa permitiu identificar variações no número de cópias, perdas de heterozigose, duplicações e deleções de segmentos de DNA de regiões gênicas presentes nas amostras estudadas de modo comparativo, facilitando as interpretações dos resultados (PINTO, 2015).

O CMA permite delinear com precisão os segmentos envolvidos nas duplicações e deleções, no qual é importante para a avaliação genótipo-fenótipo e identificação de genes candidatos envolvidos em deficiência cognitiva e dismorfismos (SMITH, 2004; SCHOUMANS, 2005). Além disso, essa técnica tem revolucionado os testes citogenéticos realizados em pacientes com deficiência cognitiva, dismorfismos e anomalias congênitas múltiplas. Dentre as vantagens em relação às técnicas convencionais destaca-se a rápida análise genômica em alta resolução, identificando as CNVs em todos os cromossomos, incluindo regiões subteloméricas e contribuindo para o mapeamento genômico dessas

alterações (SAGOO, 2009). As análises que envolvem microarranjo podem possibilitar a detecção de síndromes já conhecidas como síndrome de Williams e Velocardiofacial, assim como de outras desordens não descritas previamente (MICHELSON, 2011).

3- OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Relatar cinco casos com variabilidade fenotípica que apresentam microduplicações e microdeleções recíprocas em 22q11.2 detectadas pela técnica de Análise Cromossômica por Microarranjo (CMA).

3.2. Objetivos específicos

1. Realizar a técnica do CMA para elucidação diagnóstica dos casos;
2. Estabelecer a origem das CNVs e classificar os achados genômicos em conformidade com o consenso internacional;
3. Estabelecer a localização das LCRs de acordo com os pontos de quebra das CNVs;
4. Identificar os genes que poderiam atuar como candidatos para explicar a variabilidade fenotípica entre os pacientes;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Replicon, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (NPR/PUC Goiás) e no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular/Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (LaGene/LACEN/SES-GO) e em sintonia com MGene / PROPE / PUC Goiás.

4.1. Seleção dos Participantes

Foram analisados cinco pacientes com indicação clínica de Atraso Global no Desenvolvimento (AGD). Os médicos assistentes do sistema público de saúde do Estado de Goiás encaminharam os pacientes ao serviço de genética do REPLICON-PUC-Goiás / LaGene-LACEN-SES. Os pais ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CAPE PUC / GO), sob o protocolo número 1721/2011.

4.2. Coleta e Processamento das Amostras

Após a assinatura do TCLE, foram obtidas as amostras biológicas dos pacientes e dos seus pais, correspondendo a 3mL de sangue periférico heparinizado para realização do cariótipo e 7mL sangue periférico com EDTA para extração de DNA. O sangue foi acondicionado em tubos eppendorf e foram devidamente identificados. Posteriormente, as amostras de sangue periférico com EDTA foram armazenadas a -20°C para posterior extração do DNA.

4.3. Cariótipo com Bandas G

As amostras de sangue periférico heparinizado foram submetidas à cultura de linfócitos T em curto prazo, conforme protocolo convencional para à obtenção de metáfases. Após a cultura, a suspensão de células foi gotejada sobre vapor de banho-maria a 60°C, em lâminas limpas e desgorduradas. Para a análise do cariótipo por bandas G (método GTG), as lâminas foram envelhecidas à temperatura ambiente por sete dias e posteriormente tratadas em solução de tripsina (Gibco/Invitrogen Corporation, Nova Zelândia) diluída em PBS (Laborclin, Brasil) a 0,25% e coradas em solução de giemsa a 4% (Gibco/Invitrogen Corporation, Nova Zelândia). Para a análise cromossômica, as metáfases foram capturadas

sob microscopia de luz branca com o auxílio de uma estação de cariotipagem contendo um microscópio Axioplan 2 Imaging[®] (Carl Zeiss, Alemanha) com platina motorizada controlada pelo Metafer[®] 3.4.0 (Metasystems Corporation, Alemanha) e analisadas com auxílio do software IKAROS[®] (Metasystems Corporation, Alemanha).

4.4. Extração e Quantificação das Amostras

Para a extração de DNA, foi utilizado o kit de extração de DNA Illustra Blood GenomicPrep[®] Mini Kit (GE Healthcare, Reino Unido). A quantificação da concentração de DNA foi realizada com auxílio de espectrofotômetro NanoVue[®] Plus (GE Healthcare, Reino Unido). Ambos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos sugeridos pelos fabricantes.

4.5. Análise Cromossômica por Microarranjos

O CMA foi conduzido em um GeneChip CytoScan HD[®] (Affymetrix, Santa Clara, EUA). Esta matriz de genotipagem oferece a mais ampla cobertura e maior desempenho para a detecção de aberrações cromossômicas humanas. A matriz CytoScan HD tem sido reconhecida por sua cobertura e capacidade de comunicação com os bancos OMIM[®] e genes RefSeq. O CytoScan HD[®] possui $\geq 99\%$ de sensibilidade. A matriz inclui aproximadamente 750 mil SNPs com mais de 99% de detecção, determinação de perda de heterozigose (LOH), e baixos níveis de mosaicismos. A metodologia consiste ainda em um ensaio composto por múltiplas sondas de hibridização alelo-específicas que são complementares às regiões de SNP presentes na fração reduzida do genoma amplificado no ensaio que estão espalhadas ao longo do GeneChip[®] HD Array. Ao final da digitalização, os sinais luminosos foram lidos pelo software Chromosome Analysis Suite 3.0 (ChAS[®]), fornecido pela Affymetrix[®] (Santa Clara, EUA).

4.5.1. Descrição do método de CMA

A CMA consiste em um ensaio composto por múltiplas sondas de hibridização alelo-específicas que são complementares às regiões de SNP presentes na fração reduzida do genoma, que é amplificada no ensaio. As sondas são constituídas de 25 oligonucleotídeos, com o SNP variável localizado no 13^o nucleotídeo. Elas são redundantes e espalhadas ao longo do chip, para atenuar quaisquer efeitos da variação devido à localização física na matriz. Cada sonda tem uma localização fixa no arranjo do chip. O microarranjo foi

desenhado especificamente para diagnóstico citogenético, incluindo aproximadamente 2,7 milhões de marcadores de CNVs clinicamente relevantes baseados em 743.304 de marcadores de SNP e >1,9 milhões de marcadores não polimórficos, cobrindo todo o genoma humano de interesse médico.

A metodologia se iniciou com uma digestão do DNA amostral com uma enzima de restrição (*NspI*) fornecida pelo fabricante. Este passo requer aproximadamente 250 ng de DNA. Em seguida, o DNA digerido foi ligado a adaptadores específicos e, posteriormente, amplificados por PCR, mediante o uso de primers universais. O DNA fragmentado por digestão enzimática e amplificado foi marcado com biotina e hibridado no GeneChip[®] HD por 18 horas. Após a hibridização, os chips foram digitalizados no GeneChip[®] Scanner 3.000 7G (Affymetrix, Santa Clara, EUA). Ao final da digitalização, os sinais luminosos foram lidos e capturados pelo software Chromosome Analysis Suite[®] 2.0 (Chas[®], Affymetrix – Estados Unidos da América), que também serviu de interface para a análise dos dados. Os arquivos CEL obtidos pelo escaneamento dos chips foram lidos pelo software de análise para estabelecer os genótipos. As duas principais métricas de controle de qualidade do GeneChip[™] HD array foram *Median Absolute Pairwise Difference* (MAPD) e SNP-QC, escores aplicados para marcadores de número de cópias e SNP, respectivamente. Para o cenário do presente estudo foram usados os parâmetros de MAPD ≤ 0.25 e de SNP-QC ≥ 15 .

4.5.2. Tratamento e análise dos dados obtidos na genotipagem dos SNPs

A grande quantidade de informações disponibilizadas pelo uso do GeneChip[®] HD faz necessária análises complexas para o tratamento dos dados e obtenção de um resultado fidedigno. Para executar essa etapa do projeto as análises genéticas e citogenéticas dos resultados fornecidos foram executadas no Software Chas[®].

4.6. Busca de alterações e estabelecimento do padrão de herança

Na tentativa de explicar o fenótipo dos pacientes, o CMA foi realizado nos casos e seus respectivos progenitores, quando disponíveis, com o objetivo de se identificar a origem das alterações, se herdadas ou *de novo*. Para a chamada das CNVs foi empregada uma estratégia que permitiu a identificação de CNV com filtro de tamanho ≥ 100 kb contendo 50 marcadores para ganho e 25 marcadores para perda.

4.7 Análise das LCRs na região 22q11.2

Para a identificação das LCRs foi utilizado a ferramenta *Segmental Duplication* disponível em <http://genome.ucsc.edu> browser (Human Genome Build 36.1). Foram consideradas as regiões de LCRs (*segmental duplication >1 kb of non-repeat masked sequence*) que circundavam em três vezes o tamanho da CNV no locus 22q11.2 (chr22: 18,640,000-25,080,000) e que apresentavam uma similaridade $\geq 90\%$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, descrevemos os achados citogenômicos em cinco probandos com diagnóstico clínico de Atraso Global no Desenvolvimento que apresentaram microdeleção ou microduplicação na região 22q11.2 e foram identificadas as LCRs que circundam esta região. As amostras foram inicialmente testadas usando o cariótipo por bandeamento G, com uma resolução de aproximadamente 450-550 bandas por genoma. Após a realização desta metodologia não foram identificadas alterações numéricas e/ou estruturais, resultando em um cariótipo 46, XX ou 46, XY.

Após a análise cariotípica foi realizado o método CMA que demonstrou microdeleção e microduplicação na região 22q11.2 que estão relacionadas com a Síndrome da deleção 22q11.2 e com Síndrome da Microduplicação do Cromossomo 22q11.2, respectivamente. Todos os indivíduos do nosso estudo apresentaram deleção e duplicação nos pontos de quebra que flanqueiam ou estão dentro das LCR22s previamente caracterizadas. Para os pontos de quebra das duplicações foi identificado somente a LCR-H na região 22q11.2 em contraste com os pontos de quebra das deleções que apresentaram várias LCR22s flanqueando a região 22q11.2. Os resultados da CMA, das LCRs e dos genes candidatos encontram-se descritos na Tabela 1. Os cinco casos foram apresentados na forma de relato de caso com objetivo de demonstrar a variabilidade fenotípica presente entre os casos.

Tabela 01: Características Clínicas e moleculares dos cinco probandos rastreados pela tecnologia de alta resolução CMA

Caso	Características Clínicas *	Idade	Sexo	CNV	Citobanda	Tamanho (Mb)	Nomeclatura do Microarranjo	Genes	Origem**	Interpretação***	Identidade de das LCRs	Início e Fim das LCRs
001	AGD	12	F	Perda	22q11.21	0,75	22q11.21(20,716,902-21,465,662)x1	ZNF74, SCARF2, MED15, SNAP29, CRKL, LZTR1, SLC7A4	Origem pat	LP	99% 99%	B-D B-D
002	AGD	15	M	Perda	22q11.21	2,88	22q11.21(18,916,842-21,800,797)x1	PRODH, DGCR5, DGCR9, DGCR10, DGCR2, DGCR11, DGCR14, GSC2, SLC25A1, CLTCL1, HIRA, MRPL40, UFD1L, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TRX1, GNB1L, COMT, ARVCF, DGCR8, DGCR6L, ZNF74, SCARF2, MED15, SNAP29, CRKL, LZTR1, SLC7A4, HIC2	de novo	Patogênico	99% 99%	A-D A-D
003	AGD	6	M	Ganho	4q12	1,01	4q12q13.1(58,561,825-59,573,186)x3	-	Origem mat	UCS		
				Perda	22q11.21	0,27	22q11.23q12.1(25,656,237-25,930,479)x1	IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1	de novo	LP	96%	Depois da H
004	AGD	14	M	Ganho	22q11.21	0,34	22q11.23q12.1(25,656,237-25,994,326)x3	MIR650	Origem mat	LP	96%	Depois da H
005	AGD	4	F	Ganho	22q11.21	0,69	22q11.22q11.23(22,962,196-23,652,512)x3	POM121L1P, GGTL2, IGLL5, RTDR1, GNAZ, RA B36, BCR, FRXW4P1	Origem mat	LP	96%	Depois da H

* AGD: Atraso Global do Desenvolvimento; ** Mat : Maternal; Pat: Paternal; ***LP: Provavelmente Patogênico; UCS: Significado Clínico Desconhecido

Paciente 01: Criança do sexo feminino, que no momento da assinatura do TCLE apresentava-se com 12 anos de idade, filho de casal não consanguíneo. A idade materna da concepção foi de 42 anos e a idade paterna foi de 45 anos de idade. A criança nasceu com aproximadamente 36 semanas de gestação e com 3020g, por parto cesariano. Aos três meses de idade tinha epilepsia e refluxo. O exame físico do probando revelou braquidactilia no polegar, dedos longos, retrognatismo, *philtrum* curto e orelhas grandes. A história familiar revelou uma irmã com má formação cardíaca (Figura 4).

Paciente 02: Criança do sexo masculino, que no momento da assinatura do TCLE apresentava-se com 15 anos de idade, filho de pais não consanguíneos. A idade materna da concepção foi de 38 anos e a idade paterna foi de 38 anos. A criança nasceu com aproximadamente 38 semanas de gestação, com 3200g e 45cm, por parto cesariano. Após o nascimento a criança apresentava cianose, não chorou e não teve o ato de sucção. Aos 14 anos de idade apresentou atraso no desenvolvimento, convulsões, chorava muito e falava coisas sem sentido. O exame físico do probando revelou hipertelorismo, orelhas protuberantes com lóbulos ligados, nariz largo com ponte nasal estreita, *philtrum* curto, pescoço curto, braquidactilia no polegar, clinodactilia do quinto dedo, prognatismo e microdontia permanente (Figura 2).

