

Silvia Bragagnolo

**ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR DE PACIENTES COM
ESPECTRO ÓCULO AURÍCULO VERTEBRAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção
do Título acadêmico de Doutor em Ciências

São Paulo
2017

Silvia Bragagnolo

**ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR DE PACIENTES COM
ESPECTRO ÓCULO AURÍCULO VERTEBRAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez

Coorientadora:

Profa. Dra. Maria Isabel de Souza Aranha
Melaragno

São Paulo

2017

Bragagnolo, Silvia

**Estudo clínico e molecular de pacientes com Espectro
óculo Aurículo Vertebral** / Silvia Bragagnolo - São Paulo, 2017
xviii – 101 fls.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola
Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Morfologia

Titulo em inglês: Clinical and Molecular Study of
OculoAuriculoVertebral Spectrum

1.Síndrome de Goldenhar. 2.Microsomia Hemifacial.
3.Espectro Oculo-auriculo-vertebral. 4.Microtia. 5.Estudo Coorte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E
FUNCIONAL

Chefe do Departamento de Morfologia e Genética:

Profa. Dra. SANDRA MARIA MIRAGLIA VALDEOLIVAS

Chefe do Curso de Pós-Graduação:

Profa. Dra. SINTIA IOLE NOGUEIRA BELANGERO

SILVIA BRAGAGNOLO

**ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR DE PACIENTES COM ESPECTRO
ÓCULO AURÍCULO VERTEBRAL**

Presidente da Banca:

Profa. Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Décio Brunoni

Profa. Dra. Leila Montenegro Silveira Farah

Profa. Dra. Mirlene Cecília Soares Pinho Cernach

Profa. Dra. Vera Lucia Lopes Gil

Dedicatória

*A todos, e a cada um dos meus pequenos pacientes e suas famílias
lutadoras, que enfrentam o preconceito, a angústia e as dificuldades
sociais com garhardia, e assim me motivam a continuar apesar, e além de
tudo...*

Agradecimentos

Novamente, antes e acima de tudo, a Deus, pela graça de viver e poder servir...

À minha orientadora, chefe e amiga Ana Beatriz, que me acolheu como colega há tanto tempo, por todos os momentos importantes partilhados de nossas vidas, (...por segurar minha mão nos mais difíceis...), e principalmente, por ter acreditado na minha proposta e aceitado me orientar.

À minha coorientadora Profa. Dra. Maria Isabel Melaragno, pela ajuda na trilha dos caminhos moleculares e a todos os técnicos, pós-graduandos e professores da Disciplina de Genética, que auxiliaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho e ao Departamento de Morfologia e Genética.

À minha querida companheira de pós-graduação, Mileny Colovati, que trabalhou muito duro para que pudéssemos realizar juntas este estudo.

À Dra. Maria de Fátima, que analisou conosco todas as imagens radiológicas deste trabalho, sempre demonstrando destreza e paixão pelo que faz...

À minha “escola”, hoje UNIFESP, que já foi gloriosa e vive tempos de penúria, mas que foi o berço do meu amor pela arte de servir..... pelo “conjunto da obra”...

Ao Professor Dr. Décio Brunoni, que sempre será o “Meu Mestre”, aquele que me ensinou os primeiros passos na Genética Médica, me aceitando como uma de suas primeiras discípulas, que me ensinou a resiliência e a quem carinhosamente chamamos de “papi”.... e à Dra. Leila, que nos ensinou a lidar com ele...

A todos os colegas médicos ou não, residentes, estagiários, alunos e discípulos da Genética, que trilharam comigo, nestes quase 30 anos, os caminhos da ciência em favor da assistência, pelo aprendizado mútuo e constante (Mirlene, Vânia, Allan, Rosane, Marco Ramos, Jane, Francis, Luis Alonso, Vera, Juliana, Ana Luísa, Inês, Débora, Nara, Luciana, Pablo, Andrea, Michele, Eduardo, Thais, Rodrigo, Ricardo, Erika, Kelin, Thiago, Gabriela e Cida...) e todos os outros que por um lapso possa não ter citado.

À minha mãe, exemplo de Mulher forte, alicerce de todas as virtudes, modelo de sensibilidade, altivez e imensa alegria de viver, que me ensinou a nunca se deixar abater e permanecer sempre em pé e de cabeça erguida!

Aos meus filhos, Lucas e Bianca, tão desejados, tão amados, que me ensinaram que não é possível ser perfeita, mas que a gratificação por pelo menos tentar, chega... cedo ou tarde.

Às minhas irmãs Virginia, Valéria e Renata, cada uma em sua “expertise”, que me ensinaram o valor da cumplicidade e, junto com seus escolhidos Marco, Dalton e Marcelo e meus amados sobrinhos e sobrinhas, Rodrigo e Talissa, André (meu sucessor) e Priscila, Bruno, Beatriz, Luísa, Guilherme e Bruna, sempre me incentivaram, me mostrando a importância de se ter uma família de verdade.

À minha amiga-irmã Nivia, companheira de vida tão querida, que me fez entender que “estar junto, não é estar perto, mas estar dentro”...

Ao meu querido amigo Alberto, “my person”... que me ensinou a me reconstruir e me manter em pé, sempre me incentivando e reafirmando meu valor...

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido à esta pesquisa (Processo **2013/04623-2** e **2013/19897-0**).

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Sumário.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Quadros.....	xi
Lista de Tabelas.	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Lista de Siglas.....	xiv
Lista de Símbolos.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstrat.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo Principal.....	2
2.2 Objetivos Específicos.....	2
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1 O espectro óculo aurículo vertebral.....	3
3.1.1 Variabilidade fenotípica no OAVS.....	6
3.1.1.1 Microtia.....	7
3.1.1.2 Microsomia Hemifacial.....	8
3.1.1.3 Alterações Oculares.....	9
3.1.1.4 Coluna Vertebral e outros.....	10
3.1.2 Diagnósticos Diferenciais.....	12
3.1.3 Classificação e critérios mínimos.....	13
3.1.4 Fisiopatologia e Etiologia do OAVS.....	14
3.1.4.1 Fatores de Risco.....	16
3.1.4.2 Alterações citogenômicas.....	18
3.1.4.2.1 Cromossomo 5.....	21
3.1.4.2.2 Cromossomo 14.....	21
3.1.4.2.3 Cromossomo 4.....	22
3.1.4.2.4 Cromossomo 22.....	22
3.1.4.3 Genes candidatos para OAVS.....	24
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	29
4.1 Pacientes estudados.....	29
4.1.1 Critérios de Inclusão.....	29

4.1.2 Critérios de Exclusão.....	29
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Estudo Citogenético e molecular.....	30
4.2.2 Coleta de Material.....	30
4.2.3 Estudo Citogenético.....	30
4.2.3.1 Cultura de linfócitos em sangue periférico.....	30
4.2.4 Estudo Molecular.....	31
4.2.4.1 Extração do DNA.....	31
4.2.4.2 Técnica de Array Genômico.....	31
4.2.4.2.1 Critérios de Análise do Array Genômico.....	31
5 RESULTADOS	33
5. 1 Avaliação clínica.....	33
5. 2 Avaliação citogenômica.....	54
5. 2.1 Resultados dos cariótipos.....	54
5. 2.2 Resultados dos arrays genômicos.....	54
6 DISCUSSÃO.....	57
6. 1 Características gerais da casuística.....	57
6. 2 Correlação genótipo-fenótipo.....	61
6.2.1 Cromossomo 4.....	62
6.2.2 Cromossomo19.....	66
6.2.3 Cromossomo 22.....	67
6.2.4 Cromossomo X.....	68
6.2.5 Demais Cromossomos.....	70
6. 3 OAVS e gene <i>MYT1</i>	78
6.4 Limitações do estudo.....	78
7 CONCLUSÕES.....	79
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
9 ANEXOS.....	102

Lista de Figuras

Figura 1: Vista frontal de cerâmica representando um indivíduo com características de OAVS. Extraído de Pachajoa et al. (2010).....	3
Figura 2: Compreensão do espectro segundo Gorlin et al., 1963; Alasti, Van Camp, 2009; Huang et al., 2010; Johnson et al., 2011.....	4
Figura 3: Compreensão do espectro segundo Xu et al., 2008; Rooryck et al., 2010; Luquetti et al., 2012.....	5
Figura 4: Critérios para a classificação das variantes consideradas benignas, provavelmente benignas, patogênicas ou provavelmente patogênicas. (adaptado de Gijssbers et al., 2011).....	32
Figura 5: Fotos do paciente 50 de frente e perfil D e E.....	65
Figura 6: Fotos do paciente 84 de frente	66
Figura 7: Fotos do paciente 1 de frente e perfil D.....	67
Figura 8: Fotos do paciente 36 de frente e perfil D e E.....	69
Figura 9: Fotos do paciente 37 de frente e perfil D e E.....	70
Figura 10: Fotos do paciente 15 de frente e perfil D e E.....	71
Figura 11: Fotos do paciente 18 de frente e perfil D e E.....	72
Figura 12: Fotos da paciente 20 de frente e perfil D e E.....	72
Figura 13: Fotos da paciente 39 de frente e perfil D e E.....	73
Figura 14: Fotos da paciente 41 de frente e perfil D e E.....	74
Figura 15: Fotos do paciente 52 com 1 ano e aos 17 anos.....	75
Figura 16: Fotos da paciente 49 de frente e perfil D e E.....	76
Figura 17: Fotos da paciente 58 de frente e perfil D e E.....	77
Figura 18: Fotos da paciente 42 de frente e perfil D e E.....	77

Lista de Quadros

Quadro 1: Características fenotípicas entre síndromes que fazem diagnóstico diferencial com OAVS.....	12
Quadro 2: História, heredograma e quadro clínico dos casos familiares.....	35
Quadro 3: Descrição dos pacientes que não apresentaram alteração molecular na casuística.....	44
Quadro 4: Deleções (del) ou duplicações (dup) consideradas de acordo com a patogenicidade, observadas pelo <i>array</i> genômico.....	56
Quadro 5: Características fenotípicas dos pacientes que apresentaram alterações do número de cópias no cromossomo 4.....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Prevalência de características fenotípicas no OAVS (adaptado de Cousley e Calvert, 1997).....	11
Tabela 2: Incidência de intercorrências pré e perinatais encontradas na casuística....	42
Tabela 3: Frequência das principais características do OAVS em nossa casuística..	43