Paciente 03: Criança do sexo masculino, que no momento da assinatura do TCLE apresentava-se com 7 anos de idade, filho de pais não consanguíneos. A idade materna da concepção foi de 30 anos e a idade paterna foi de 29 anos. A criança nasceu com 39 semanas de gestação, 3840g e com 51 cm, por parto cesariano. Criança foi sentar aos oito meses de idade com ajuda de fisioterapia, não engatinhava e tinha hipotonia. Foi andar com um ano de idade e só falou com dois anos com a ajuda de uma fonoaudióloga. O exame físico do probando revelou retrognatismo, baixa implantação das orelhas, marcas auriculares, orelha protuberante com os lóbulos ligados, baixa ponte nasal, ampla base do nariz, e dobras epicânticas. Ele também apresentou a órbita do olho direito para baixo e ptose. A história familiar revelou que um tio materno era esquizofrênico e tio paterno tinha deficiência intelectual (Figura 6).

Paciente 04: Criança do sexo masculino, 14 anos de idade, filho de pais não consanguíneos. A idade materna da concepção foi de 35 anos e paterna de 39 anos. A criança nasceu com aproximadamente 32 semanas de gestação, com 1600g e com 42 cm de comprimento, por parto cesariano. Criança nasceu com atresia de esôfago, não teve o ato de sucção e tem atraso no crescimento. Sua idade óssea é de dois anos a menos que a idade

biológica. O exame físico do probando apresentou hipertelorismo, micrognatia, braquidactilia no polegar e face assimétrica. A história familiar revelou que um primo paterno nasceu com lábio leporino (Figura 8).

Paciente 05: Criança do sexo feminino, 4 anos de idade, filha de pais não consanguíneos. A idade materna da concepção foi de 30 anos e paterna de 34 anos de idade. A criança nasceu com aproximadamente 30 semanas de gestação, por parto cesariano, com 3140g e 49 cm de comprimento e apresentou icterícia. Ela sentou aos 8 meses e só foi falar aos 3 anos de idade. Ela apresenta dificuldade para andar e possui baixa imunidade. O exame físico do probando revelou hipertelorismo, dobras epicânticas, ponte nasal baixa, micrognatia e lábio superior fino. A história familiar revelou que uma sobrinha do pai tem deficiência intelectual e dificuldade para andar (Figura 10).

Após a realização da CMA, foram identificadas três microdeleções na região 22q11.2 nos pacientes 01,02,03. No paciente 02 (Figura 3), o CMA mostrou uma microdeleção *de novo* de 2,88Mb na região 22q11.2, flanqueadas pelas LCR-A e LCR- D, onde envolvem mais de 70 genes, incluindo o *TBX1* que está suprimido. Na maioria dos relatos sobre a Síndrome de Di George, os indivíduos apresentam a deleção de 3Mb cuja a região proximal contém o pressuposto gene associado a Síndrome denominado de fator de transcrição 1 T-box (*TBX1*) (RAUCH et al, 1999, FAGERBERG et al., 2013). O gene *TBX1* desempenha um papel vital durante o desenvolvimento e a deleção deste gene leva a uma diversidade nas estruturas crânio faciais e cardíacas (PARKER et al.,2015).

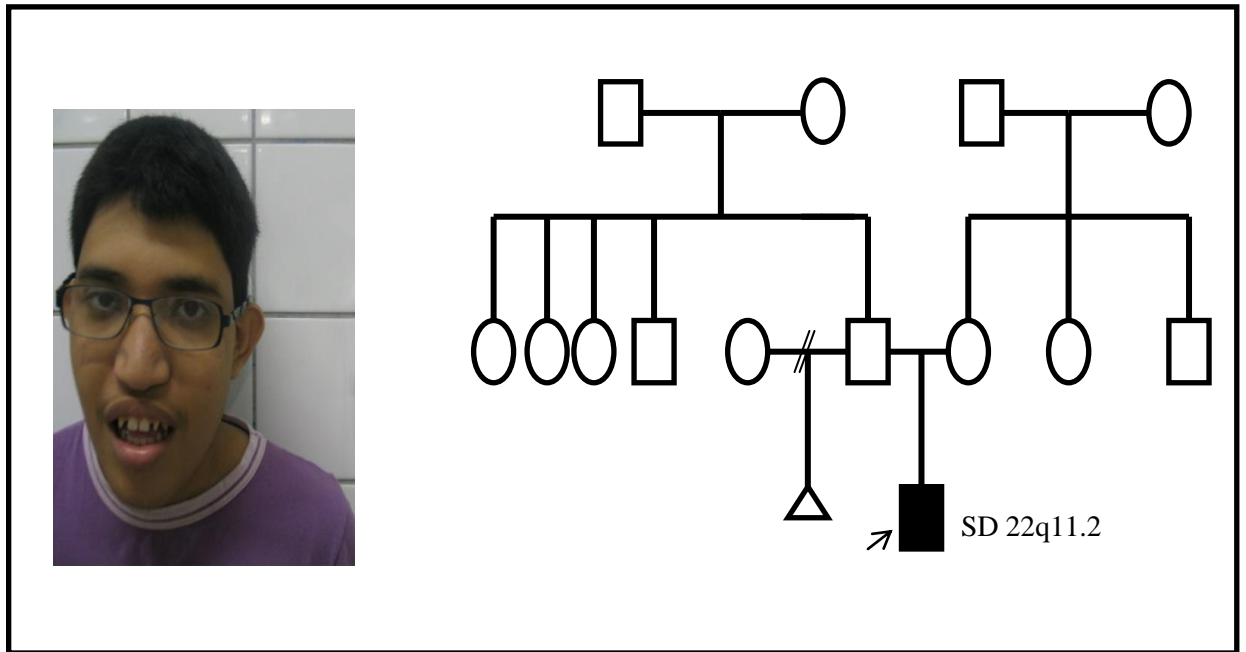


Figura 2. Paciente 02, encaminhado ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu heredograma familiar.

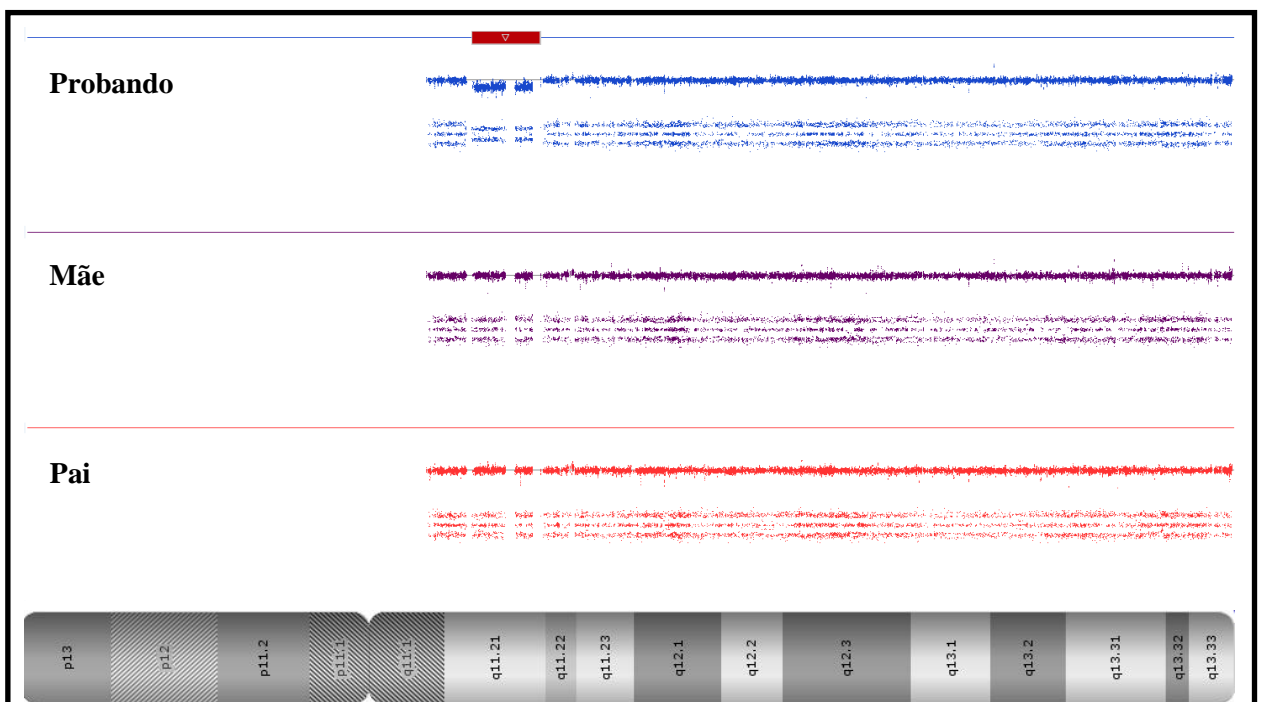


Figura 3. Resultado da CMA do paciente 02, mostrando a deleção *de novo* de 3Mb na região 22q11.2.

Em um estudo desenvolvido por RUMP et al (2014) foi ressaltado que a perda do gene *CRKL*, que também foi observada em nosso estudo, combinada com a deleção dos genes *TBX1* ou *MAPK1* em indivíduos com deleções A- D ou deleções maiores resultam em maiores taxas de defeitos cardíacos do que naqueles indivíduos com deleções centrais que

envolvem somente o gene *CRKL*. Outro gene presente nessa região é o Catecol – O – metiltransferase (*COMT*), que cataliza uma das principais vias de degradação dos transmissores de catecolamina e a presença de apenas uma cópia deste gene leva a regulação anormal dos níveis de catecol-o-metiltransferase no cérebro. Pesquisadores acreditam que as mudanças que envolvem esta enzima no córtex pré-frontal pode ajudar a explicar o aumento do risco de problemas de comportamento e doenças mentais associados com a síndrome da deleção 22q11.2 (YU *et al.* 2012; ZEITZ *et al.*,2014).

O resultado da CMA para o paciente 01 (Figura 5) revelou uma microdeleção de 0,75Mb de origem paterna na região 22q11.2, localizada entre as LCR-B e LCR-D, classificada por RUMP *et al.*, 2014 no grupo das LCR Central. Microdeleções atípicas ou distais entre as LCR-B e LCR-D já foram identificadas em um número limitado de estudos (FERNANDES *et al.*, 2009; SANNA-CHERCHI *et al.*, 2012). A haploinsuficiência em sete genes (*ZNF74*, *SCARF2*, *MED15*, *SNAP29*, *CRKL*, *LZTR1* e *SLC7A4*) foi observada para esta microdeleção de 0,75Mb, e estão associados com a SDG (KURAHASHI *et al.*, 1995; RAVASSARDA *et al.*, 1999; RACEDO *et al.*, 2015). O paciente 03 (Figura 7) demonstrou uma microdeleção *de novo* de 0,27Mb na região 22q11.2 e foi identificado apenas LCR dentro desta CNV, diferentemente das observados nos pacientes 01 e 02 cujas LCRs flanqueavam as CNVs. Há três genes suprimidos na microdeleção de 0,27Mb: *IGLL3P*, *LRP5L* e *CRYBB2P*.

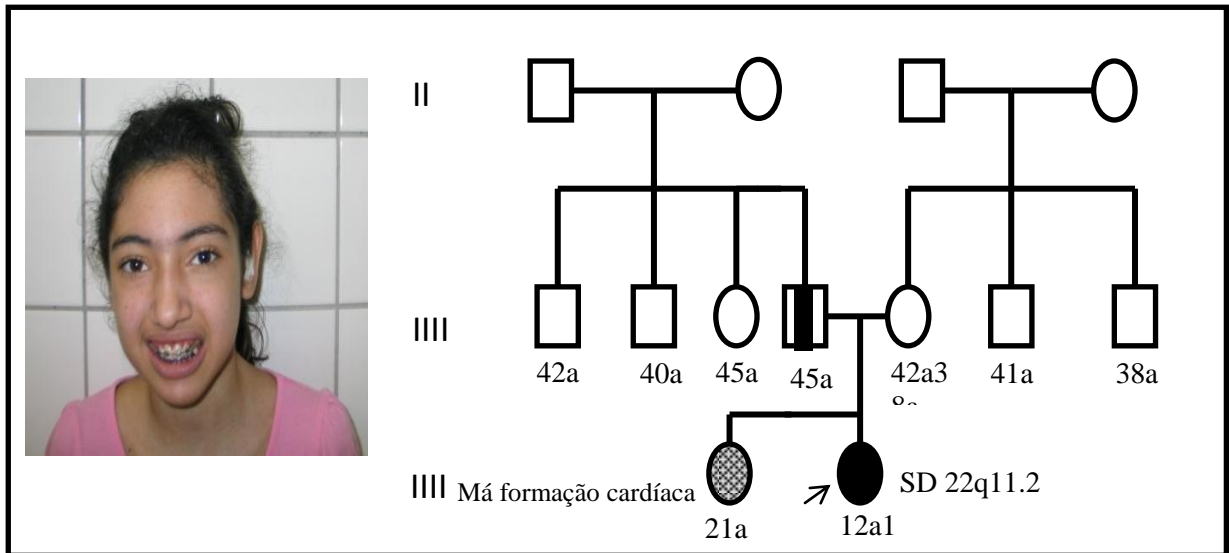


Figura 4. Paciente 01, encaminhada ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu heredograma familiar.