Lista de Abreviaturas

a.	anos
a.C.	antes de Cristo
D	direita
d.C.	depois de Cristo
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
E	esquerda
<i>et al.</i>	e outros
fls.	folhas
m.	meses
pac.	Paciente
Prof.	professor
Profa.	Professora
Sd.	Síndrome
sem.	semanas

Lista de Siglas

ADNPM	Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor
AE	Aborto espontâneo
CGM	Centro de Genética Médica
CIA	Comunicação Interatrial
CIV	Comunicação Interventricular
CNV	do inglês – <i>Copy number variation</i>
DA	Deficiência auditiva
DECIPHER	do inglês – <i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
DGV	do inglês – <i>Database of Genomic Variants</i>
DHEG	Doença Hipertensiva específica da gravidez
DNA	do inglês – <i>deoxyribonucleic acid</i>
ECARUCA	do inglês – <i>European cytogeneticists association register of unbalanced chromosome aberrations</i>
EUROCAT	do inglês – <i>European Surveillance of Congenital Anomalies</i>
FOP	Forame Oval pérvio
FP	Fenda Palatina
HA	Hipertensão Arterial
HFM	Hemifacial Microsomia
ITU	Infecção do trato Urinário
LCR	do inglês – <i>Low copy repeats</i>
MAE	Meato Acústico Externo
NCBI	do inglês – <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NS	Neurossensorial
OAVS	do inglês – <i>Oculo Auriculo Vertebral Spectrum</i>
OE	Orelha externa
OI	Orelha interna
OM	Orelha média
OMIM	do inglês - <i>On line Mendelian Inheritance in Man</i>

PCA	Persistência do canal arterial
PIG	Pequeno para idade gestacional
PUBMED	do inglês - <i>National Library of Medicine</i>
RM	Ressonância Magnética
RN	recém-nascido
RX	Raios X (radiografia)
TC	Tomografia de Crânio
TOT	Tomografia de ossos Temporais
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USCS	do inglês - <i>University of California Santa Cruz Genome Browser and Database</i>
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VE	Ventrículo esquerdo
VUS	do inglês – <i>variant of uncertain significance</i>

Lista de símbolos

®	Marca registrada
% (OMIM%)	descrição fenotípica com base molecular desconhecida
# (OMIM#)	descrição fenotípica com base molecular conhecida
p	braço curto do cromossomo – do francês <i>petit</i>
q	braço longo do cromossomo
%	por cento
t	translocação
inv	inversão
del	deleção
dup	duplicação

Resumo

O espectro óculo aurículo vertebral (OAVS – do inglês *oculoauriculovertebral spectrum*) compreende um grupo sindrômico, que envolve alterações, de forma assimétrica e em graus variados, do primeiro e segundo arcos faríngeos, durante o período embrionário. **Objetivos:** Definir protocolo para avaliação de pacientes com OAVS, através de um fluxograma com diferentes abordagens. **Métodos:** Avaliar clínica, citogenômica e molecularmente pacientes do Centro de Genética Médica (CGM) da UNIFESP, com características fenotípicas do espectro óculo aurículo vertebral, selecionados segundo critérios diagnósticos mínimos (microtia e assimetria facial). Correlacionar as alterações citogenômicas e moleculares com o fenótipo e revisar a literatura. **Resultados:** Foram avaliados 72 pacientes, caracterizados e classificados fenotipicamente, analisando também fatores ambientais associados e comparando nossos achados aos da literatura. Por fim, correlacionamos os achados clínicos com os achados citogenômicos e moleculares. Foram encontradas 22 variações do número de cópias (CNVs do inglês *copy number variations*), sendo 15 patogênicas ou possivelmente patogênicas, quando comparados aos bancos de dados, em 20 dos 72 pacientes. **Conclusões:** Nossos dados foram concordantes com os da literatura no que tange aos fatores de risco pré-natais, às intercorrências neonatais, e características clínicas principais. As exceções foram a gemelaridade e a consanguinidade e as anomalias associadas, que foram maiores se comparados aos dados populacionais gerais. Os resultados obtidos não apontaram uma região genômica única relacionada com o quadro clínico em estudo, mas desequilíbrios cromossômicos recorrentes foram observados, principalmente no cromossomo 4 e 22. Algumas das CNVs observadas e consideradas patogênicas, incluem regiões contendo genes com relevância para o fenótipo de OAVS e relacionados com patologias conhecidas no Catálogo *On line* de Doenças Mendelianas (OMIM - do inglês, *On line Mendelian Inheritance in Man*). A recorrência de CNVs no braço curto do cromossomo 4, em cinco pacientes, revela uma região cromossômica (4p16.1p16.3) relevante para o fenótipo. Esta investigação pode potencialmente, sugerir diferentes mecanismos patogênicos envolvidos nesse espectro fenotípica e geneticamente heterogêneo.

Abstract

The Oculoauriculovertebral spectrum (OAVS) comprises a syndromic group, characterized by anomalies involving the first and second pharyngeal arches derivatives. Involvement is usually limited to one side, but bilateral form is known. The phenotype is highly variable, involving ears, eyes, face and neck and other systems and organs too. **Objectives:** To establish a phenotype-genotype correlation to the OAVS through analysis of molecular and cytogenetic findings from previous selected patients with at least microtia and facial asymmetry. **Methods:** We performed in each of the selected patients a phenotype, karyotype and CGH-array analysis and correlated to the findings previously reported in the literature. **Results:** From the 72 patients analyzed, 20 presented with a copy number variation (CNV) region classified as probably pathogenic. Ultimately, we were able to infer 22 different regions of CNV to the OAVS. **Conclusions:** We could not implicate a single genomic region to this broad phenotype but we were able to observe frequent rearrangements in chromosome 4 and 22. Some of the CNVs regions encompassed genes relevant to this specific phenotype and were also related to other already known diseases. The identification of recurrent rearrangement at 22q11 region in some of our patients reinforces the hypothesis that this would be a candidate region to the OAVS. Furthermore, we characterized in 4 patients another frequent region for rearrangement at the chromosome 4, including it as a possible candidate region as well. Our study suggests that different mechanism of pathogenicity may be involved in the OAVS.

1. INTRODUÇÃO

O espectro óculo aurículo vertebral (OAVS, OMIM %164210) caracterizado por alterações de estruturas craniofaciais, em particular orelha, boca, mandíbula, olho e coluna vertebral, tem a frequência estimada em 1: 5.600 nascimentos, porém estudos epidemiológicos referem números variados, dependendo da população estudada e dos critérios para inclusão dos pacientes considerados para o estudo (Barisic et al., 2014).

Além das alterações craniofaciais, outros sistemas e órgãos também podem ser afetados (cardíaco, sistema nervoso, gastrointestinal, esquelético, renal e outros).

O fenótipo é altamente heterogêneo e de etiologia considerada multifatorial, o que torna a precisão diagnóstica um desafio para os geneticistas. A maioria dos casos é esporádica, porém casos familiares com herança autossômica dominante e recessiva foram descritos. Os mecanismos que levam ao OAVS são alterações do desenvolvimento de estruturas derivadas do primeiro e segundo arcos faríngeos.

O risco empírico de recorrência, para parentes de primeiro grau é de 2 a 3%.

Fatores de risco ambientais, tais como: diabetes materno, uso de drogas vasoativas durante a gravidez, sangramento de segundo trimestre, gestações múltiplas e uso de técnicas de reprodução assistida, sugerem a participação de fatores não-genéticos na etiologia do OAVS.

Várias alterações citogenômicas e moleculares foram descritas associadas ao espectro, porém as mais frequentes estão relacionadas às regiões 5p e 22q. Genes associados ao desenvolvimento craniofacial, como *BAPX1*, *ERK2*, *YPEL1*, também têm sido alvo de estudo, no sentido de esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento deste quadro clínico. Recentemente, variantes no gene *MYT1* foram apontadas como prováveis responsáveis pela Síndrome de Goldenhar (Lopez et al., 2016).

As tecnologias citogenômicas atuais nos permitem identificar pequenas alterações cromossômicas não identificadas no cariótipo com banda G. Nosso objetivo é analisar uma amostra clinicamente selecionada por esses métodos, uma vez que o espectro apresenta ampla variabilidade fenotípica, o que pode nos levar a uma maior compreensão do envolvimento de microduplicações e microdeleções e maior entendimento na etiologia deste grupo de doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Estudar pacientes brasileiros com características fenotípicas do OAVS, clínica e citogeneticamente pelo *array* genômico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e classificar clinicamente os pacientes com espectro de óculo aurículo vertebral (OAVS), de acordo com os critérios diagnósticos mínimos estabelecidos.
- Elaborar um protocolo para avaliação destes pacientes através de fluxograma com diferentes abordagens.
- Correlacionar os achados clínicos aos citogenéticos encontrados através do estudo de *array* genômico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O espectro óculo aurículo vertebral

O espectro óculo aurículo vertebral (OAVS, OMIM %164210) é caracterizado pela associação não aleatória, de alterações da morfogênese de estruturas craniofaciais, derivadas do primeiro e segundo arcos faríngeos, afetando principalmente orelha, boca, mandíbula, olho e coluna vertebral (Tasse et al., 2005).

As malformações craniofaciais já eram observadas desde 300 a.C. a 600 d.C. A cultura tumaco-tolita, de origem colomboequatoriana, retratou em uma cerâmica, um possível indivíduo com características fenotípicas de OAVS, incluindo microsomia hemifacial, microtia e microftalmia (Figura 1). Esta obra cultural pode constituir uma das representações mais antigas das doenças congênitas do passado pré-hispânico latino-americano e mundial (Pachajoa et al., 2010).



Figura 1. Vista frontal de cerâmica representando um indivíduo com características de OAVS. Extraído de Pachajoa et al. (2010).

O termo OAVS foi sugerido por Gorlin et al. (1963) englobando duas diferentes entidades clínicas descritas: a primeira feita pelo oftalmologista belga-americano Maurice Goldenhar em 1952 e a segunda, por Saraux et al. em 1963. Goldenhar descreveu um par de gêmeos monozigóticos com dermóide epibulbar, apêndices pré-

auriculares, malformações de pavilhão auricular e microssomia hemifacial. Saraux et al. (1963) acrescentaram as alterações vertebrais, à síndrome.