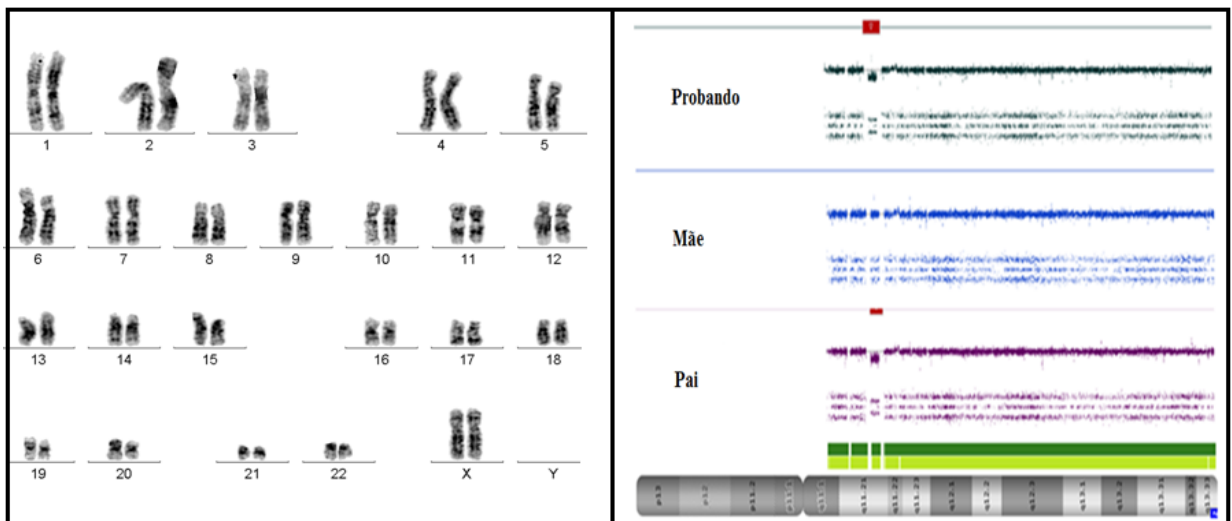


Figura 5. Resultado do Cariótipo e CMA do paciente 01. Notação cariotípica, 46,XX, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas. No CMA é possível observar a deleção de 0,75Mb de origem paterna na região 22q11.2.

O gene *CRKL* também tem sido implicado no mecanismo molecular subjacente da síndrome da deleção 22q11. Curiosamente, o gene *CRKL* já foi mapeado na metade distal da região tipicamente deletada, sugerindo que pode ser o responsável para os casos com deleções mais distais onde não envolvem o gene *TBX1* (GURIS *et al.*, 2001; GARCIA-MIÑAUR *et al.*, 2002). O *TBX1* é um importante gene relatado na Síndrome da Deleção 22q11.2 e a haploinsuficiência desse gene está presente na maioria dos fenótipos característicos. No entanto, este gene não é sempre incluído em todas as deleções que envolvem 22q11.2, como nos pacientes 01 e 03, portanto muitos autores sugerem que existem elementos reguladores ou

genes modificadores mapeados distantes desta região que podem estar afetando a expressão do gene *TBX1* (GARCIA-MIÑAUR *et al.*, 2002).

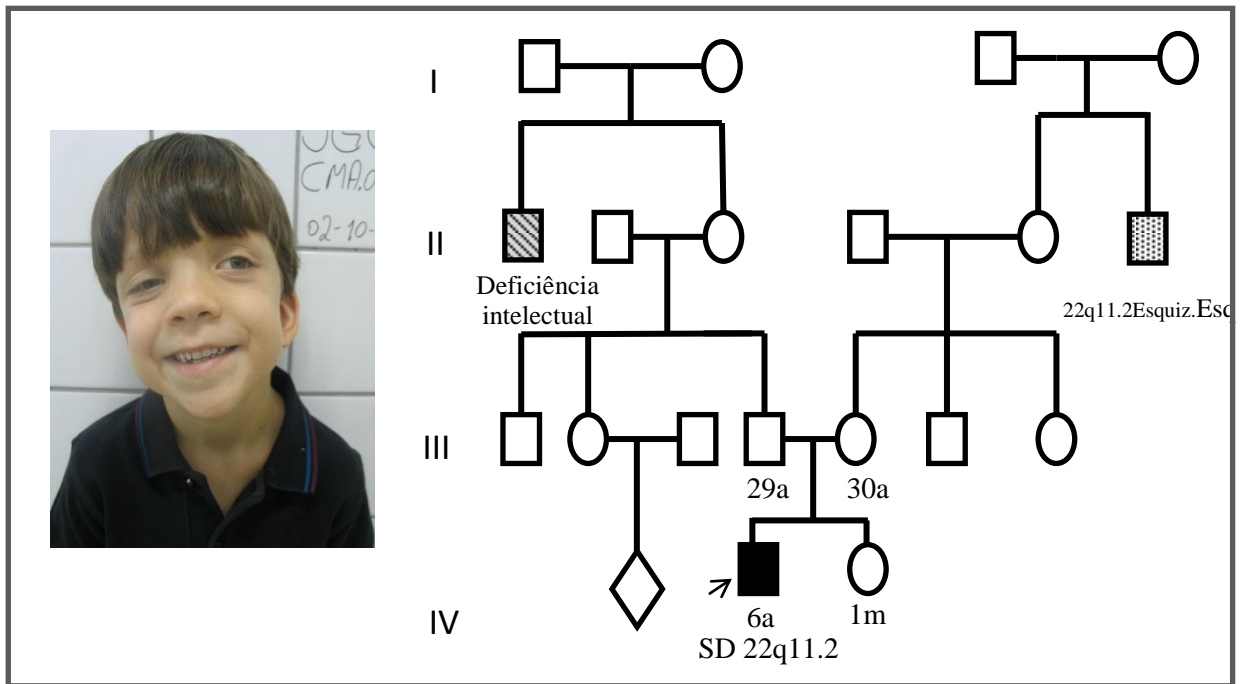


Figura 6. Paciente 03, encaminhado ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu heredograma familiar.

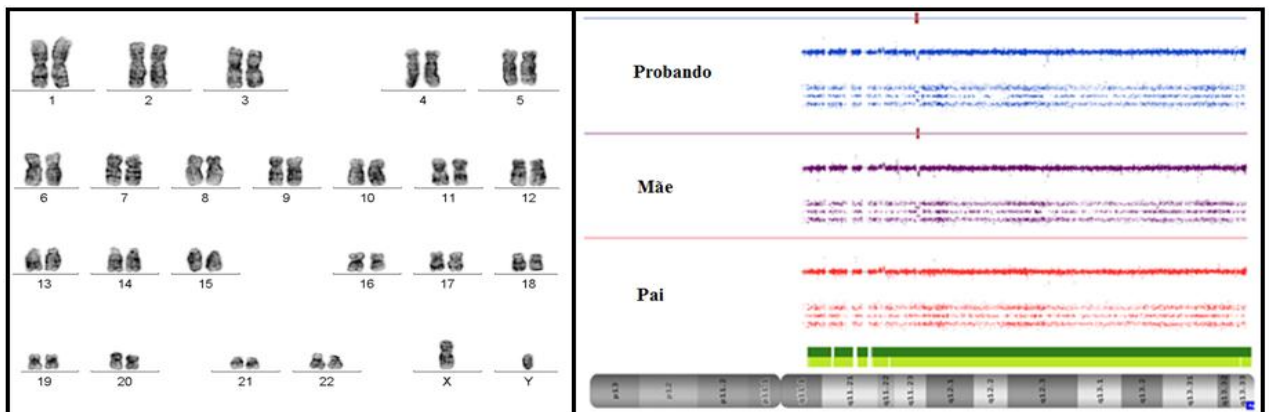


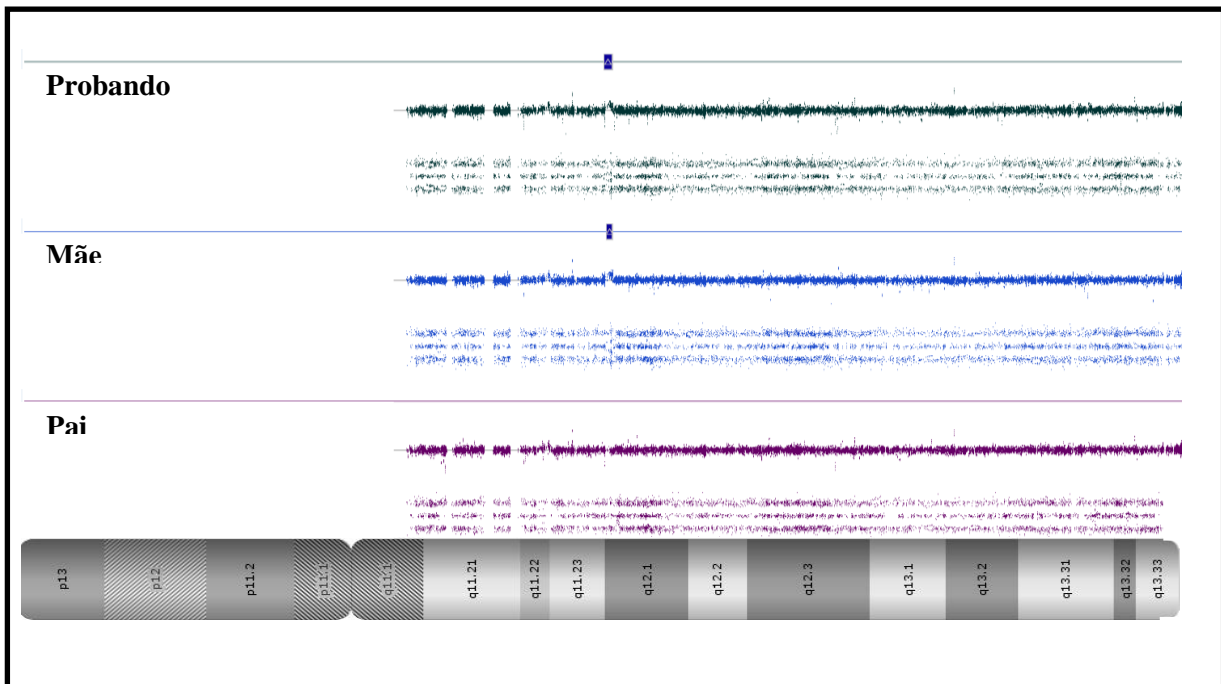
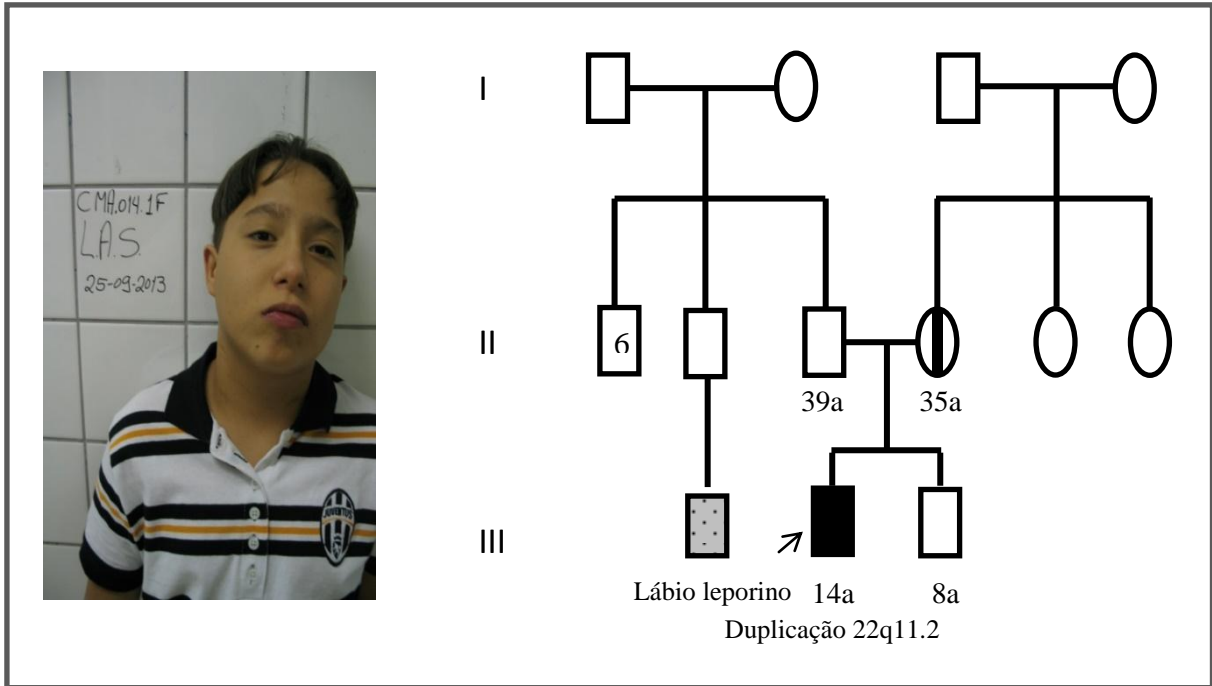
Figura 7. Resultado do Cariótipo e CMA do paciente 03. Notação cariotípica 46,XY, cariótipo sem alterações numéricas ou estruturais em 20 metáfase analisadas. Na CMA é possível observar a deleção *de novo* de 0,27Mb na região 22q11.2.