Para alguns autores, a microtia (OMIM %600674), a microssomia hemifacial (HFM, OMIM %164210) e síndrome de Goldenhar (OMIM %164210) conforme descrita acima, seriam manifestações fenotípicas do OAVS, dentro do grupo de síndromes do desenvolvimento de primeiro e segundo arcos faríngeos (Gorlin et al., 1963; Alasti, Van Camp, 2009; Huang et al., 2010; Johnson et al., 2011). (Figura 2)

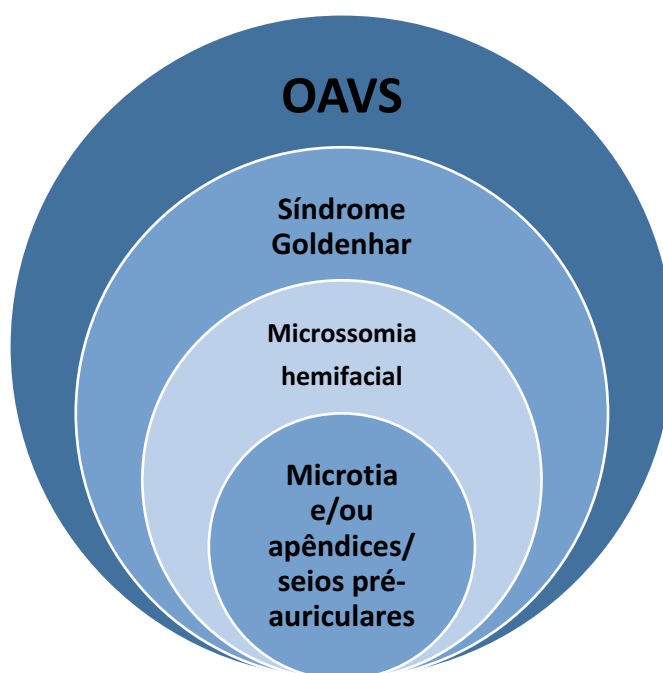


Figura 2: Compreensão do espectro segundo Gorlin et al., 1963; Alasti, Van Camp, 2009; Huang et al., 2010; Johnson et al., 2011

Para outros autores, o OAVS envolveria a síndrome de Goldenhar, acrescida de alterações em outros órgãos ou sistemas como: o cardiovascular (50%), renal/respiratório (5%) e sistema nervoso central, havendo deficiência intelectual em 5 a 10% dos pacientes. (Figura 3)

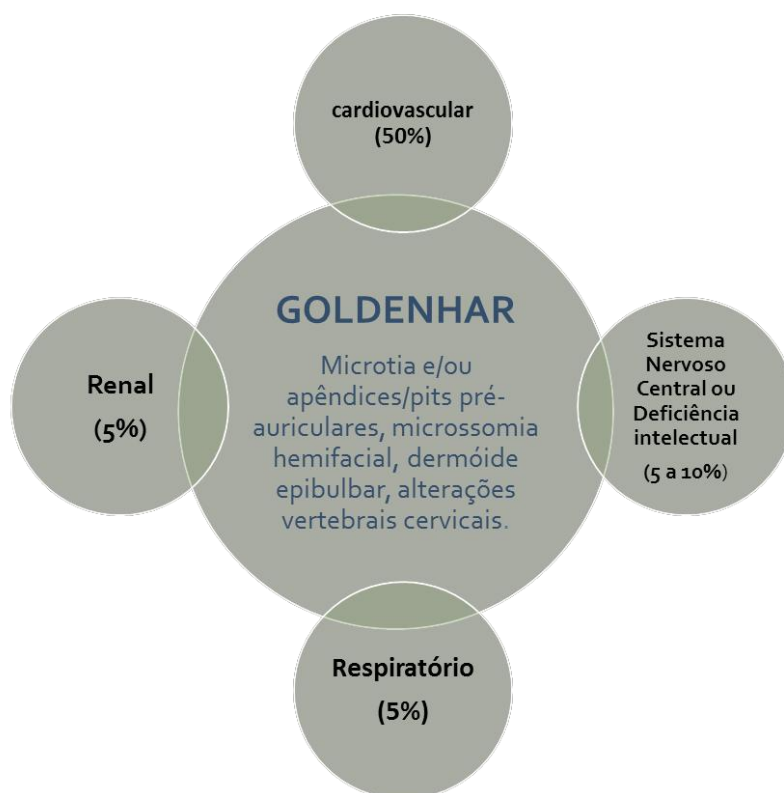


Figura 3: Compreensão do espectro segundo Xu et al., 2008; Rooryck et al., 2010; Luquetti et al., 2012

No OMIM, seis síndromes são listadas para o descritor “OAVS”: microssomia hemifacial (OMIM %164210), microssomia hemifacial com defeito radial (OMIM %141400), síndrome óculo aurículo fronto nasal (OMIM %601452), disostose mandíbulo facial de Guion-Almeida (OMIM #610536) e síndrome aurículo condilar dos tipos 1 (OMIM #602483) e 2 (OMIM #614669). Já os autores do capítulo sobre OAVS, no GeneReviews® (sistema de revisão de síndromes genéticas - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>), englobam neste espectro, as entidades nosológicas: microssomia hemifacial, síndrome de Goldenhar, síndrome de primeiro e segundo arcos faríngeos, disostose otomandibular, síndrome facio aurículo vertebral e displasia facial lateral.

Gorlin et al. (2001) estimaram a frequência de OAVS em 1: 5.600 nascimentos, porém outros estudos epidemiológicos observaram uma variação de até 1: 45.000, dependendo da população estudada e dos critérios para inclusão no estudo (Barasic et al., 2014). Em um estudo populacional recente de 355 casos, entre 1990-2009, englobando 16 países europeus, realizado por Barasic et al. (2014), observou-se que a frequência vem aumentando nos últimos anos, possivelmente relacionada com certos fatores de risco, como os métodos de reprodução assistida.

3.1.1 Variabilidade fenotípica no OAVS

O fenótipo no OAVS é altamente heterogêneo, podendo apresentar-se como microtia unilateral isolada ou associada até malformações de múltiplos órgãos e sistemas (Sharma, Passi, 2013).

Considera-se que a microsomia hemifacial ou a microtia isoladas possam ser variantes dismorfológicas da entidade, uma vez que, estudos familiares identificaram microtia isolada ou hipoplasia mandibular isolada, em parentes de primeiro grau de pacientes com OAVS (Rollnick, Kaye, 1983; Rollnick et al., 1988; Digilio et al., 2008).

As alterações de orelha externa (OE) podem variar de apêndices ou seios pré-auriculares à anotia, com ou sem agenesia de meato acústico externo (MAE) (Bennun et al., 1985).

Embriologicamente, o pavilhão auricular desenvolve-se a partir de seis proliferações mesênquimais do primeiro e do segundo arcos faríngeos, na base do pescoço e com o desenvolvimento da mandíbula, movem-se para a sua posição normal dos lados da cabeça. Já o meato acústico externo se desenvolve a partir da extremidade dorsal do primeiro sulco faríngeo (Fenda). As células ectodérmicas do tubo formado se proliferam, dando origem a uma placa epitelial compacta. No final do período fetal, as células centrais desta placa degeneram-se, formando uma cavidade que será a parte interna do meato acústico externo (Carlson, 2014; Moore, Persaud, 2016).

Os apêndices pré-auriculares (OMIM, %610420) são remanescentes de arcos faríngeos e embora de etiologia heterogênea, tem herança autossômica dominante em alguns casos descritos e um gene candidato na região q11.2-q12 do cromossomo 14 (Yang et al., 2006). Sua ocorrência isolada é de 5:1000 nativos.

Os seios ou fístulas pré-auriculares (OMIM, %128700) também são remanescentes de arcos faríngeos, têm herança autossômica dominante e gene candidato na região q11.1-q13.3 do cromossomo 8. Sua ocorrência isolada varia de 0,3 a 0,9% e é mais frequente na população negróide (Rollnick, 1988).

3.1.1.1 Microtia (OMIM %600674)

A microtia é uma anomalia congênita da OE, que varia de uma diminuição do tamanho do pavilhão auricular (e/ou má rotação) até sua ausência completa (anotia), sendo esta última considerada pela maioria dos autores, como a manifestação mais grave da microtia (Alasti, van Camp, 2009; Luquetti et al., 2011).

Com frequência estimada em 0,8 a 17,4:10.000, a microtia ocorre mais em homens (20 a 40% mais que nas mulheres), pode ser unilateral (77 a 93% dos casos, sendo 60% a Direita) ou bilateral com ou sem atresia de MAE, sendo a microtia com atresia de MAE considerada uma entidade separada no OMIM (#607842) e ocorrendo em 55 a 93% dos casos de microtia. Pode ainda estar ou não associada à deficiência auditiva (DA) condutiva (90% dos casos), neurossensorial (NS) ou mista (Melnick, Myrianthopoulos, Paul, 1979).

Castilla e Orioli (1986) propuseram a objetivação e substituição do termo displasia auricular por microtia, classificando-a da seguinte forma:

- ✓ Microtia I - caracterizada pela diminuição do tamanho com ou sem mudança de posição da OE, com ou sem a presença de apêndices e/ou fístulas pré-auriculares.
- ✓ Microtia II - alterações morfológicas menores e de posição da OE com ou sem agenesia do meato auditivo
- ✓ Microtia III - alterações morfológicas importantes e de posição da OE com agenesia do meato auditivo
- ✓ Microtia IV - caracterizada como anotia (OMIM 600674)

Em 15 a 60% dos casos, as microtias são síndromicas associadas a fendas faciais, assimetria facial, anomalias cardíacas, renais e vertebrais, microftalmia e polidactilia. Nestes casos, mais frequentemente são bilaterais, com ou sem deficiência auditiva (Alasti, Van Camp, 2009).

Embora a microtia tenha etiologia multifatorial, casos familiares de herança autossômica recessiva e autossômica dominante com expressividade variável e penetrância incompleta foram descritos (Gorlin et al., 1963; Kelbermann et al., 2001; Alasti, van Camp, 2009; Johnson et al., 2011; Luquetti et al., 2012).