De acordo com CARELLE-CALMELS *et al.*, 2009 as deleções que envolvem a região 22q11.2 são usualmente esporádicas e foram relatadas serem herdadas em 6 a 28% dos pacientes com esta síndrome. Diferente do que foi observado no paciente 01, que apresentou uma CNV herdada paternalmente, as microdeleções herdadas são geralmente de origem

materna, e este achado ocorre devido a um aumento de 1,6 a 1,7 vezes na taxa de recombinação em 22q11.2 em mulheres do que em homens (DELIO *et al.*, 2013). Além disso quando as microdeleções são herdadas a variabilidade fenotípica é observada (PORTNOI, 2009).

Após a realização do exame físico dos pacientes foi observado que o paciente 01 apresentou orelhas grandes e o paciente 03 apresentou baixa implantação das orelhas, marcas auriculares e orelha protuberante com os lóbulos ligados. Alterações auriculares são observadas na maioria das microdeleções distais, mas não são uma alteração fenotípica específica para a SD22q11.2 (RAUCH *et al.*, 1999, RODNINGEN *et al.*, 2008). A característica de atraso global no desenvolvimento ou disfunção cognitiva é reportada em 80 % dos pacientes com esta Síndrome, corroborando com o que foi observado em todos os pacientes deste estudo. Normalmente, este atraso no desenvolvimento tende a ser relativamente leve, ou seja, os indivíduos não são severamente afetados e a apresentação facial típica da síndrome é ausente.

Adicionalmente aos achados de microdeleções em 22q11.2, nós observamos dois pacientes (04 e 05), que possuem microduplicação na região 22q11.2. Os pacientes 04 e 05 mostraram duplicações herdadas maternalmente de 0,34Mb e 0,69Mb, respectivamente, demonstrado na figura 10 e 11. Ambas as duplicações são localizadas dentro do bloco das LCR22-F.



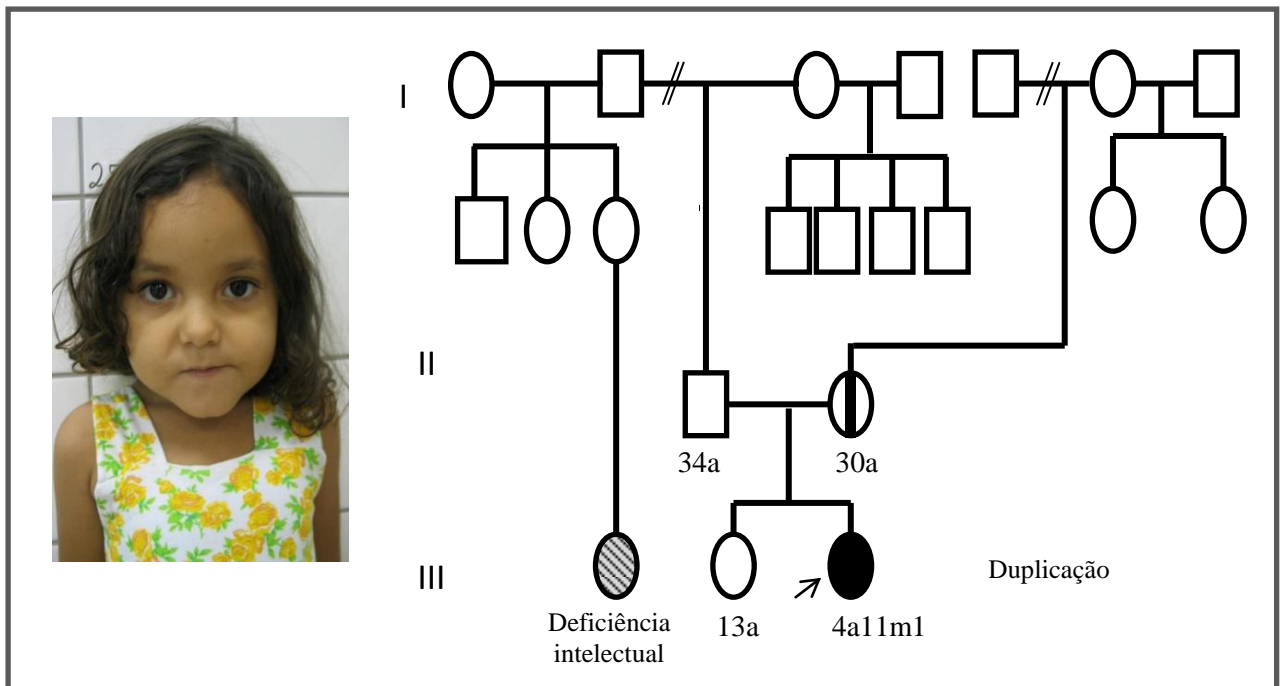


Figura 10. Paciente 05, encaminhada ao NPR/LaGene com indicação clínica de AGD e seu heredograma familiar.

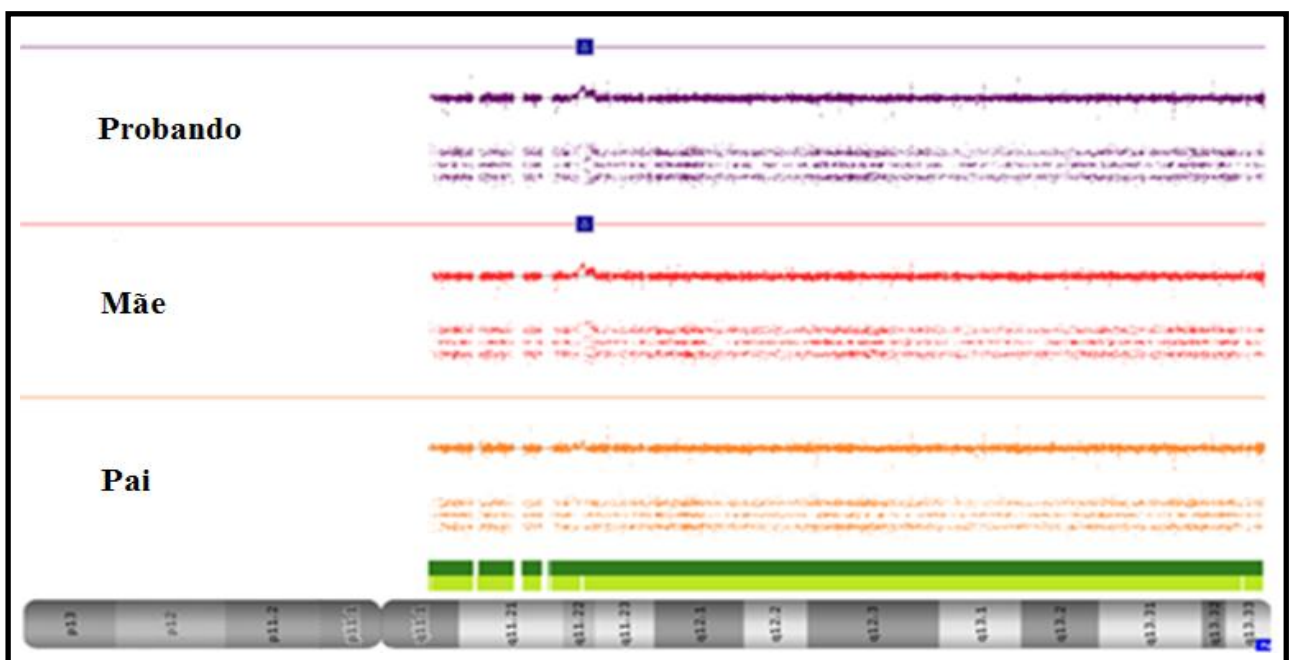


Figura 11. Resultado da CMA do paciente 05, onde foi possível observar a duplicação de 0,69Mb de origem materna na região 22q11.2.

O gene *MIR650* foi identificado na duplicação de 0,34Mb e o papel principal dos miRNAs na patogênese dos fenótipos das duplicações deve ser melhor investigado. Em um

estudo realizado por MERICO *et al.*, 2014, os autores observaram que miRNAs deletados na região 22q11.2 estão envolvidos na regulação da expressão de genes em várias vias do desenvolvimento, portanto estes genes podem ser afetados por níveis reduzidos de miRNAs. Já foi observado também que a desregulação do processamento dos miRNAs pode ser devida a haploinsuficiência do gene *DCGR8* que está comumente deletado em deleções de 3MB (BRZUSTOWICZ E BASSETT, 2012; BURNSIDE, 2015).

Em geral, aproximadamente 93% das pequenas duplicações, conferem fenótipos leves e tem a maior probabilidade de serem herdadas do que as deleções recíprocas (ADAMS *et al.*, 2012). Embora desequilíbrios genômicos herdados, de pais clinicamente normais, sejam geralmente classificados como CNVs benignas, pais de uma criança com uma alteração cromossômica herdada podem, por vezes, apresentar variações leves do fenótipo da criança, tais como têm sido relatado para a Síndrome da Deleção 22q11.2 (COPPINGER *et al.*, 2009).

A avaliação clínica cuidadosa de ambos os pais e filhos é crucial para compreender o papel causal das duplicações em 22q11.2. Considerando os fenótipos não afetados dos pais, a presença de modificadores genéticos já tem sido proposta para outras síndromes com expressividade variável. Nesse contexto, um modificador genético é caracterizado por uma combinação de CNVs em um mesmo loci ou em loci diferente, herdado dos pais, no qual uma variação única é insuficiente para causar a doença (LIAO *et al.*, 2004). Desequilíbrios genômicos herdados de pais fenotipicamente não afetados podem contribuir com o fenótipo da descendência através da penetrância ou expressividade variável, ou ambos, através de efeitos epigenéticos, fatores ambientais, epistasia modulada ou eventos celulares estocásticos durante o desenvolvimento fetal. Além disso, a presença de desequilíbrios genômicos podem revelar uma mutação recessiva no alelo não deletado (ENSENAUER *et al.*, 2008; OU *et al.*, 2008; PORTNOI, 2009).

É preciso entender mais sobre as razões do surgimento de características fenotípicas semelhantes e do fenótipo bastante variável nos indivíduos com deleções e duplicações na região 22q11.2. De acordo com LUPSKI E ZHANG, 2015 a presença de variabilidade fenotípica, para diversas condições genéticas, sugere uma possível existência de fatores genéticos modificantes combinados com CNVs genômicas maiores. Recentes progressos em estudos genéticos e genômicos têm demonstrado que a presença de um Polimorfismo de Nucleotídeos Único (SNP) e de CNVs em regiões não codificantes podem assumir o papel funcional desses modificadores genéticos.

Foram identificados dois grupos de LCR22 que estão flanqueando os rearranjos genômicos dos pacientes 01 e 02. Esses achados sugerem que a ocorrência destes rearranjos pode ter sido mediada por NAHR entre as LCRs, aumentando a susceptibilidade das gerações de CNVs nestes pacientes. Em contrapartida, os pacientes 03,04 e 05 apresentaram LCRs dentro dos pontos de quebra para microdeleção e microduplicação, portanto não é possível conjecturar o mecanismo de formação em relação à forma como estas microdeleção e microduplicação apareceram inicialmente nesses pacientes. A alta densidade de elementos intercalados lineares curtos (SINEs) e elementos intercalados lineares longos (LINEs) em torno do ponto de quebra proximal da CNV pode ter sido o evento responsável para a formação da CNV, entretanto, dados detalhados da sequência caracterizando o ponto de quebra são necessários para reconhecer estes elementos e, portanto propor um mecanismo para a formação dos rearranjos genômicos.

Portanto, foram observados em nosso estudo, intervalos variáveis contendo genes conhecidos e alguns genes com o seu papel funcional nas síndromes pouco ainda elucidadas, assim como, LCRs que estão na região da CNV ou flanqueando os rearranjos genômicos. O reconhecimento das LCRs fornece conhecimentos importantes relacionados ao papel da arquitetura genômica nos rearranjos cromossômicos, na evolução cromossômica, e em doenças humanas.