Diversas alterações cromossômicas (trissomias dos cromossomos 13, 18, 21; translocação do braço curto do cromossomo 6 na região p24; isocromossomo

pseudodicêntrico (20;20) e isodissomia uniparental paterna do cromossomo 20), algumas microdeleções e CNVs (microdeleção, microduplicação, translocação e cópias *in tandem* no braço curto do cromossomo 4; microdeleção no braço longo do cromossomo 18) e alguns genes, por modelos animais ou envolvimento na embriologia da orelha (*Hoxa1/Hoxb1*, *Hoxa2*, *Hoxb6* e *Hoxa7*; *Six1*, *Six2* e *Six4*; *EYA1*, *SIX2* e *SALL1*; *Eya1*, *Sall1* e *SALL2*, *SALL3*, *SALL4*; *Sipl1* e *Rbck1*; *Tbx1*; *Irf6* e *Chuk* ou *Ikka*), assim como alguns sinalizadores (Bmps, Wnts e Fgfs) também foram associados à microtia.

Fatores ambientais apontados como de risco para microtia são: anemia, raça, idade materna ou paterna avançada, múltiparas, *influenza* no 1º trimestre da gestação, diabetes tipo I e uso de isotretinoína ou mycofenolato (imunossupressor) na gravidez (Luquetti et al., 2012).

3.1.1.2 Microsomia Hemifacial (OMIM %164210)

A cabeça e o pescoço originam-se de seis estruturas embrionárias chamadas de aparato faríngeo, cada uma composta por uma bolsa, um arco, uma fenda e uma membrana. Na quarta semana de gestação, células da crista neural migram do tubo neural para começar o desenvolvimento do ectomesenquima do arco faríngeo. Cada arco tem duas camadas (mesênquima e ectoderme), que produzem os quatro componentes primordiais: músculo, nervo, artéria e cartilagem. As estruturas craniofaciais mais comumente afetadas na HFM se desenvolvem a partir do primeiro e segundo arcos faríngeos (Carlson, 2014; Moore, Persaud, 2016).

A assimetria facial, que resulta de uma hipoplasia maxilar/mandibular, é o achado mais importante na microsomia hemifacial, entidade nosológica definida, de etiologia heterogênea e com um *locus* candidato graças à descrição de uma família por Kelbermann et al. (2001), no braço longo do cromossomo 14 (14q32).

A microsomia hemifacial ocorre em 1:5600 nascimentos, mais frequente em homens do que em mulheres e em 45% dos casos há parentes afetados, sendo 5 a 10% na irmandade (Teconi, Hall, 1983).

Fenômenos vasculares, particularmente hemorragia e hematoma da artéria estapediana no período embrionário, hipoxia por alta altitude, diabetes materna e uso

de talidomida ou ácido retinóico na gestação, são fatores ambientais associados ao quadro (Couslet, Calvert, 1997).

3.1.1.3 Alterações oculares

Das alterações oculares descritas no OAVS, além do característico dermóide epibulbar, o coloboma ocular também é frequente, além de várias outras alterações que podem ocorrer como: assimetria de pálpebras, micro ou anoftalmia, coloboma de pálpebra superior e deslocamento vertical da órbita (Gorlin et al., 1963).

O dermóide epibulbar é caracterizado como um coristoma congênito, de tamanho variado e aparência saliente, formado pela presença de tecido cutâneo ectópico, no caso na região limbar entre córnea e conjuntiva. Normalmente, é detectado ao nascimento e já foi descrito também nas aves e em animais domésticos, sendo machos e fêmeas igualmente afetados. Essa afecção oftálmica pode apresentar-se como pequena lesão minimamente invasiva ou causar graves alterações oculares como: ceratite, úlcera corneana e déficit visual. No exame histopatológico, é possível evidenciar a presença de epitélio escamoso estratificado e estruturas de tecido cutâneo. O dermóide epibulbar é o tumor de olho congênito mais comum em crianças e pode aparecer isoladamente ou associado a síndromes específicas como: síndrome oculoectodérmica (OMIM %600268 – OES); displasia frontofacial (OMIM %229400); lipomatose encefalocraniocutânea (ECCL - OMIM #613001); síndrome de Proteus (OMIM #176920); síndrome Townes-Brokes (TBS – OMIM #107480) e lipomatose múltipla (OMIM %151900), além da própria síndrome de Goldenhar.

Jakobiec et al. (2010) estudaram 68 dermóides identificados em 58 olhos de 48 pacientes do Hospital Infantil de Seattle, entre 1981 e 2014, e os agruparam em: isolados (pacientes sem outras anomalias congênitas); com microsomia hemifacial (pacientes com diagnóstico microsomia craniofacial, sendo estes, a maioria dos casos) e um grupo com outras anomalias (pacientes com outras anomalias congênitas). Todos os do primeiro grupo eram unilaterais e 69% à esquerda. Entre os dois primeiros grupos, a maioria eram perilimbais e lipodermóides no quadrante inferotemporal do olho, enquanto no terceiro não houve preferência de tipo ou localização.

3.1.1.4 Coluna vertebral e outros

A alteração de coluna mais frequente é cervical, sendo as fusões ou hemivértebras, as anomalias mais comuns (Goldenhar, 1952).

Além das alterações craniofaciais, alterações cardíacas (tetralogia de Fallot, defeito septal e de arco aórtico) e de sistema nervoso central (hidro ou microcefalia, hipoplasia de corpo caloso, malformação de Arnold Chiari) são presentes menos frequentemente no espectro. Outros sistemas e órgãos também podem ser afetados (Johnson et al., 2011).

Estudo recente, relatou grande comprometimento de outros órgãos e sistemas (69,5%), incluindo malformações cardíacas, renais e cerebrais, sendo os defeitos cardíacos congênitos os mais comuns, acometendo mais de 27,8% dos pacientes (Barisic et al., 2014).

O amplo espectro de anomalias envolvidos no OAVS apoiaria a hipótese de que este pode resultar de um defeito de desenvolvimento de campo embrionário, funcionando como uma unidade que responde de forma semelhante aos insultos diferentes tais como: anormalidades do cromossomo, mutação em um único gene, perturbações vasculares e teratógenos (Opitz, 1986; Opitz & Lewin 1987; Cousley & Wilson 1992).

A prevalência de características fenotípicas, a partir do resumo de 20 artigos publicados sobre a síndrome, entre 1983 e 2014 (adaptado de Cousley e Calvert, 1997) encontra-se na tabela 1.

Tabela 1. Prevalência de características fenotípicas no OAVS

Anomalias Principais		Prevalência ¹
Mandíbula	Hipoplasia mandibular	49%-100%
	Fossa glenoidea malformada	24%-27%
Orelha	Microtia	66%-99%
	Apêndices pré-auriculares	34%-61%
	Perda auditiva condutiva	50%-66%
Olhos	Distopia Orbital	15%-43%
	Dermóide Epibulbar	4%-35%
Nervos	Paralisia de VII par	10%-45%
Tecidos moles	Hipoplasia do músculo Mastigatório	85%-95%
	Macrostomia	17%-62%
Anomalias Craniofaciais Associadas		
Insuficiência Velofaríngea		35%-55%
Desvio Palatal		39%-50%
Anomalias da base do Crânio		9%-30%
Fenda Labial/ Palatina		15%-22%
Coloboma pálpebra superior		4%-25%
Hipodontia/ hipoplasia dentária		8%-25%
Atresia/estenose ducto Lacrimal		11%-14%
Plagiocefalia frontal		10%-12%
Disacusia Neurosensorial		6%-16%
Seio pré-auricular		6%-9%
Outras Anomalias		
Vértebras/costelas		16%-60%
Coluna Cervical		21%-42%
Escoliose		11%-26%
Cardíacas		4%-33%
Pigmentação		13%-14%
Membros		3%-21%
Sistema Nervoso Central		5%-18%
Geniturinário		4%-15%
Pulmonar		1%-15%
Gastrointestinal		2%-12%

¹adaptado de Cousley e Calvert, 1997

3.1.2 Diagnósticos Diferenciais

Os achados clínicos em indivíduos com OAVS podem sobrepor-se àqueles observados em síndromes, associações e sequências, portanto os diagnósticos diferenciais são inúmeros. O quadro 1 compara as diferentes características fenotípicas apresentadas no OAVS e em algumas síndromes com as quais faz diagnóstico diferencial.

Quadro 1: Características fenotípicas entre síndromes que fazem diagnóstico diferencial com OAVS

Síndromes	Genes /cromossomos	Características fenotípicas
Auriculocondilar 1 – OMIM # 602483 2 – OMIM # 614669 3 – OMIM # 615706	<i>GNAI3</i> (1p13.3) <i>PLCB4</i> (20p12.3) <i>EDN1</i> (6p24.1)	Assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, fenda orofacial
Oculoauricular OMIM # 612109	<i>HMX1</i> (4p16.1)	Assimetria facial, microtia, microftalmia, coloboma ocular
Branquio-oto-Renal 1 – OMIM # 113350 2 – OMIM # 610896 3 – OMIM # 608389	<i>EYA1</i> (8q13.3) <i>SIX5</i> (19q13.32) <i>SIX1</i> (14q23.1)	Assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, apêndices pré-auriculares, alterações renais, surdez
Síndrome Cat-eye OMIM # 115470	Tetrassomia 22q11.21	Assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, surdez, apêndices pré-auriculares, alterações renais, cardíacas, vertebrais, coloboma ocular
CHARGE OMIM # 214800	<i>CHD7</i> (8q12.2) <i>SEMA3E</i> (7q21.11)	Assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, anomalias cardíacas e renais, coloboma ocular, atresia de coanas
Miohiperplasia hemifacial OMIM 606773	?	Assimetria facial, hiperplasia dos músculos da face sem hiperplasia óssea, paralisia facial
Disostose Mandibulo-facial Guion-Almeida OMIM # 610536	<i>EFTUD2</i> (17q21.31)	Assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, surdez, apêndices pré-auriculares, cardíacas, vertebrais
Síndrome Miller OMIM # 263750	<i>DHODH</i> (16q22.2)	Hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, anomalias de membros superiores
Síndrome Nager OMIM # 154400	<i>SF3B4</i> (1q21.2)	Hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, apêndices pré-auriculares, alterações renais e cardíacas
Sd. Parry-Romberg OMIM % 141300	?	Assimetria facial, hipoplasia muscular progressiva, maxilar e/ou mandibular, paralisia facial
Sd.Townes-Brocks OMIM # 107480	<i>SALL1</i> (16q12.1) (<i>SALL4</i> - 20q13.2)	Assimetria facial, hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, surdez, apêndices pré-auriculares, alterações renais, cardíacas, vertebrais e esqueléticas de membros

Sd.Treacher-Collins 1- OMIM # 154500 2 - OMIM # 623717 3 - OMIM # 248390	<i>TCOF</i> (5q32-q33) <i>POLR1C</i> (13q12.2) <i>POLR1D</i> (6p21.1)	Hipoplasia maxilar e/ou mandibular, microtia, orientação de fendas palpebrais para baixo
VACTERL OMIM % 192350	?	Alterações renais, cardíacas, vertebrais

3.1.3 Classificação e critérios mínimos

A precisão diagnóstica no OAVS é um desafio para os geneticistas clínicos, devido à grande heterogeneidade do fenótipo e suas múltiplas etiologias. Por esta razão, vários autores propuseram critérios diagnósticos mínimos para o quadro (Grabb 1965; Melnick et al., 1979; Rollnick, Kaye, 1983; Teconi, Hall, 1983; Bennun et al., 1985; Tasse et al., 2007). Dentre estes critérios, a presença de microssomia hemifacial e microtia assimétrica com ou sem apêndices pré-auriculares tem predominado entre os diversos estudos.

Muitos autores propuseram classificações para o quadro, a partir da hipoplasia mandibular (Pruzansky et al., 1969; Harvold et al., 1983; Lauritzen et al., 1985; Kaban et al., 1988), associada às alterações da articulação têmporo-mandibular (Swanson and Murray, 1978; Kaban et al., 1981), combinado com microtia (Converse et al., 1979), isolando o comprometimento esquelético do comprometimento de partes moles (David et al., 1987), expandindo o espectro para acometimento extracraniano (Cohen et al., 1991; Gorlin et al., 2001), integrado à surdez e os apêndices pré-auriculares (Cousley et al., 1993).

Tasse et al. (2005) propuseram uma classificação em três grupos e dois subgrupos, de acordo com o comprometimento, como se segue:

- ✓ Grupo 1 - microtia isolada
- ✓ Grupo 2 - microtia com microssomia
- ✓ Grupo 3 - microtia com microssomia e anomalia vertebral

Subgrupo 1 – unilateral, sendo todos os sinais de um único lado

Subgrupo 2 – bilateral, com qualquer alteração bilateral

A partir destes grupos, os autores criaram um algoritmo, dando nota "2" para cada critério principal (microtia, microssomia hemifacial e alteração vertebral) e "1" para os subgrupos e outras alterações (deficiência auditiva, intelectual, dermóide epibulbar, fendas, alterações urogenitais, cardíacas, de membros, sistema nervoso,

microcefalia e baixa estatura), sendo o “score” máximo igual a “18” e caracterizando assim a gravidade do quadro e suas possíveis associações. Em seu estudo, concluíram que o envolvimento craniofacial bilateral, estava mais consistentemente associado a pelo menos uma anomalia extracraniana. Outras associações encontradas foram deficiência cognitiva com os escores mais altos; alterações de sistema nervoso central associadas a alterações oculares e fendas (sugerindo alterações de campo de desenvolvimento); alterações vertebrais e oculares associadas a alterações geniturinárias.

Gougoutas et al. (2007) propuseram um sistema de classificação clínica, baseado em uma proposta de Vento et al. (1991) para as malformações associadas à microsomia craniofacial, com base na representação pictórica de **OMENS** (**Ó**rbita em forma e tamanho, alterações **M**andibulares, malformações de Orelhas (**E**ars), envolvimento do **N**ervo facial e de tecidos moles (**S**oft)), no sentido de objetivar e uniformizar a avaliação clínica e acrescentando a esta, as manifestações extracranianas, chamando-a de OMENS-Plus. A proposta de Vento et al. (1991) conferia a cada uma destas regiões, valores de 0 a 3, permitindo a correlação da gravidade do defeito mandibular, aos achados fenotípicos craniofaciais e extracranianos, no caso do OMENS-Plus.

Até o presente momento, não há um consenso sobre os critérios mínimos a serem utilizados para o diagnóstico de OAVS (Sharma, Passi, 2013, Heike et al., 2016).

3.1.4 Fisiopatologia e Etiologia do OAVS

Vários mecanismos patogênicos foram propostos para o quadro, dentre eles Poswillo et al. (1973) postularam que uma hemorragia focal no 33º dia do desenvolvimento embrionário da artéria estapediana, que supre o primeiro e segundo arcos faríngeos, provocaria um fenômeno disruptivo vascular e assim, as malformações.

Depois deles, outros autores associaram o quadro, à exposição de isotretinoína e talidomida (Lammer et al., 1985).

Stewart et al., em 1993 hipotetizaram tratar-se de uma displasia do eixo mesodérmico embrionário, quando associada a anomalias cardíacas.

Os mecanismos fisiopatológicos que levam ao OAVS, são alterações do desenvolvimento de estruturas derivadas do primeiro e segundo arcos faríngeos.

Pouco se conhece ainda, quanto à sinalização das vias, para a formação das estruturas faciais no desenvolvimento embrionário. Sabe-se até o momento, que a chave para o desenvolvimento craniofacial é a especificidade, migração e proliferação das células da crista cranial neural. Assim, qualquer interrupção no mecanismo de sinalização dessas células ou na expressão e ativação de genes teria como consequência a alteração na produção de proteínas, que participam da formação craniofacial, podendo explicar a variabilidade fenotípica observada no OAVS (Minoux et al., 2010; Szabo-Rogers et al., 2010).

Os mecanismos genéticos que produzem a localização normal das estruturas corporais ainda não são totalmente conhecidos, porém sabe-se que a formação normal da lateralidade do coração e de outros órgãos é controlada pela expressão de genes que participam da via Nodal, em períodos específicos do desenvolvimento embrionário. Esta família de genes, participa ativamente do início da formação do mesoderma e, portanto, do disco embrionário trilaminar. No tópico “genes candidatos para OAVS”, discutiremos mais sobre estes genes. A expressão assimétrica dos genes que participam da cascata da via Nodal, durante o desenvolvimento das estruturas do primeiro arco faríngeo, pode assim ocasionar assimetria facial (Nicot et al., 2014). A assimetria facial resulta do crescimento desigual da mandíbula e músculos onde os genes da via Nodal estão ativos, sendo, portanto, responsáveis pela assimetria facial.

Muitos estudos foram bem-sucedidos em identificar a causa genética da microtia sindrômica. No entanto, esses achados não são replicados para a microtia isolada ou OAVS, permanecendo assim sem definição.

A maioria dos casos de OAVS é esporádica, mas existem casos familiares raros (1% -2%), que exibem herança autossômica dominante e recessiva (Vendramini-Pittoli et al., 2009; Farra et al., 2011; Brun et al., 2012; Luquetti et al., 2012; Barisic et al., 2014). A raridade de relatos de concordância em gêmeos monozigóticos, no entanto, apoia a probabilidade de herança multifatorial na maioria dos casos (Hennekam et al., 2010).

O risco empírico de recorrência do espectro OAV para parentes de primeiro grau é de 2 a 3% (Barasic et al., 2014).

3.1.4.1 Fatores de Risco

Influências ambientais tais como: diabetes materno, o uso de drogas vasoativas durante a gravidez, sangramento de segundo trimestre, gestações múltiplas e uso de técnicas de reprodução assistida, sugerem a participação de fatores não genéticos na etiologia do OAVS (Werler et al., 2004; Wieczorek et al., 2007; Ballesta-Martínez et al., 2013).

As gestações gemelares têm aumentado ao longo dos anos, pelo uso de técnicas de reprodução assistida, e ambas são consistentemente associadas com malformações, incluindo o espectro OAV, em muitas publicações atuais (Jongbloet, 1987, Ferraris et al., 1999; Roesch et al., 2001; Pison, D 'Addato, 2006; Gittins et al., 2010).

Jongbloet (1987) atribuiu a associação de casos de OAVS com FIV (fertilização “in vitro”), ao que chamou de “ovopatia da superabundância”, ou seja, a estimulação da ovulação através de gonadotrofinas administradas, atingiria os oócitos em diferentes estados de maturação e assim, os que fossem ovulados fora do intervalo ótimo, seriam mais susceptíveis às alterações do desenvolvimento craniofacial, o que também explicaria a associação de casos de OAVS com infertilidade.

Keusch et al. (1991) referiram vários estudos com incremento das anomalias craniofaciais em gêmeos. Em um grupo de 1114 pacientes com anomalias craniofaciais, 35 gêmeos foram descritos, sendo 10 com microssomia hemifacial.

Wieczorek et al. (2007) encontraram uma correlação positiva significativa entre casos de OAVS e métodos de reprodução assistida em estudo retrospectivo (pais de crianças com OAVS que usaram técnicas de reprodução assistida) ($P = 0.038$) e prospectivo (crianças com OAVS, cujos pais conceberam por técnicas de reprodução assistida) ($P = 0.023$), além de um excesso de gêmeos naturalmente concebidos entre os casos de OAVS ($P = 0.0025$) para os dados estatísticos da população alemã. Estes autores lembram que a primeira alteração congênita descrita num estudo em 36 casos de reprodução assistida realizado por Yovich et al., em 1985, foi um caso de OAVS e fazem um levantamento de outras 35 publicações num total de 80 gestações gemelares, onde esta correlação entre gemelaridade natural ou “induzida” e OAVS é apontada. Em quase todos os casos, sejam monozigóticos ou dizigóticos, somente um gêmeo é afetado.

Wieczorek et al (2007) referem vários estudos de gemelaridade com a Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BW), associados à hipometilação do alelo materno do gene *LIT1/KCNQ1OT1* (DeBaun et al. 2003; Maher et al. 2003; Gicquel et al. 2003; Halliday, 2004; Sutcliffe et al. 2006) e inferem a existência de uma correlação deste mecanismo encontrado no BW, entre o OAVS e o gene *BAPX1*, que apresenta evidências de desregulação epigenética em casos de OAVS (Fisher, 2006). Os autores levantam 3 hipóteses para explicar a associação de gemelaridade com OAVS:

1 - Gemelaridade induzindo fenômenos vasculares disruptivos - localizados no polo cefálico, como postulado por Poswillo et al. (1973); ou por reabsorção de um dos membros do par de gêmeos monozigóticos, que levaria a uma hipercoagulabilidade no gêmeo sobrevivente, como postulado por Hoyme et al. (1981) ou por formação de anastomoses inter ou intraplacentarias, que favoreceriam fenômenos tromboembólicos. No entanto, este mecanismo disruptivo não explicaria, por exemplo o dermóide epibulbar.