Este trabalho demonstra ainda o potencial para a determinação de pequenas deleções e duplicações através do uso da análise cromossômica por microarranjo. Estes métodos que envolvem plataformas de array permitem a localização dos pontos de quebra de forma rápida e mais sensível, assim como o reconhecimento do conteúdo gênico desta região, sem a necessidade de realizar múltiplos testes de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) para identificar as microdeleções e microduplicações em 22q11.2. Além disso, as aplicações das metodologias que envolvem análise por microarranjo permitem a identificação de deleções distais e também facilitam a identificação dos pontos de interrupção nas deleções e duplicações proximais da região 22q11.2. A identificação destas variantes são particularmente importantes, pois permite o conhecimento dos genes ou das regiões genômicas que são cruciais para o entendimento das manifestações fenotípicas específicas e suas variabilidades, além de serem úteis para a compreensão dos mecanismos subjacentes às deleções e duplicações genômicas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos nesta dissertação permitem concluir:

1. Microdeleções e microduplicações na região 22q11.2 podem ser detectadas pelo uso da CMA, possibilitando efetuar o diagnóstico da Síndrome da deleção 22q11.2 e da Síndrome da duplicação 22q11.2.
2. Foi possível estabelecer as origens parentais das CNVs e identificar as que ocorreram *de novo*, assim como classificar as mesmas em CNV patogênica, CNV de significado clínico incerto e CNV provavelmente patogênica, de acordo com o consenso internacional.
3. Foi possível determinar as LCRs que flanqueiam as CNVs encontradas.
4. Foram identificados os genes nas regiões de microduplicação e microdeleção que são possíveis candidatos para explicar a correlação genótipo-fenótipo dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ADAMS JDW, EDELMANN L, GADI IK AND MEHTA L. Phenotypic heterogeneity in a family with a small atypical microduplication of chromosome 22q11.2 involving TBX1. *European Journal of Medical Genetics*.2012;55:732-736.
- 2- ALBERTI A, ROMANO C, FALCO M, et.al. 1.5 Mb de novo 22q11.2 microduplication in a patient with cognitive deficits and dysmorphic facial features. *Clinical Genetics*.2007;71(02):1177–1182.
- 3- BAILEY JÁ, YAVOR AM, MASSA HF,et al., Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. *Genome Res*.2001; 11(6): 1005-1017.
- 4- BASSETT AS, HODGKINSON K, CHOW EW, et al. 22q11 deletion syndrome in adults with schizophrenia. *Am J Med Genet*.1998;81:328-37.
- 5- BLENNOW E, LAGERSTEDT K, MALMGREN H, et al. Concurrent microdeletion and duplication of 22q11.2. *Clinical Genetics*.2008;74(1):61-7.
- 6- BRECKPOT J, THIENPONT B, BAUTERS M, et al. Congenital heart defects in a novel recurrent 22q11.2 deletion harboring the genes CRKL and MAPK1, *American Journal of Medical Genetics Part A* . 2012;158A(3):574–580.
- 7- BRZUSTOWICZ LM AND BASSETT AS. miRNA-mediated risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome.*Frontiers in Neurology*. 2012;3(291).
- 8- BURNSIDE RD. 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features. *Cytogenetic and Genome Research*, 2015; 146: 89–99.
- 9- CAMPBELL CD, EICHLER EE. Properties and rates of germline mutations in humans.*Trends in Genetics*.2013;29(10):575-584.
- 10- CARELLE-CALMELS N, SAUGIER-VEBER P, GIRARD-LEMAIRE F, et al. Genetic compensation in a human genomic disorder. *New England Journal of Medicine*.2009;360:1211-1216.
- 11- CARLSON C, SIROTKIN H, PANDITA R, Goldberg, et al. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet*. 1997;61:620-9.
- 12- CAYLER GG. Cardiofacial syndrome:congenital heart disease and facial weakness, a hitherto unrecognized association. *Arch Dis Child*. 1969;44(233):69-75.
- 13- CHRISTIAN SL, PACIORKOWSKI AR, MARINI C, et al. Copy number variants and infantile spasms: evidence for abnormalities in ventral forebrain development and pathways of synaptic function. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(12):1238-45.
- 14- COPPINGER J, MCDONALD-MCGINN D, ZACKAI E, et al. Identification of familial and de novo microduplications of 22q11.21-q11.23 distal to the 22q11.21 microdeletion syndrome region., *Human Molecular Genetic*. 2009;18(8):1377-83.
- 15- COULTER ME, MILLER DT, HARRIS DJ, et al. Chromosomal microarray testing influences medical management. *Genet Med*. 2011;13(9):770-6.
- 16- DELIO M, GUO T, MCDONALD-MCGINN DM, et al. Enhanced maternal origin of the 22q11.2 deletion in velocardiofacial and DiGeorge syndromes. *The American Journal of Human Genetic*.2013;92(3):439-447.
- 17- DUPONT C, GRATI FR, CHOY KW, et al. Prenatal diagnosis of 24 cases of microduplication 22q11.2: na investigation of phenotype-genotype correlations. *Prenat Diagn*. 2015;35(1):35-43

- 18- ENSENAUER RE, ADEYINKA A, FLYNN HC, et.al. Microduplication 22q11.2, an Emerging Syndrome: Clinical, Cytogenetic, and Molecular Analysis of Thirteen Patients. *The American Journal of Human Genetics*. 2003; 73:1027–1040.
- 19- FAGERBERG CR , GRAAKJAER J, HEINL UD,et al. Heart defects and other features of the 22q11 distal deletion syndrome. *European Journal of Medical Genetics*. 2013;56(2):98–107.
- 20- FERNANDEZ L, NEVADO J, SANTOS F, et.al. A deletion and a duplication in distal 22q11.2 deletion syndrome region. Clinical implications and review.*BMC Medical Genetics*.2009;10(48).
- 21- FIRTH HV. 22q11.2 Duplication. Acessado em 03 de janeiro de 2016 – Disponível em- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3823/>
- 22- FOMIN ABF. Avaliação da função tímica em pacientes com síndrome de DiGeorge(tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2009.
- 23- GARCIA-MIÑAUR S, FANTES J, MURRAY RS, et al. A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *Journal of Medical Genetics*. 2002;39(10).
- 24- GENNERY AR. Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. *Cell mol life sci*. 2012;69(1):17-27.
- 25- GHR – Genetics home reference. Revisado em setembro de 2007. Acessado em 20 de janeiro de 2016. Disponível em- <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COMT>
- 26- GREENHALGH KL, ALIGIANIS IA, BROMILOW G., et al. 22q11 deletion: a multisystem disorder requiring multidisciplinary input. *Arch Dis Child* 2003;88:523-4.
- 27- GURIS DL, FANTES J, TARA D, et al. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nature Genetics*. 2001; 27:293–298.
- 28- HOPKIN RJ, SCHORRY EK, BOFINGER M, SAAL HM. Increased need for medical interventions in infants with velocardiofacial (deletion 22q11) syndrome. *J Pediatr* 2000;137:247-9.
- 29- INOUE K.; LUPSKI JR. Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*.2002;3:199-242.
- 30- KAMIYA TY. Caracterização do espectro fenotípico de pacientes com fissuras labiopalatinas associadas a múltiplas anomalias congênitas e alterações estruturais (tese). Bauru: Hospital de reabilitação de anomalias craniofaciais, Universidade de São Paulo;2009).
- 31- KOBRYNSKI LJ and SULLIVAN KE. Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome:the chromosome22q11.2 deletion syndrome. *Lancet*. 2007;370(9596):1443-52.
- 32- KONG SW, SHIMIZU-MOTOHASHI MG, LEE HC, et al. Peripheral blood gene expression signature differentiates children with autism from unaffected siblings. *Neurogenetics* 2013; 14:143–152.
- 33- KOSHIYAMA DB, ROSA FBM, ZEN PRG. et al.Síndrome de deleção 22q11.2: Importância da avaliação clínica e técnica de fish. *Rev Assoc Med Bras* 2009; 55(4): 442-6.
- 34- KURAHASHI H, AKAGI K, INAZAWA J, et al. Isolation and characterization of a novel gene deleted in DiGeorge syndrome. *Human Molecular Genetics*.1995;04(4):541-549.
- 35- L. FERNANDEZ, NEVADO J, SANTOS F, et.al. A deletion and a duplication in distal 22q11.2 deletion syndrome region. Clinical implications and review. *BMC Medical Genetics*. 2009;10(48).
- 36- LEE CH, HSIEH KS, CHEN YL, SHIUE YL. Identification of candidate genes for congenital ventricular septal defects with hsa22q11 loss of heterozygosity. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(3):263-72.

- 37- LIAO L, KOCHILAS L, NOWOTSCHIN S, et al. Full spectrum of malformations in velocardiofacial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage. *Human Molecular Genetics*. 2004;13(15):1577–1585.
- 38- LICHTER P, CREMER T, BORDEN J, et al. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 1988;80:224-234.
- 39- LINHARES ND, SVARTMAN M, VALADARES ER. Cytogenetic diagnosis of patients with idiopathic mental retardation. *J Bras Patol Med Lab*. 2011; 48(1):33-39.
- 40- LU XY, PHUNG MT, SHAW CA, et al. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 2008; 122(6): 1310-1318.
- 41- LUPSKI JR. Genomic disorders: recombination-based disease resulting from genome architecture. *Am J Hum Genet*.2003;72(2): 246-252.
- 42- MCDONALD-MCGINN DM, SULLIVAN KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *Medicine*. 2011; 90:1–18.
- 43- MERICO D, COSTAIN G, BUTCHER NJ, et al. MicroRNA dysregulation, gene networks, and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome. *Frontiers in Neurology*.2014;5(238).
- 44- MICHELSON DJ, SHEVELL MI, SHERR EH, et al. Evidence report: genetic and metabolic testing on children with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2011;77(17):1629–1635.
- 45- MIKHAIL FM, BURNSIDE RD, RUSH B, et al. The recurrent distal 22q11.2 microdeletions are often de novo and do not represent a single clinical entity: a proposed categorization system. *Genetics in medicine*. 2014;16(1): 92-100.
- 46- MOLCK MC, VIEIRA TP, SIMIONI M, et al. Distal 22q11.2 microduplication combined with typical 22q11.2 proximal deletion: a case report. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(1):215-20
- 47- MOON AM, GURIS DL, SEO JH, et al. Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. *Developmental Cell*. 2006;10(1):71–80.
- 48- NEWBERN J, ZHONG J, WICKRAMASINGHE RS, Li et al. Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci USA*.2008;105:17115–17120.
- 49- OGILVIE CM, AHN JW, MANN K, et al. A novel deletion in proximal 22q associated with cardiac septal defects and microcephaly: A case report. 2009. *Mol Cytogenet* 2:9.
- 50- OLIVEIRA CC AND DOMINGUES MAC. Pierre Robin sequence: case report, the relevance of autopsy. *J. Bras. Patol. Med*.2015;51(5):335-338.
- 51- OU Z, BERG JS, YONATH H, et al. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genetics in Medicine*. 2008;10(4):267–277.
- 52- PARKER H, CONWAY E, GOLDSBERRY J, et al. Genetic and molecular aspects of DiGeorge syndrome. *Bio One, The Biologists' Forum*. 2015;86(2):109-117.
- 53- PEREIRA RR. O Papel da Variação do Número de Cópias Genômicas no Fenótipo Clínico de Deficiência Intelectual em uma Coorte Retrospectiva da Rede Pública de Saúde do Estado de Goiás. (TESE). Goiânia. Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade Federal de Goiás; 2014.
- 54- PHILIP N, BASSET A. Cognitive, behavioural and psychiatric phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Behav Genet*. 2011;41(3):403-12.

- 55- PINTO IP. A importância dos resultados do CMA no aconselhamento genético das famílias com probandos apresentando deficiência intelectual. Goiânia, Dissertação de Mestrado. 2015. p64.
- 56- PORTNOI M. Microduplication 22q11.2: A new chromosomal syndrome. *European Journal of Medical Genetics*.2009;52:1769-7212.
- 57- RACEDO SE, MCDONALD-MCGINN DM, CHUNG JH, et al. Mouse and Human CRKL Is Dosage Sensitive for Cardiac Outflow Tract Formation. *The American Journal of Human Genetics*. 2015;96(2):235-244.
- 58- RAUCH A, PFEIFFER RA, LEIPOLD G, et al. A novel 22q11.2 microdeletion in DiGeorge syndrome. *The American Journal of Human Genetics*.1999; 64(2):659–666.
- 59- RAVASSARDA P, CÔTÉB P, GRONDIN B, et al. ZNF74, a Gene Deleted in DiGeorge Syndrome, Is Expressed in Human Neural Crest-Derived Tissues and Foregut Endoderm Epithelia. *Genomics*.1999;62(1):82-85.
- 60- RODRIGUES RM, Refinamento citogenético em indivíduos com anomalias craniofaciais sindrômicas sem diagnóstico definido(dissertação). Bauru: Hospital de reabilitação de anomalias craniofaciais, Universidade de São Paulo;2010).
- 61- RODNINGEN OK, PRESCOTT T, ERIKSSON AS AND ROSBY O. 1.4 Mb recurrent 22q11.2 distal deletion syndrome, two new cases expand the phenotype. *European Journal of Medical Genetics*. 2008;51(6):646–650.
- 62- ROSA MTA. Caracterização clínica de pacientes com deficiência Intelectual sindrômica e alterações cromossômicas submicroscópicas detectadas pela análise cromossômica por microarray, 2015
- 63- ROSA RFM, ZEN PRG, GRAZIADIO C, et al. Síndrome de deleção 22q11.2 e cardiopatias congênitas 22q11.2. *Rev Paul Pediatr* 2011; 29(2):251-60.
- 64- ROSA RFM, ZEN PRG, RICACHINEVSKY CP, et al. Duplicação 22q11.2 e defeitos cardíacos congênitos. *Arq. Bras. Cardiol*, 2009;93(4): e67-69.
- 65- ROSA RFM, ZEN PRG, ROMAN T, et al. Síndrome de deleção 22q11.2: compreendendo o CATCH2. *Rev Paul Pediatría*. 2009. 27(2):211-20.
- 66- RUMP P, LEEUW N, VAN ESSEN AJ, et al. Central 22q11.2 Deletions. *American Journal of medical genetics*.2014;164^a: 2707–2723.
- 67- SAGOO GS, BUTTERWORTH AS, SANDERSON S, et al. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet. Med*. 2009;11:139–146.
- 68- SANDRI, 2011. Investigações de alterações na região 22q11 em indivíduos com fissura de palato. (Tese) Bauru. Universidade de São Paulo- Hospital de reabilitação de anomalias craniofaciais.2011.
- 69- SANNA-CHERCHI S, KIRYLUK K, BURGESS KE, et al. Copy-number disorders are a common cause of congenital kidney malformations. *The American Journal of Human Genetics*. 2012; 91(7):987–997.
- 70- SCHOUMANS J, RUIVENKAMP C, HOLMBERG E, et al. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *J Med Genet* 2005;42:699–705.
- 71- SEDLAČKOVA E. Velopharyngeal insufficiency as developmental disturbance. *Cas Lek Ces*. 1955;94(47/48):1304-7.
- 72- SHAFFER LG, LUPSKI JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans.*Annu Rev Genet*. 2000;34:297-329.
- 73- SHAIKH TH, KURAHASHI H AND EMANUEL BS. Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: An update and literature review. *Genetics in Medicine*. 2001;3(1):6-13.

- 74- SHAIKH TH, KURAHASHI H, SAITTA SC et al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genetic*. 2000;9(4):489-501.
- 75- SHAW CJ.; LUPSKI JR. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet*.2004;13(1):57-64.
- 76- SHAW-SMITH C, REDON R, RICKMAN L. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J MedGenet*. 2004;41:241–248.
- 77- SHILLEN A, VOGELS A, DEVRIENDT K, et al. Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genetic*.2000;97(2):128-35.
- 78- SHPINTZEN RJ, GOLDBERG RB, LEWIN ML. et al. A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies and learning disabilities: velocardiofacial syndrome. *Cleft Palate J*. 1978;15(1):56-62.
- 79- SILVA JMA. Doença de Graves e deficiência de IgA como manifestações da síndrome de deleção 22q11.2. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010; 572- 577.
- 80- SORENSEN KM, AGERGAARD P, OLESEN C. et al. Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. *J molecular diagnost*.2010;12(2):147-5.
- 81- STACHON AC, BASKIN B, SMITH AC et al. Molecular diagnosis of 22q11.2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(24):2924-30.
- 82- TAN TY, GORDON CT, AMOR DJ, FARLIE PG. Developmental perspectives on copy number abnormalities of the 22q11.2 region. *Clin Genetic*.2010;78(3):201-18.
- 83- TAN TY, KILPATRICK N, FARLIE PG. Developmental and genetic perspectives on Pierre Robin sequence. *Am. J. Med. Genet*. 2013;163C: 295-305.
- 84- TAO L, QING L, YI-XIN W, et al. Use of amniocytes for prenatal diagnosis of 22q11.2 microdeletion syndrome: a feasibility study. *Chin Med J*.2010;123(4):438-42.
- 85- TKACHENKO N, SOARES G, SÁ MJ, et al. Síndrome de deleção 22q11.2: diagnóstico em idade adulta – experiência do centro de genética médica doutor jacinto magalhães. *Nascer e Crescer*. 2015; 24(1).
- 86- TRASK B.J. 2002. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat. Rev. Genet*. 3: 769-78.
- 87- VAN CAMPENHOUT S, DEVRIENDT K, BRECKPOT J, et al. Microduplication 22q11.2: a description of the clinical, developmental and behavioral characteristics during childhood. *Genet Couns*. 2012;23:135–48.
- 88- VAN ENGELLEN K, TOPF A, KEAVNEY BD, et al. 22q11.2 deletion syndrome is under-recognised in adult patients with tetralogy of Fallot and pulmonary atresia. *Heart*. 2010; 96(8): 621-4.
- 89- VERGES L, MOLINA O, GEÁN E, et al. Deletions and duplications of the 22q11.2 region in spermatozoa from DiGeorge/velocardiofacial fathers. *Molecular Cytogenetics*. 2014;7(86).
- 90- VERHAGEN JM, DIDERICH KE, OUDESLUIJS G, et al. Phenotypic variability of atypical 22q11.2 deletions not including TBX1. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(10):2412-20.
- 91- VIEIRA TAP. Contribuições para o estabelecimento de estratégias laboratoriais em genética para a saúde pública no Brasil utilizando a síndrome de deleção 22q11.2 como modelo. 2012.

- 92- WENTZEL C, FERNSTROMM M, OHRNER Y, et al. Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. *Eur J Med Genet.* 2008;51:501–510.
- 93- WIEGANT J, KALLE W, MULLENDERS L, et al. High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum. Mol. Genet.* 1992;1:587-591.
- 94- YAMAGISHI H. The 22q11.2 deletion syndrome. *Keio J Med.* 2002; 51(2):77-88.
- 95- YU S, GRAF WD, AND SHPRINTZEN RJ, Genomic disorders on chromosome 22. *Current Opinion in Pediatrics.* 2012; 24(6):665-671.
- 96- ZEITZ MJ, LERNER PP, AY F, et al. Implications of COMT long-range interactions on the phenotypic variability of 22q11.2 deletion syndrome. *Nucleus.* 2014;04(06):487-493.
- 97- ZHANG F AND LUPSK JR. Non-coding genetic variants in human disease. *Human Molecular Genetics.* 201;24(R1):r102-110.
- 98- ZHANG Z, BALDINI A. In vivo response to high-resolution variation of TBX1 mRNA dosage, *Hum. Mol. Genet.* 2007;17(1):150e157.

Research Article

The Identification of Microdeletion and Reciprocal Microduplication in 22q11.2 Using High-Resolution CMA Technology

Ana Julia Cunha Leite,^{1,2} Irene Plaza Pinto,^{2,3} Damiana Mirian da Cruz e Cunha,² Cristiano Luiz Ribeiro,^{2,3} Claudio Carlos da Silva,^{1,2,3,4} Aparecido Divino da Cruz,^{1,2,3,4} and Lysa Bernardes Minasi^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Rua 235, No. 40, Setor Leste Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brazil

²Núcleo de Pesquisas Replicon, Departamento de Biologia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Rua 235, No. 40, Setor Leste Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

⁴Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular, Secretaria do Estado da Saúde de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Correspondence should be addressed to Lysa Bernardes Minasi; minasilb@gmail.com

Received 18 December 2015; Accepted 13 March 2016

Academic Editor: Jonathan Muraskas

Copyright © 2016 Ana Julia Cunha Leite et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The chromosome 22q11.2 region has long been implicated in genomic diseases. Some genomic regions exhibit numerous low copy repeats with high identity in which they provide increased genomic instability and mediate deletions and duplications in many disorders. DiGeorge Syndrome is the most common deletion syndrome and reciprocal duplications could be occurring in half of the frequency of microdeletions. We described five patients with phenotypic variability that carries deletions or reciprocal duplications at 22q11.2 detected by Chromosomal Microarray Analysis. The CytoScan HD technology was used to detect changes in the genome copy number variation of patients who had clinical indication to global developmental delay and a normal karyotype. We observed in our study three microdeletions and two microduplications in 22q11.2 region with variable intervals containing known genes and unstudied transcripts as well as the LCRs that are often flanking and within this genomic rearrangement. The identification of these variants is of particular interest because it may provide insight into genes or genomic regions that are crucial for specific phenotypic manifestations and are useful to assist in the quest for understanding the mechanisms subjacent to genomic deletions and duplications.

1. Introduction

The copy number variations (CNVs) changes result in meiotic nonallelic homologous recombination (NAHR) between low copy repeats (LCR) that are often flanking these genomics rearrangements. The crossover mediated by NAHR can be interchromosomal or intrachromosomal [1]. Some genomic regions exhibit numerous LCRs with high identity sequences (95–99%) which provide increased genomic instability and

mediate deletions and duplications in many disorders [2]. The microarray technology has increased the detection of CNVs and the diagnosis of patients with multiple congenital anomalies and intellectual disability.

The chromosome 22q11.2 region contains eight LCRs, designated from A to H. Four centromeric LCR22s (A to D) were related to reciprocal microduplications and DiGeorge/Velocardiofacial Syndromes (DGS/VCFs) (OMIM 188400 and 192430). On the other hand, telomeric LCR22s, named

LCR22D–H, located in a distal portion of 22q11.2 region, were related to distal microdeletions and reciprocal microduplications [3, 4].

DGS is the most common deletion syndrome with an incidence of 1: 4000 newborns and has a spectrum of clinical abnormalities that affects multiple systems, including cardiovascular, neurological, psychiatric, endocrine, and immune systems. Palatal abnormalities and characteristic facial features also can be present [5]. Around 85–90% of individuals with DGS have the deletions of 3 Mb spanning LCR22A–D, while 8–10% have a 1.5 Mb deletion in LCR22A–B [6].

Most of the individuals with 22q11.2 microduplications carry approximately 3 Mb in length, among LCR22A and LCR22D, which are the reciprocal of the common deleted region found in DGS/VCFS, while few patients have 1.5 Mb duplications among LCR22A and LCR22B [7]. Larger duplications of 4 Mb and 6 Mb were also reported and involve LCRA–LCRE and LCRA–LCRG, respectively [8].

According to Portnoi [9], the frequency of 22q11.2 microduplication is approximately half the frequency of microdeletions which can be explained for the highly variable and mild phenotype leading to a low investigation of individuals affected. In addition, the phenotype of individuals with 22q11.2 microduplications can share features with DGS/VCFS, including heart defects, velopharyngeal insufficiency with or without cleft palate or hypernasal speech, and urogenital abnormalities. Here, we described five patients with phenotypic variability that carries deletions or reciprocal duplications at 22q11.2 detected by Chromosomal Microarray Analysis (CMA).

2. Materials and Methods

2.1. Biological Samples. All five participants had global developmental delay (GDD) without etiological diagnosis after undergoing a thorough clinical evaluation. Assistant physicians from the Goiás state public health system referred each patient to the genetic service at both the Laboratory of Human Cytogenetic and Molecular Genetics and the Biology Department at Pontifical Catholic University in Central Brazil. Parents or guardians signed the informed consent forms approved by the Ethics Committee on Human Research at the Pontifical Catholic University of Goiás (CEP-PUC/GO), under the protocol number 1721/2011.

For each proband and their biological parents, a total of 5 mL of peripheral blood was collected using a standard vacuum extraction blood-collecting system containing EDTA and heparin. Genomic DNA was isolated from whole blood using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany), following the manufacturer's instructions. Conventional cell cultures, harvesting, and G-banding at the level of 550 bands were performed in all patients, following standardized procedures [10]. Chromosome observations were performed using a Zeiss Axioscope (Göttingen, Germany) and analyses using the IKAROS software (Metasystems Corporation, Altlußheim, Germany).

2.2. Chromosomal Microarray Analysis. Genomic DNA was obtained from peripheral blood from the probands and their

parents. The analyses were carried out on the probands and their biological parents to establish whether the DNA rearrangements were *de novo* or inherited. Total DNA (250 ng) for each sample was digested with *NspI*, ligated, PCR amplified and purified, fragmented, biotin-labeled, and hybridized for use in a GeneChip™ HD CytoScan Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The array was designed specifically for cytogenetic research, including ≈2,696,550 copy number variation markers, 743,304 are single-nucleotide polymorphism markers, and >1,953,246 are nonpolymorphic markers. CEL files obtained by scanning the arrays were analyzed using the Chromosome Analysis Suite software (Affymetrix). Gains and losses that affected a minimum of 50 and 25 markers, respectively, in a 100 kb length were initially considered.

2.3. 22q11.2 LCR Structure Analysis. Using the segmental duplication track of the <http://genome.ucsc.edu/> browser (Human Genome Build 36.1), we performed an analysis of duplicated genomic sequences including known LCRs (segmental duplication >1 kb of nonrepeat masked sequence with over 90% similarity), comparing the CNV size surrounding the proximal 22q11.2 locus 3 times (chr22: 18,640,000–25,080,000) against itself.

2.4. Clinical Report

Patient 1. Patient 1 was a 12-year-old female patient born to nonconsanguineous parents at 36-week gestation to a 42-year-old mother and 45-year-old father, and her birth weight was 3020 g. Child delivery was carried out through a caesarean section procedure. At 3 months of age, she had epilepsy and reflux. Physical examination of the proband revealed thumb brachydactyly, long finger, retrognathia, short philtrum, and large ear. The family history revealed that her oldest sister has heart malformation (Figure 1).

Patient 2. Patient 2 was a 15-year-old male patient born to nonconsanguineous parents, at 38-week gestation to a 38-year-old mother and 38-year-old father, and his birth weight was 3200 g and crown-heel length 45 cm. Child delivery was carried out through a caesarean section procedure. After birth, the child showed cyanotic, did not cry, and did not perform the act of sucking. At the age of 14 years, he presented with seizures, cried a lot, had a slow development, and talked nonsense. Physical examination of the proband revealed hypertelorism, ear protuberant with attached lobes, blunted nose, broad nose and narrow bridge, short philtrum, short neck, thumb brachydactyly, clinodactyly of the fifth finger, prognathism, and permanent microdontia. The family history revealed that his aunt's grandmother had intellectual disability (Figure 2).

Patient 3. Patient 3 was a 7-year-old male patient born to nonconsanguineous parents, at 39-week gestation to a 30-year-old mother and 29-year-old father, and his birth weight was 3840 g and crown-heel length 51 cm. Child delivery was carried out through a caesarean section procedure. Child sat at eight months of age with the physical therapist's help, did not crawl, and had hypotonia. He started walking at one

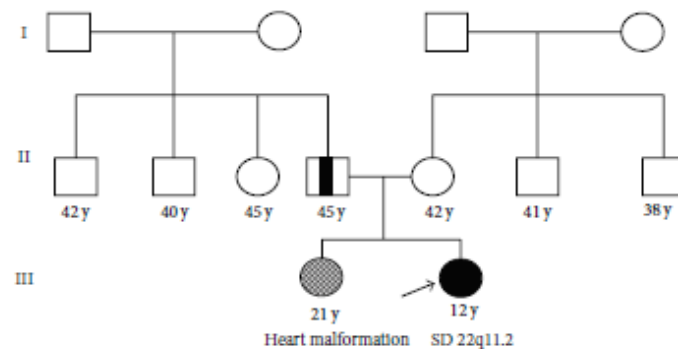


FIGURE 1: Pedigree of the patient 1 family.