2 - OAVS induzindo a gemelaridade – levando em consideração a hipótese de que um mecanismo epigenético semelhante ao da síndrome de BW aconteça com no OAVS. É possível que um grupo de células carregando um *imprinting* pós-zigótico alterasse a taxa de seu crescimento celular, gerando assimetria entre diferentes massas celulares e isto induzisse a separação dos diferentes clones celulares, epigeneticamente distintos. Outra hipótese seria de que um dos blastocistos discordantes devido as mudanças epigenéticas, reconheceria o outro como estranho, usando mecanismos de autoreconhecimento celular para a separação das massas celulares.

3 – OAVS e gemelaridade tendo uma causa comum – Sendo a gemelaridade monozigótica um “erro” do desenvolvimento precoce, Hall (2003) sugere que a fertilização de um ovo “velho” leve a uma fratura da zona pelúcida, dividindo o blastocisto em dois. Além disto, o citoplasma deste “ovo velho” poderia não ser suficiente para o aporte nutricional, causando um atraso ou erro na programação de desenvolvimento. Estes erros foram demonstrados em anfíbios e são: duplicações axiais principalmente no polo cefálico, deficiências na organogênese (acro e microcefalia), polimelia e polidactilia e falha na diferenciação de vários sistemas e órgãos (Blandau, 1954).

De fato, Barisic et al. (2014) encontraram uma associação cinco vezes maior de nascimentos múltiplos, entre os pacientes com OAVS, do que na população controle e discutiram a associação de técnicas de reprodução assistida com idade materna avançada e com dificuldades reprodutivas, nestes casos.

Outro fator já consistentemente associado com o espectro, é o uso de agentes vasoativos, que estariam relacionados à hipótese da patogênese disruptiva nesta condição. Acredita-se que um distúrbio vascular no suprimento da crista neural, deva ser responsável pela origem do quadro, interferindo no desenvolvimento dos arcos faríngeos (Poswillo et al., 1973). A droga deste grupo mais claramente associada com OAVS é a pseudoefedrina. Outras drogas como o ácido retinoico também já estão bem estabelecidos com malformações craniofaciais e de orelha. Manifestações graves no OAVS, também foram encontradas em fetos expostos à cocaína (Lessick et al., 1991).

Em um estudo epidemiológico de 239 pacientes e 854 controles, fatores como: baixo peso ao nascer, baixa renda familiar, mãe com baixo índice de massa corporal e etnia indígena ou latino-americana, foram estabelecidos como fatores de risco (Werler et al., 2004).

3.1.4.2 Alterações citogenômicas

Na literatura, a predisposição genética para o espectro tem ganhado ênfase. A herança mendeliana foi observada pela análise de segregação em famílias com OAVS (Kaye et al., 1992; Tasse et al., 2007; Goodin et al., 2009). Recentemente, Rooryck et al. (2009) e Beleza-Meireles et al. (2015) identificaram nas coortes estudadas 12% e 31% de casos familiares, respectivamente. Contudo, devemos considerar a herança mendeliana para casos familiares e a herança poligênica ou multifatorial para os casos esporádicos.

Com o advento da citogenética clássica e molecular, diferentes regiões cromossômicas foram identificadas como sendo candidatas para a etiologia da doença em pacientes OAVS (Rooryck et al., 2009; Rooryck et al., 2010; Brun et al., 2012; Ballesta-Martínez et al., 2013; Gimelli et al., 2013; Beleza-Meireles et al., 2014; Zielinski et al., 2014; Beleza-Meireles et al., 2015; Guida et al., 2015).

Alterações cromossômicas das mais diversas, foram descritas: trissomias em mosaico dos cromossomos 7, 8, 9, 10p, 22 (Miller et al., 2001; Ravel et al., 2001; Dabir, Morrison, 2006); deleções em 1p22, 2p31.1, 5p14, 12p13.33, 18p, 22q11 (Derbent et al., 2003; Ala-Mello et al., 2008; Callier et al., 2008; Xu et al., 2008; Digilio et al., 2009; Lafay-Cousin et al., 2009; Rooryck et al., 2009); inversão do cromossomo 14(p11.2q22.3) (Northup et al., 2010); duplicação 14q23.1 (Ballesta-Martínez et al., 2013; Zielinski et al., 2014); duplicação 22q (Quintero-Rivera, Martinez-Agosto, 2013); translocação(5;8)(p15.31;p23.1) (Josifova et al., 2004); translocação (11;22)(q23;q11) (Balci et al., 2006) e aneuploidia do cromossomo X (Poonawalla et al., 1980; Garavelli et al., 1999; Rao et al., 2005). A maioria destas alterações cromossômicas são paciente-específicas, porém algumas foram recorrentes, como as deleções em 5p15 (Ladekarl, 1968; Josifova et al., 2004; Descartes, 2006; Ala-Mello et al., 2008), as deleções em 12p13.33 (Rooryck et al., 2009; Abdelmoity et al., 2011), as duplicações em 14q23.1 (Ou et al., 2008; Ballesta-Martinez et al., 2013), a trissomia em mosaico do cromossomo 9 (Wilson & Barr, 1983; de Ravel et al., 2001), alterações no cromossomo 22 (Herman et al., 1988; Kobrynski et al., 1993; Pridjian et al., 1995; Hathout et al., 1998; Derbent et al., 2003; Balci et al., 2006; Jackson et al., 2007; Xu et al., 2008; Digilio et al., 2009; Lafay-Cousin et al., 2009; Rosa et al., 2010; Tan et al., 2011; Quintero-Rivera, Martinez-Agosto, 2013; Torti et al., 2013; dos Santos et al., 2014; Beleza-Meireles et al., 2015; Colovati et al., 2016) e aneuploidias do cromossomo X (Poonawalla et al., 1980; Garavelli et al., 1999; Rao et al., 2005) que estão implicadas a uma série de casos (Huang et al., 2010).

Microdeleções ou microduplicações, que são variações no número de cópias (CNV, do inglês *copy number variation*) do genoma e envolvem segmentos de DNA maiores que 1 kb, são frequentes na população e neutras quanto à função, não resultando necessariamente em alterações fenotípicas. Algumas delas conferem diferenças no fenótipo, ao alterarem o número de cópias de genes sensíveis à dose, ou romperem genes, ou criarem genes quiméricos ou ainda, alterarem a regulação da transcrição gênica. Portanto, essas alterações no número de cópias podem ser benignas ou patogênicas dependendo da relação com as doenças humanas (Low et al., 2016; Mlynarski et al., 2016).

Rooryck et al. (2010) analisaram 86 pacientes com OAVS através de *array-CGH* e como resultado obtiveram anormalidades cromossômicas não recorrentes (4

deleções e 8 duplicações, de 2,7 kb a 2,3 Mb) em 11 pacientes com características adicionais ao quadro clínico, como anomalias congênitas múltiplas e /ou atraso no desenvolvimento. Assim, sustenta-se a hipótese de que a heterogeneidade genética existe nesta doença, e que diferentes causas patogênicas podem concorrer, incluindo mecanismos singulares como a herança epigenética.

Anteriormente, um grupo de pacientes apresentando sobreposição clínica com OAVS havia sido descrito, mostrando mutações em *SALL1* (16q12.1) ou *TCOF1* (5q32-q33), os genes responsáveis pela síndrome de Townes-Brocks (Keegan et al., 2001) e síndrome de Treacher Collins (Su et al., 2007) respectivamente e que também estão relacionados com alterações dos primeiro e segundo arcos faríngeos.

Kosaki et al. (2007) estudaram uma paciente com fenótipo compatível com a Síndrome de Goldenhar e identificaram a mutação L419X do gene *SALL1*.

Posteriormente, Goodin et al. (2009) analisaram os genes *EYA1* (8q13.3) e *SALL1* em três famílias com espectro OAVS e com herança autossômica dominante e obtiveram resultados normais. Os autores referem que estas famílias são fenotipicamente diferentes das síndromes com características clínicas similares, como a síndrome BOR e a síndrome Townes-Brocks, causadas por mutações nos dois genes pesquisados, respectivamente.

Huang et al (2010) conduziram um estudo genético em três gerações de uma família, sendo cinco pacientes com OAVS. Os estudos citogenéticos e pesquisa das mutações nos genes *SALL1* e *TCOF1* resultaram normais. A análise do número de cópias não revelou uma causa genômica para esta doença, mas sugeriu que esta pode ser induzida por pequenas CNVs.

Muitos estudos moleculares foram conduzidos, envolvendo regiões associadas com OAVS (Keegan et al., 2001; Fischer et al., 2006; Xu, Fan, Siu, 2008; Digilio et al., 2009; Rooryck et al., 2009 e 2010; Huang et al., 2010; Tan et al., 2010 e 2011; Brun et al., 2012; Ballesta-Martinez et al., 2013; Gimelli et al., 2013; Zielinski et al., 2014; Beleza-Meireles et al., 2014 e 2015; Guida et al., 2015), mas, até então, um gene específico não havia sido definido para o espectro. O uso sistemático de técnicas citogenômicas e estudos moleculares em tais pacientes, têm identificado regiões com variações no genoma e, portanto, genes potencialmente envolvidos na etiologia da doença. Recentemente, Lopez et al. (2016) publicaram um artigo em que descrevem

uma mutação no gene *MYT1* (20p13.33), como provável causa rara em pacientes com OAVS.

3.1.4.2.1 Cromossomo 5

O primeiro paciente apresentando, concomitantemente, características da síndrome de Goldenhar e da síndrome de *cri-du-chat*, associada à deleção 5p, foi relatado em 1968, por Laderkarl. Posteriormente, Neu et al. (1982) e Choong et al. (2003) relataram novos pacientes com a mesma associação.