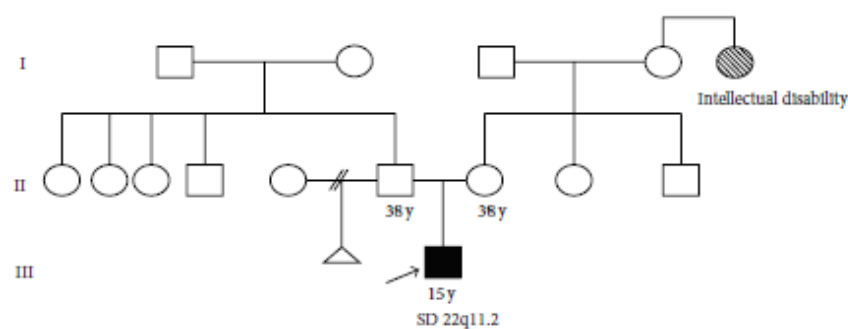


FIGURE 2: Pedigree of the patient 2 family.

year of age and only spoke at two years of age with the help of a speech therapist. Physical examination of the proband revealed retrognathia, low set ears, ear tags, ear protuberant with attached lobes, low nasal bridge, broad base of the nose, and epicanthic fold. He also had lowered orbital on the right side of the face and ptosis. The family history revealed that a maternal uncle was schizophrenic and paternal uncle had intellectual disability (Figure 3).

Patient 4. Patient 4 was a 14-year-old male patient born to nonconsanguineous parents, at 32-week gestation to a 35-year-old mother and 39-year-old father, and his birth weight was 1600 g and crown-heel length 42 cm. Child delivery was carried out through a caesarean section procedure. Child was born with esophageal atresia and had no suction act and growth delay. His bone age is two years less than the biological age. Physical examination of the proband revealed hypertelorism, micrognathia, thumb brachydactyly, and asymmetric face. The family history revealed that a maternal third cousin was diagnosed with Torre Syndrome and a paternal cousin was born with a cleft lip (Figure 4).

Patient 5. Patient 5 was a 4-year-old female patient born to nonconsanguineous parents, at 39-week gestation to a 30-year-old mother and 34-year-old father, and her birth weight was 3140 g and crown-heel length 49 cm. She had jaundice. Child delivery was carried out through a caesarean

section procedure. Child sat at eight months and spoke at three years of age. She presents difficulty in walking and has low immunity. Physical examination of the proband revealed hypertelorism, epicanthic fold, low nasal bridge, micrognathia, and thin upper lip. The family history revealed that a father's niece has intellectual disability and difficulty in walking (Figure 5).

3. Results and Discussion

In the current study, we describe molecular findings in 5 probands with clinical diagnosis of global developmental delay, presenting microdeletion or microduplication in the apparently identical genomic region within 22q11.2 region and the LCRs which surround these regions. Samples were initially screened using G-banding karyotypes and showed no visible numerical and structural alterations (46,XX or 46,XY). After this analysis, we performed Chromosomal Microarray Analysis that demonstrated abnormalities of 22q11.2 region. All individuals in our study had deletion and duplication breakpoints that flanked or fell within previously characterized LCR22s. For the duplications breakpoints we only identified LCR-H within the 22q11.2 region in contrast with deletions breakpoints that presented LCR22s flanking the 22q11.2 region. The results from CMA and LCRs are shown in Table 1.

TABLE 1: Clinical and molecular features of five probands screened by high-resolution CMA technology.

Case	Clinical features*	Age (yo)	Sex	CNV	Cytoband	Size (Mb)	Microarray nomenclature	Genes	Origin**	LCRs start/stop	LCR identity
1	GDD	12	F	Loss	22q11.21	0.75	22q11.21(20,716,902-21,465,662) × 1	ZNF74, SCARF2, MED15, SNAP29, CRKL, LZTR1, SLC7A4	Inherited pat	B-D B-D	99% 99%
2	GDD	15	M	Loss	22q11.21	2.88	22q11.21(18,916,842-21,800,797) × 1	PRODH, DGCR5, DGCR9, DGCRI0, DGCRI2, DGCR10, DGCR14, GSC2, SLC25A1, CITIC11, HIRA, MRPL40, UFD1L, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, COMT, ARVCF, DGCR8, DGCR6L, ZNF74, SCARF2, MED15, SNAP29, CRKL, LZTR1, SLC7A4, HIC2	De novo	A-D A-D	99% 99%
3	GDD	6	M	Loss	22q11.21	0.27	22q11.23q12.1(25,656,237-25,930,479) × 1	IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1	De novo	Alter H	96%
4	GDD	14	M	Gain	22q11.21	0.34	22q11.23q12.1(25,656,237-25,994,326) × 3	MIR650	Inherited mat	Alter H	96%
5	GDD	4	F	Gain	22q11.21	0.69	22q11.23(22,962,196-23,652,512) × 3	POM21L1P, GGT1C2, IGLL5, RTDR1, GNAZ, RAB36, BCR, FBXW4P1	Inherited mat	Alter H	96%

*GDD: Global Developmental Delay; **Mat: maternal; Pat: paternal.

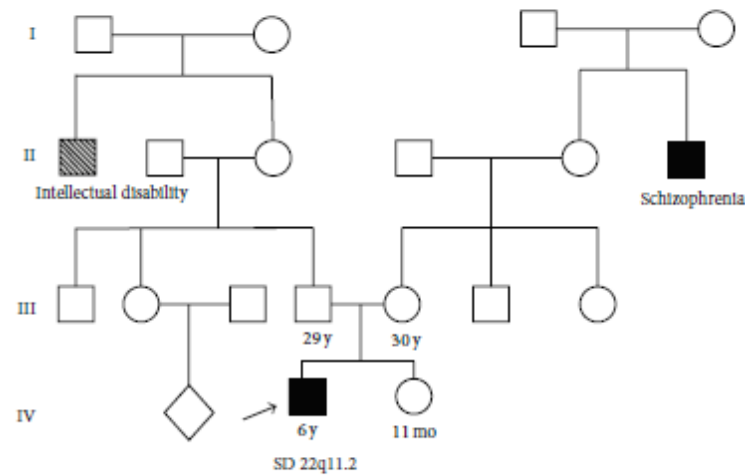


FIGURE 3: Pedigree of the patient 3 family.

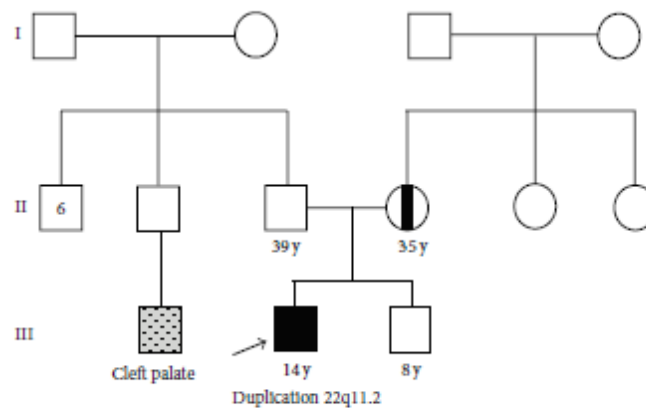


FIGURE 4: Pedigree of the patient 4 family.

We identify three microdeletions at 22q11.2 region from patients 1, 2, and 3 (Figure 6). In patient 2, the CMA showed a *de novo* 22q11.2 microdeletion with 2.88 Mb, flanked by LCR-A and LCR-D, which involves more than 70 genes, including *TBX1* that is suppressed. The majority of individuals have a 3 Mb deletion whose proximal region contains the presumed disease associated with T-box transcription factor 1 (*TBX1*) gene [11–16]. *TBX1* gene plays a vital role during development and deletion of this gene leads to a variety of craniofacial and cardiac structures [17]. Rump et al., in 2014, [18] highlighted that loss of *CRKL* combined with loss of either *TBX1* or *MAPK1* in individuals with A–D or larger deletions results in higher rates of cardiac defects than in those individuals with central deletions that involve only *CRKL* gene. Another gene present in this region is the catechol-O-methyltransferase (*COMT*) gene that catalyzes one of the major degradative pathways of the catecholamine transmitters, and one copy of this gene leads to abnormal regulation of catechol-O-methyltransferase levels in the brain. Researchers believe that

changes involving this enzyme in the prefrontal cortex may help explain the increased risk of behavioral problems and mental illness associated with 22q11.2 deletion Syndrome [19, 20].

The CMA from patient 1 showed a paternal origin 0.75 Mb deletion at 22q11.2, between LCR-B and LCR-D, classified by Rump et al., 2014 [18] in a Central Group of LCRs. Atypical or distal microdeletions between LCR-B and LCR-D were identified in a limited number of studies [21–26]. Patient 3 demonstrated a *de novo* 0.27 Mb microdeletion at 22q11.2 and we identified only LCRs within this CNV. There are three genes deleted at 0.27 Mb microdeletion: *IGLL3P*, *LRP5L*, and *CRYBB2P*. Haploinsufficiency in seven genes was observed in 0.75 Mb microdeletion (Table 1) that were associated with DGS [15, 27–29]. The *CRKL* gene has also been implicated in the underlying molecular mechanism of 22q11 deletion syndrome. Interestingly, *CRKL* was mapped in the distal half of the typical deleted region, suggesting that it may be responsible for those cases with the most distal

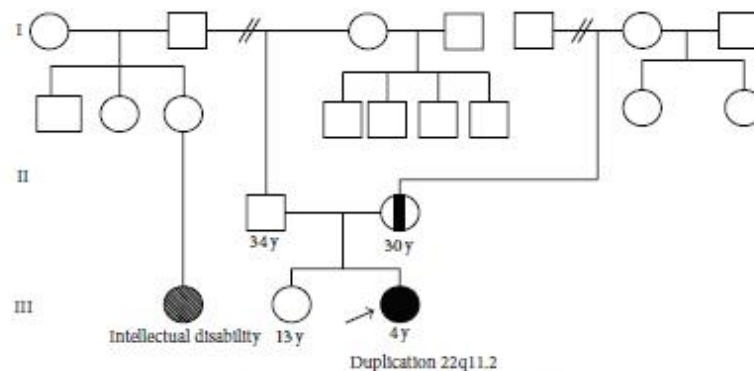


FIGURE 5: Pedigree of the patient 5 family.

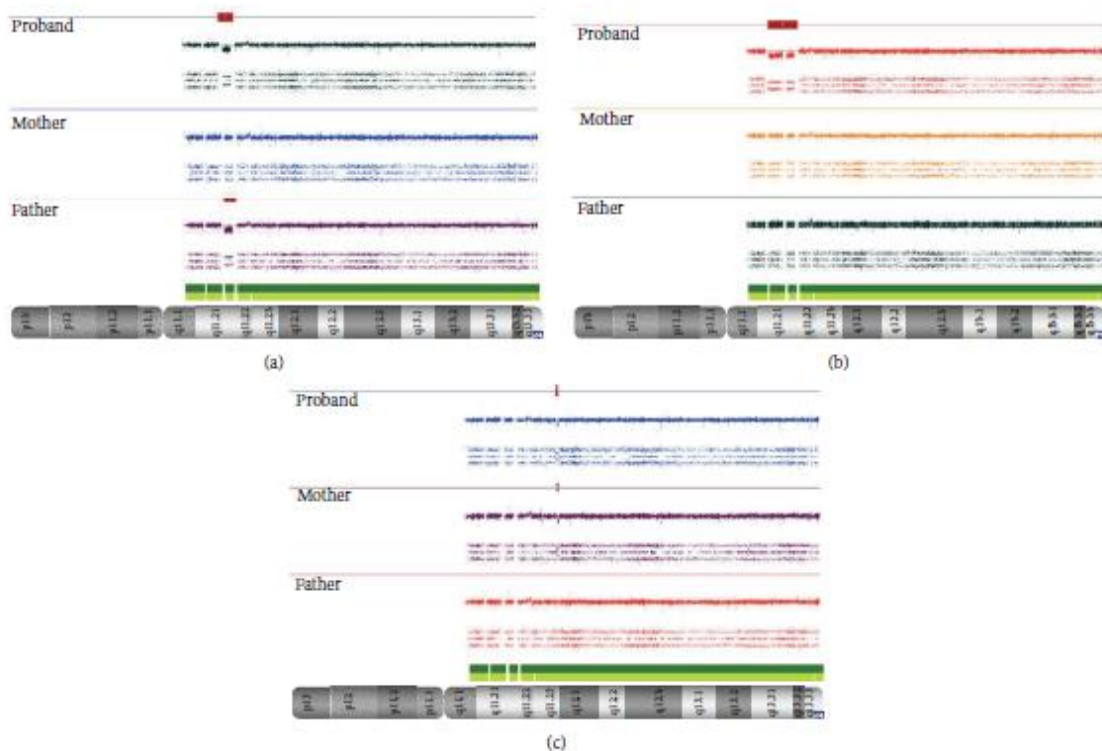


FIGURE 6: CMA data from probands and their parents at 22q11.2. Analysis showing (a) the bold red line which represents the microdeletion from proband 1 and her parents, (b) 2.88 Mb of *de novo* microdeletion from proband 2 and his parents, and (c) inherited maternal microdeletion from proband 3 and his parents.

deletions that do not involve *TBX1* gene [30, 31]. *TBX1* is the important gene related to the 22q11.2 deletion syndrome and the haploinsufficiency of this gene is presented in most of the phenotype characteristics. However, this gene is not always included in all 22q11.2 deletions, like patients 1 and 3, and many authors suggest that there are regulatory elements or

modifier genes mapped far away from this region which may affect the *TBX1* expression [30].

According to Carelle-Calmels et al., 2009, [32] deletion at 22q11.2 was usually sporadic and was reported to be inherited in 6 to 28% of patients with these syndromes. Different from what was observed in patient 1, inherited microdeletions were



FIGURE 7: CMA depicts genomic imbalances in chromosome 22. The bold blue line in (a) proband 4 and (b) proband 5 showed the inherited maternal microduplication at 22q11.2.

commonly of maternal origin, and these findings occur due to the recombination rate at 22q11.2 being 1.6 to 1.7 times greater in females than in males [33]. Furthermore, when inherited, these microdeletions had parent-of-origin effect, and phenotypic variability was observed [9].