A associação do fenótipo Goldenhar a uma translocação aparentemente equilibrada (5p;8p) foi relatada em dois irmãos. A translocação de origem paterna, t(5;8)(p15.31;p23.1)pat, resultou em monossomia da região 5p15.31-pter e trissomia da região 8p23.2-pter (Josifova et al, 2004). O sexto caso de deleção 5p15.33-pter e fenótipo OAVS foi descrito por Descartes, em 2006.

Ala-Mello et al. (2008) descreveram uma paciente com características da síndrome de Goldenhar e um rearranjo complexo 45,XX,inv(2)(q32q37)mat, dic(5;21)(p15.3;q22.3) “de novo”, que resultou em uma deleção terminal 5p, uma deleção terminal 21q e uma duplicação 21q22.11-q22.12, analisados por FISH e cariotipagem molecular.

Com a utilização do SNP *array*, Huang et al. (2010), encontraram uma deleção de 1Mb em 5q13.2, contendo 17 genes, incluindo *BIR1C* e *OCN*, que estão envolvidos na apoptose e cuja haploinsuficiência pode ter contribuído para o fenótipo OAVS da paciente estudada. Esses achados reforçam a importância dessa região genômica nos casos de GS/OAVS.

3.1.4.2.2 Cromossomo 14

Estudos genéticos de ligação em uma família, sugeriram um *locus* em 14q32 para o OAVS. Este *locus* inclui o gene *GSC*, um candidato para a microsomia hemifacial, porém nenhuma mutação neste gene foi encontrada nos pacientes dessa família com microsomia hemifacial de herança autossômica dominante (Kelberman et al., 2001). Acredita-se que *GSC* atue como ativador transcripcional necessário para o desenvolvimento craniofacial (Shao et al., 2016).

Um paciente com síndrome branquiotorenal (BOR) e características do espectro OAV e seu pai, que possuía algumas alterações fenotípicas e deficiência intelectual, foram analisados por técnica de *array*, que revelou uma duplicação em 14q22.3-q23.3 e deleção da sequência 13q21.31-q21.32 paterna. Os autores, Ou et al. (2008) sugeriram que o aumento nas dosagens dos genes *SIX1*, *SIX6* ou *OTX2* poderiam ser responsáveis pelas características BOR e OAVS-like nesta família.

Northup et al. (2010) identificaram uma inversão pericêntrica no cromossomo 14, inv(14)(p11.2q22.3), em uma paciente com OAVS. Esta havia sido herdada da mãe fenotipicamente normal. Com base nos estudos de ligação, mapeando 14q em casos OAVS, os autores propõem que o ponto de quebra na região 14q da paciente em questão causou a rutura de um gene candidato para OAVS resultando em seu fenótipo clínico.

3.1.4.2.3 Cromossomo 4

Um paciente com OAVS e uma alteração cromossômica por translocação envolvendo os cromossomos 4 e 8, t(4;8)(p15.3;q24.1), foi previamente relatado por Lüdecke et al. (1999). Fischer et al. (2006) mostraram que o ponto de quebra nessa translocação estava 76,4 kb distal ao gene *BAPX1*, mapeado no cromossomo 4. Os autores sequenciaram esse gene em 105 pacientes com fenótipo OAVS, mas nenhuma mutação foi encontrada, porém a análise quantitativa da expressão alélica do gene nos fibroblastos de 12 desses pacientes, revelou expressão anormal do gene *BAPX1* em cinco deles, tendo sido sugerido que uma desregulação epigenética desse gene seria um possível mecanismo patogênico para a doença.

3.1.4.2.4 Cromossomo 22

O fenótipo OAVS foi associado às alterações do cromossomo 22, por Antle et al. (1990), Kobrynski et al. (1993), Biesecker et al. (1995) e Balci et al. (2006), que estudaram pacientes com trissomia completa, parcial e rearranjos cromossômicos do cromossomo 22. Também foi observada, a trissomia do cromossomo 22 em mosaico (Pridjian et al., 1995; De Ravel et al., 2001).

A alta frequência de alterações envolvendo o cromossomo 22 no OAVS tem sugerido que a região genômica 22q11 esteja relacionada à etiologia da síndrome. Esta região é vulnerável a múltiplos rearranjos por ser flanqueada por *low copy repeats* (LCR), também conhecidas como duplicações segmentais (Shaikh et al., 2000; Stankiewicz e Lupski, 2002) e que podem causar instabilidade genômica, predispondo a CNVs e resultando em deleções ou duplicações do segmento genômico nesse *locus*, com consequente aumento ou diminuição da dosagem gênica (Shaikh et al., 2001; Stankiewicz e Lupski, 2010).

A síndrome *cat-eye* e as síndromes de microdeleção/microduplicação 22q11 estão associadas a rearranjos nesta região. Em 1998, Hathout et al. relataram a síndrome da duplicação 22q11 associada com fenótipo OAVS. Rosa et al. (2010) verificaram em um dos pacientes de sua amostra de pacientes com OAVS, um cromossomo marcador adicional semelhante a um dicêntrico do 22, sendo o primeiro caso na literatura sugestivo da associação da síndrome de Goldenhar com a síndrome *cat-eye*, causada pela tetrassomia parcial 22q11. Outros dois casos de pacientes apresentando fenótipo do OAVS, síndrome *cat-eye* e duplicação da região 22q11.1q11.21 foram relatados na literatura e confirmados por *array* genômico (Quintero-Rivera & Martinez-Agosto, 2013; Torti et al., 2013).

Em recente estudo, Beleza-Meireles et al (2015) encontraram CNVs da região 22q11 em 10 dos 22 casos estudados com OAVS e não excluem o potencial patogênico das CNVs polimórficas em pacientes OAVS, mesmo que alguns segmentos dessa região estejam duplicados ou deletados na população normal, pela alta prevalência dessa variante em sua amostra quando comparada com a frequência reportada no DGV.

Vários pacientes com características clínicas do OAVS apresentam diagnóstico clínico da síndrome de DiGeorge/velo-cardio-facial e/ou síndrome da microdeleção 22q11.2, incluindo anormalidades de orelha com apêndices pré-auriculares (Ryan et al., 1997; McDonald-McGinn et al., 1999), perda auditiva (Ryan et al., 1997; Digilio et al., 2009), malformações vertebrais cervicais (Ming et al., 1997), defeitos cardíacos conotruncais (Digilio et al., 2005; Torti et al., 2013; dos Santos et al., 2014), malformações renais (Devriendt et al., 1996), dificuldades respiratórias e de deglutição (Ryan et al., 1997; Eicher et al., 2000). Microtia com atresia aural (Derbent et al., 2003) ou microftalmia com assimetria facial também foram descritas esporadicamente

(Beemer et al., 1986). Todos estes quadros clínicos apresentam características comuns e fazem parte do diagnóstico diferencial do OAVS.

As hipóteses para uma patogênese comum destes quadros são defendidas por diferentes autores:

- A migração anormal de células da crista neural (Lammer et al., 1985; Lammer & Opitz, 1986; Van Mierop & Kutsche, 1986; Kirby & Waldo, 1990);
- A ocorrência de uma anomalia de desenvolvimento precoce na vascularização embrionária (Shprintzen, 2005);
- A interrupção da interação de elementos regulatórios próximos ao *loci* 22q11 deletado tendo efeito na reorganização da cromatina, comprometendo a expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e contribuindo para a variabilidade fenotípica da doença (Zeit et al., 2013).

Apesar dos diversos relatos de fenótipo da síndrome de Goldenhar/OAVS com deleção distal 22q11 (Jackson et al., 2007; Xu et al., 2008; Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011; Torti et al., 2013; dos Santos et al., 2014; Colovati et al., 2016), não se explicariam os múltiplos casos de microdeleção envolvendo a região 22q11.2 distal, mas sem o fenótipo OAVS. As possibilidades apontadas por Tan et al., em 2011 foram:

- O aparecimento de uma mutação recessiva oculta no alelo não deletado;
- Modificações epigenéticas;
- Alelos modificadores na banda cromossômica 22q11.2;
- Fatores ambientais

3.1.4.5 Genes candidatos para OAVS

Uma vez que se sabe que a fisiopatologia da síndrome está ligada ao desenvolvimento dos arcos faríngeos, alterações em genes “alvo” e reguladores transcricionais, que podem alterar a programação genética no desenvolvimento destas estruturas, devem ser investigadas, para compreendermos melhor a interação e ação desses genes no fenótipo OAVS.

Os arcos faríngeos começam a se desenvolver no início da quarta semana de gestação, quando as células da crista neural dos rombômeros do rombencéfalo migram para a região da futura cabeça e pescoço. Apesar de sua origem neuroectodérmica, as células da crista neural são primordiais para a formação do

mesênquima da cabeça e pescoço. Ao final da quarta semana, 4 pares de arcos faríngeos, numerados em sequência cefalo-caudal, são visíveis e separados uns dos outros por fendas ou sulcos faríngeos. O primeiro arco faríngeo ou mandibular forma a saliência maxilar que origina a maxila, o osso zigomático e o osso temporal e a saliência mandibular que forma a mandíbula, o martelo, a bigorna, ligamento anterior do martelo e ligamento esfenomandibular. Os arcos faríngeos são constituídos, a princípio, por um eixo de mesênquima e da ectoderme. Esta mesênquima provém das células da crista neural, que migraram e sua diferenciação em mesênquima (transformação epiteliomesenquimal) é regulada por genes *homeobox* e fatores sinalizadores (*SHH* em 7q36.3, *DLX5* e *DLX6* em 7q21.3, *FOXD3* em 1p31.3, *SNAIL3* em 8q11.2, *SOX9* em 17q24.3 e *SOX10* em 22q13, *Ednra* em 4q31.22, efrinas, vias de sinalização *Notch*, proteínas WNT e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) entre outros). Cada arco é composto por células que originarão componentes vasculares, musculares, esqueléticos e nervosos, que formarão a cabeça e o pescoço (Carlson, 2014; Moore, Persaud, 2016).

Mais de 511 genes ligados a alterações na morfologia craniofacial são conhecidos hoje (Brunskill et al., 2015).