Patients 1 and 3 presented global developmental delay and ears anomalies; developmental delay or cognitive impairment is reported in over 80% of patients but tends to be relatively mild, with no severe affect and the typical facial gestalt of the proximal microdeletion syndrome was absent. Moreover, ear anomalies are observed in most distal microdeletion and they are nonspecific [11–14].

Additionally, we observed two patients, 4 and 5, who harbor microduplication in 22q11.2 region. Patients 4 and 5 showed maternally inherited duplication of 0.34 Mb and 0.69 Mb, respectively (Figure 7). Both microduplications are located within the block of LCR22-F. *MIR650* gene is located at 0.34 Mb duplication and the potential role of miRNAs in the pathogenesis of duplication phenotypes has to be better investigated. In a study by Merico et al., 2014, [34], the authors showed that the deleted miRNAs in 22q11.2 are involved with the regulation of expression of genes in several developmental pathways which could be affected by miRNAs reduced levels, and the dysregulation of miRNA processing could be due to the haploinsufficiency of *DCGR8* gene [6, 35].

In general, duplications confer milder phenotypes and are more likely to be inherited than their reciprocal deletions, with approximately 93% of small duplications [36]. Although genomic imbalances inherited from a clinically normal parent are usually considered benign CNVs, parents of a child with an inherited chromosome abnormality may sometimes show mild variations of the child's phenotype, such as what has been reported for the 22q11.2 deletion syndrome [2].

Careful clinical assessment of both child and parents is crucial to understand the causative role of duplications at 22q11.2. Considering the unaffected phenotypes of parents, the presence of a genetic modifier has been proposed for other syndromes with variable expressivity. In this context, a genetic modifier is characterized by a combination of CNVs at the same or different loci inherited from parents in whom the single variation was insufficient to cause the disease

[37]. Genomic imbalances inherited from phenotypically unaffected parents may contribute to the progeny phenotype through variable penetrance or expressivity, or both, through epigenetic effects, response to environmental factor challenge, modulated epistasis, or stochastic cellular events during fetal development. Moreover, genomic imbalances may uncover a recessive mutation on the nondeleted allele [5, 8, 9].

We need to understand more regarding the reasons for similarities features and widely variable phenotype for individuals with 22q11.2 deletions and duplications. According to Zhang and Lupski, 2015, [38] these variable phenotypes suggested the possible existence of some modifying genetic factors in addition to the large genomic CNVs and recent progress has shown that the SNPs and CNVs in noncoding regions can be the genetic modifiers.

We identified two groups of LCR22 that are flanking the genomic rearrangements from patients 1 and 2. These findings suggest that the occurrence of genomic rearrangements might be mediated by NAHR between the LCRs, increasing the susceptibility to the generation of CNVs. On the other hand, patients 3, 4, and 5 showed LCRs within the reported deletion and duplications breakpoints; thus, it is not possible to speculate the detailed mechanism in relation to how this deletion and duplication initially appeared in these patients. Although high density of long and short interspersed nuclear elements (LINEs and SINEs) around the proximal breakpoint may have been contributory, detailed sequence data characterizing the breakpoints are necessary to recognize these elements and to propose the mechanisms of the genomic rearrangements.

4. Conclusions

We observed in our study variable intervals containing known genes and unstudied transcripts as well as the LCRs that are within and often flanking this genomic rearrangement. The recognition of LCRs provides important insights related to the role of genomic architecture in chromosomal rearrangements, chromosome evolution, and human disease. This report further illustrates the potential for determination

of small microduplications and microdeletions through of the use of Chromosomal Microarray Analysis. These array-based methods would allow more sensitive and rapid breakpoint localization without the need for multiple FISH experiments. Besides, the applications of microarray allow the identification of distal deletions and also facilitate breakpoint identification in the proximal 22q11.2 deletions and duplications. The identification of these variants is of particular interest because it may provide insight into genes or genomic regions that are crucial for specific phenotypic manifestations and are useful to assist in the quest for understanding the mechanisms subjacent to genomic deletions and duplications.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

Aparecido Divino da Cruz and Lysa Bernardes Minasi conceived and designed the experiments. Ana Julia Cunha Leite, Irene Plaza Pinto, Cristiano Luiz Ribeiro, and Damiana Mirian da Cruz e Cunha performed the experiments. Irene Plaza Pinto, Lysa Bernardes Minasi, Ana Julia Cunha Leite, and Aparecido Divino da Cruz analyzed the data. Ana Julia Cunha Leite, Aparecido Divino da Cruz, Irene Plaza Pinto, and Lysa Bernardes Minasi wrote the paper.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Rinaldo Wellerson Pereira from Catholic University of Brasilia for his assistance and for coordinating the ExeGenS, Rede de Excelência em Genética e Genômica Molecular Aplicada a Saúde Humana. Their gratitude goes to each patient and his/her family for taking part in this study. This work was supported by the CAPES and FAPEG.

References

- [1] E. Blennow, K. Lagerstedt, H. Malmgren, S. Sahlén, J. Schoumans, and B. M. Anderlid, "Concurrent microdeletion and duplication of 22q11.2," *Clinical Genetics*, vol. 74, no. 1, pp. 61–67, 2008.
- [2] J. Copping, D. McDonald-McGinn, E. Zackai et al., "Identification of familial and de novo microduplications of 22q11.21-q11.23 distal to the 22q11.21 microdeletion syndrome region," *Human Molecular Genetics*, vol. 18, no. 8, pp. 1377–1383, 2009.
- [3] T. H. Shaikh, H. Kurahashi, and B. S. Emanuel, "Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review," *Genetics in Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 6–13, 2001.
- [4] F. M. Mikhail, R. D. Burnside, B. Rush et al., "The recurrent distal 22q11.2 microdeletions are often de novo and do not represent a single clinical entity: a proposed categorization system," *Genetics in Medicine*, vol. 16, no. 1, pp. 92–100, 2014.
- [5] R. E. Ensenuer, A. Adeyinka, H. C. Flynn et al., "Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 73, no. 5, pp. 1027–1040, 2003.
- [6] R. D. Burnside, "22q11.21 deletion syndromes: a review of proximal, central, and distal deletions and their associated features," *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 146, pp. 89–99, 2015.
- [7] A. Alberti, C. Romano, M. Falco et al., "1.5 Mb de novo 22q11.21 microduplication in a patient with cognitive deficits and dysmorphic facial features," *Clinical Genetics*, vol. 71, no. 2, pp. 177–182, 2007.
- [8] Z. Ou, J. S. Berg, H. Yonath et al., "Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes," *Genetics in Medicine*, vol. 10, no. 4, pp. 267–277, 2008.
- [9] M.-F. Portnoi, "Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome," *European Journal of Medical Genetics*, vol. 52, no. 2–3, pp. 88–93, 2009.
- [10] R. Verma and A. Babu, *Human Chromosomes: Principles and Techniques*, McGraw-Hill, 2nd edition, 1995.
- [11] A. Rauch, R. A. Pfeiffer, G. Leipold, H. Singer, M. Tigges, and M. Hofbeck, "A novel 22q11.2 microdeletion in DiGeorge syndrome," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 64, no. 2, pp. 659–666, 1999.
- [12] F. M. Mikhail, M. Descartes, A. Piotrowski et al., "A previously unrecognized microdeletion syndrome on chromosome 22 Band q11.2 encompassing the BCR Gene," *The American Journal of Medical Genetics A*, vol. 143, no. 18, pp. 2178–2184, 2007.
- [13] S. Ben-Shachar, Z. Ou, C. A. Shaw et al., "22q11.2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 82, no. 1, pp. 214–221, 2008.
- [14] O. K. Rødningen, T. Prescott, A.-S. Eriksson, and O. Røsby, "1.4 Mb recurrent 22q11.2 distal deletion syndrome, two new cases expand the phenotype," *European Journal of Medical Genetics*, vol. 51, no. 6, pp. 646–650, 2008.
- [15] S. E. Racedo, D. M. McDonald-McGinn, J. H. Chung et al., "Mouse and human CRKL is dosage sensitive for cardiac outflow tract formation," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 96, no. 2, pp. 235–244, 2015.
- [16] C. R. Fagerberg, J. Graakjaer, U. D. Heintz et al., "Heart defects and other features of the 22q11 distal deletion syndrome," *European Journal of Medical Genetics*, vol. 56, no. 2, pp. 98–107, 2013.
- [17] H. Parker, E. Conway, J. Goldsberry, S. Jeffries, E. Price, and J. T. Oxford, "Genetic and molecular aspects of DiGeorge syndrome," *Bio One, The Biologists' Forum*, vol. 86, no. 2, pp. 109–117, 2015.
- [18] P. Rump, N. de Leeuw, A. J. van Essen et al., "Central 22q11.2 deletions," *American Journal of Medical Genetics—Part A*, vol. 164, no. 11, pp. 2707–2723, 2014.
- [19] M. J. Zeitz, P. P. Lerner, F. Ay et al., "Implications of COMT long-range interactions on the phenotypic variability of 22q11.2 deletion syndrome," *Nucleus*, vol. 4, no. 6, pp. 487–493, 2013.
- [20] S. Yu, W. D. Graf, and R. J. Shprintzen, "Genomic disorders on chromosome 22," *Current Opinion in Pediatrics*, vol. 24, no. 6, pp. 665–671, 2012.
- [21] L. Fernández, J. Nevado, F. Santos et al., "A deletion and a duplication in distal 22q11.2 deletion syndrome region. Clinical implications and review," *BMC Medical Genetics*, vol. 10, article 48, 2009.

- [22] L. Garavelli, S. Rosato, A. Wischmeijer et al., "22q11.2 Distal deletion syndrome: description of a new case with truncus arteriosus type 2 and review," *Molecular Syndromology*, vol. 2, no. 1, pp. 35–44, 2011.
- [23] S. Ledig, C. Schippert, R. Strick, M. W. Beckmann, P. G. Oppelt, and P. Wieacker, "Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome," *Fertility and Sterility*, vol. 95, no. 5, pp. 1589–1594, 2011.
- [24] S. Yu, W. D. Graf, A. Ramalingam et al., "Identification of copy number variants on human chromosome 22 in patients with a variety of clinical findings," *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 134, no. 4, pp. 260–268, 2011.
- [25] J. Breckpot, B. Thienpont, M. Bauters et al., "Congenital heart defects in a novel recurrent 22q11.2 deletion harboring the genes CRKL and MAPK1," *American Journal of Medical Genetics A*, vol. 158, no. 3, pp. 574–580, 2012.
- [26] S. Sanna-Cherchi, K. Kiryluk, K. E. Burgess et al., "Copy-number disorders are a common cause of congenital kidney malformations," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 91, no. 6, pp. 987–997, 2012.
- [27] P. Ravassard, F. Côté, B. Grondin, M. Bazinet, J. Mallet, and M. Aubry, "ZNF74, a gene deleted in DiGeorge syndrome, is expressed in human neural crest-derived tissues and foregut endoderm epithelia," *Genomics*, vol. 62, no. 1, pp. 82–85, 1999.
- [28] D. M. McDonald-McGinn, S. Fahiminiya, T. Revil et al., "Hemizygous mutations in SNAP29 unmask autosomal recessive conditions and contribute to atypical findings in patients with 22q11.2Ds," *Journal of Medical Genetics*, vol. 50, no. 2, pp. 80–90, 2013.
- [29] H. Kurahashi, K. Akagi, J. Inazawa et al., "Isolation and characterization of a novel gene deleted in DiGeorge syndrome," *Human Molecular Genetics*, vol. 4, no. 4, pp. 541–549, 1995.
- [30] S. Garcia-Miñaur, J. Fantes, R. S. Murray et al., "A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son," *Journal of Medical Genetics*, vol. 39, no. 10, p. E62, 2002.
- [31] D. L. Guris, J. Fantes, D. Tara, B. J. Druker, and A. Imamoto, "Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome," *Nature Genetics*, vol. 27, no. 3, pp. 293–298, 2001.
- [32] N. Carelle-Calmels, P. Saugier-Verber, F. Girard-Lemaire et al., "Genetic compensation in a human genomic disorder," *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 12, pp. 1211–1216, 2009.
- [33] M. Delio, T. Guo, D. M. McDonald-McGinn et al., "Enhanced maternal origin of the 22q11.2 deletion in velocardiofacial and DiGeorge syndromes," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 92, no. 3, pp. 439–447, 2013.
- [34] D. Merico, G. Costain, N. J. Butcher et al., "MicroRNA dysregulation, gene networks, and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome," *Frontiers in Neurology*, vol. 5, article 238, 2014.
- [35] L. M. Brzustowicz and A. S. Bassett, "miRNA-mediated risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome," *Frontiers in Genetics*, vol. 3, article 291, 2012.
- [36] J. D. Weisfeld-Adams, L. Edelmann, I. K. Gadi, and L. Mehta, "Phenotypic heterogeneity in a family with a small atypical microduplication of chromosome 22q11.2 involving TBX1," *European Journal of Medical Genetics*, vol. 55, no. 12, pp. 732–736, 2012.
- [37] J. Liao, L. Kochilas, S. Nowotschin et al., "Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage," *Human Molecular Genetics*, vol. 13, no. 15, pp. 1577–1585, 2004.
- [38] F. Zhang and J. R. Lupski, "Non-coding genetic variants in human disease," *Human Molecular Genetics*, vol. 24, no. 1, pp. R102–R110, 2015.