Diferenças estatisticamente significantes na expressão de genes envolvidos na via Nodal (via de sinalização *Notch*) foram demonstradas por Nicot et al. (2014). Estes genes são determinantes no desenvolvimento do aparato faríngeo: *NOMO1*, *NOMO2*, *NOMO3* (16p) (moduladores da via), *ACTR1A* (10q12), *ACTR2* (2p14) (ativador *downstream* da sinalização da via na organogênese), *SMAD2* (18q12), *SMAD3* (15q22), *SMAD4* (18q12), *USP9X* (Xp11) (mediadores positivos intracelulares da via) e *PPM1A* (14q23) (mediador intracelular negativo da via). O gene *PITX2* (4q25), que está envolvido na via de sinalização da determinação direita-esquerda durante a embriogênese, também é importante para o adequado desenvolvimento craniofacial (Nicot et al., 2014).

Alasti et al. (2008) observaram mutações na região codificante de *HOXA2* (7p15) em pacientes com fenótipo de microtia. Novos achados em modelos animais corroboram esta observação (Minoux et al., 2013), como a anotia em ratos *knockout* para *Hoxa2*. O gene *HOXA2* codifica um fator de transcrição expresso no mesênquima do segundo arco faríngeo e é considerado o regulador chave do desenvolvimento desta estrutura. Além disso, o gene *Hoxa2* contribui e mantém a

expressão, no segundo arco faríngeo, do GSC (14q32.13), um gene homeobox do complexo regulatório da diferenciação de segmentos do plano corpóreo dos invertebrados (Grammatopoulos et al., 2000; Copf et al., 2006). As mutações que alteram a expressão de *Hoxa2* no mesênquima do segundo arco faríngeo podem resultar tanto em microtia como em apêndices pré-auriculares (Minoux et al., 2013), achados comuns no OAVS.

A identificação de variantes do *locus* 4p15.32-4p16.2 associadas à susceptibilidade para microtia bilateral isolada demonstrou 38 variantes das regiões codificantes dos genes *EVC* (4p16.2), envolvido no desenvolvimento da cartilagem e dos genes *NKX3-2* (4p15.33) e *HMX1* (4p16.1), envolvidos na regulação da expressão de genes, que direcionam a formação de estruturas faciais na embriogênese (Li et al., 2014).

Estudos em camundongos demonstraram que os genes *Bmp4*, *Bmp5* e *Tsg* são importantes para a proliferação e diferenciação celular na cartilagem auricular, porém não são específicos (Minoux et al., 2013). Quando rompidos, desencadearam o fenótipo de microtia, como nas síndromes LAMM (do inglês, *deafness with labyrinthine aplasia, microtia, and microdontia*), Miller, BOF (do inglês, *Branchiooculofacial*), CHARGE (do inglês, *Coloboma, Heart Anomaly, Choanal Atresia, Retardation, Genital And Ear Anomalies*) e síndrome de Treacher-Collins.

O gene *SALL1*(16q12) e seu produto interagem com outros genes *SIX1* (14q23.1), *SIX5* (19q13.3) e *EYA1* (8q13.3) e seus produtos na síndrome braquiotorenal. Em camundongos, estes genes atuam no desenvolvimento craniofacial como reguladores *upstream* do *FGF8* (10q24.32), onde ocorre a sinalização para a secreção dos fatores de crescimento, durante a migração das células da crista neural (Guo et al., 2011).

Recentemente, mutações no gene *MYT1* (20q13.33) foram propostas como responsáveis pela síndrome de Goldenhar (Lopez et al., 2016). Este gene foi descrito em 2007 por Wang como codificador do fator 1 de transcrição da mielina, altamente expresso em tecidos de desenvolvimento neural e no pâncreas. Lopez et al. (2016) demonstraram que a superexpressão do gene *MYT1* causa uma redução da regulação da via de metabolismo do ácido retinoico.

Técnicas moleculares mais recentes permitiram a identificação de regiões com genes candidatos como: 12p13.33, incluindo o gene *WNT5B*, duplicações

14q22.3, incluindo o gene *OTX2* e diferentes alterações no cromossomo 22, principalmente deleções e duplicações 22q11.2, incluindo os genes *YPEL1* e *ERK2* (Rooryck et al., 2009; Abdelmoity et al., 2011; Zielinski et al., 2014).

A hipótese de que a região 22q11 contenha genes importantes para o desenvolvimento craniofacial é reforçada pelos muitos relatos de pacientes com OAVS com alta frequência de CNVs mais raras (duplicação ou deleção) nessa região, que poderiam alterar o número de cópias de genes sensíveis à dose ou por efeito de posição (Beleza-Meireles et al., 2015).

A diferenciação dos arcos faríngeos, incluindo o precursor do tecido da orelha, é controlada pelo desenvolvimento de células da crista neural (Carlson, 2014; Moore, Persaud, 2016) e por alguns genes localizados no interior da 'região crítica' 22q11.2, incluindo *TBX1* e *UFD1L*, que são especificamente expressos durante a embriogênese na orelha primordial (Pizzuti et al., 1997; Yamagishi et al., 1999; Vitelli et al., 2003; Raft et al., 2004). Quando o *TBX1* está deletado, pode ocorrer alteração da orelha média com pavilhão malformado, ausência da cóclea ou do sistema vestibular (Vitelli et al, 2003; Raft et al, 2004). A haploinsuficiência de *TBX1* também pode causar malformação da coluna vertebral (Chapman et al, 1996; Ming et al, 1997).

Newbern et al. (2008), mostraram que a expressão de *ERK2* ou *MAPK1* (22q11.2) estava reduzida em linhagens celulares derivadas de pacientes com microdeleção distal 22q11. Em ratos, a inativação ou deleção de *ERK2* resultou em defeitos craniofaciais, como maxilar curto, mandíbula hipoplásica e fenda palatina, além de presença variável de defeitos cardiovasculares. Parada et al. (2015) postularam que a ruptura da sinalização ERK/MAPK interrompe a migração das células da crista neural na região craniofacial.

Em 2009, Lafay-Cousin et al. diagnosticaram uma criança com fenótipo da síndrome de Goldenhar, que desenvolveu um tumor rabdóide teratóide atípico no cérebro. Este tumor se manifestou, porque o paciente apresentava uma deleção distal de 2,7 Mb, na região cromossômica 22q11.2, que incluía o gene supressor tumoral *INI1/SMARCB1*. Esta região era mais proximal e parcialmente sobreposta à região deletada para DG/VCFS e à deleção encontrada no paciente de Xu et al (2008).

Tan et al (2011) descreveram cinco pacientes com alterações no número de cópias afetando a região distal do cromossomo 22q11.2. Eles incluíram novas alterações fenotípicas associadas à síndrome de microdeleção ou microduplicação

22q11.2 distal. No grupo estudado, incluem o terceiro paciente com microdeleção 22q11.2 distal *de novo*, de aproximadamente 3.2 Mb das LCR22-4 a LCR22-2, e síndrome de Goldenhar, incluindo os genes *YPEL1*, *ERK2*, *PRAME*, *TOP38*, *BRC* e *INI1*.

Na região distal de 22q11.2, temos o gene *YPEL1*, que é expresso nos arcos faríngeos e, em modelos *zebrafish knockout* para este gene, apresentaram grandes defeitos na cartilagem craniofacial (Aerts et al., 2006). Posteriormente, em 2015, Tan et al. demonstraram em modelos de aves, que a expressão de *YPEL1* é regulada pela sinalização de proteínas ósseas morfogenéticas e postularam um papel para esse gene na patogênese das alterações craniofaciais observadas em humanos com deleções ou duplicações distais da região cromossômica 22q11.2.

A região mínima de sobreposição entre os pacientes de Xu et al. (2008), Lafay-Cousin et al. (2009) e Tan et al. (2011) contém 16 genes, incluindo os genes *ERK2/MAPK1* e *YPEL1*.

O gene *Crkl*, localizado em 22q11, tem sido relacionado aos eventos de sinalização no desenvolvimento dos arcos faríngeos, podendo ser um candidato para os distúrbios craniofaciais. Miller et al (2014) demonstraram que a deleção de *Crkl* em camundongos mutantes, altera duas importantes vias de sinalizações na migração e diferenciação das células da crista neural durante a embriogênese dos 1° e 2° arcos faríngeos.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. 1 Pacientes estudados

Os pacientes desta casuística foram selecionados a partir banco de dados de pacientes do Centro de Genética Médica da UNIFESP, construído desde a criação do Centro, em 1995 e encaminhados por diferentes serviços ambulatoriais, incluindo o Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP. Apenas um paciente abandonou o estudo por não querer continuar a pesquisa molecular.

4.1.1 Critérios de inclusão

Apresentar, pelo menos, microsomia hemifacial com microtia, e/ou apêndices e/ou fossetas pré-auriculares unilaterais ou bilaterais de forma assimétrica. Estes critérios foram definidos, por serem preponderantes nos diferentes trabalhos da literatura.

4.1.2 Critérios de exclusão

- a. Pacientes que apresentam comprometimento auricular bilateral simétrico;
- b. Pacientes com comprometimento de sistema esquelético, exceto costelas e vértebras
- c. Pacientes com diagnóstico de síndromes cromossômicas por cariótipo com bandas G;

Estes critérios foram definidos, na tentativa de diminuir a contaminação da amostra por outras síndromes com características comuns com critérios clínicos ou etiológicos já bem definidos.

Após o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UNIFESP-EPM - CEP 66348 (Anexo 2), foi aplicado o protocolo clínico preparado para este estudo (Anexo 3).

Todos os pacientes foram fotografados e foram solicitados exames complementares, na busca das principais alterações associadas: radiografias (RX) de crânio e coluna, audiometria e imitanciometria, avaliação oftalmológica e

otorrinolaringológica, tomografia de ossos temporais, ecocardiograma e ultrassonografia (US) renal.

4.1. 3 Fluxograma (vide anexo 4)

4. 2 Métodos

4. 2.1 Estudo citogenético e molecular

Os pacientes foram estudados por meio de técnicas de citogenética clássica e molecular.

Essas metodologias foram realizadas no Laboratório de Genética “Heleneide Resende de Souza Nazareth” da Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP, pela doutora Mileny Esbravatti Stephano Colovati.

4. 2.2 Coleta de material

Foi coletado sangue periférico dos indivíduos em estudo, em dois diferentes frascos: um contendo Lique mine®, para a realização do estudo citogenético e um contendo EDTA para a extração de DNA.

4. 2.3 Estudo citogenético

4. 2.3.1 Cultura de linfócitos do sangue periférico

As culturas de linfócitos foram realizadas, segundo modificação da técnica de Moorhead et al. (1960) e o bandamento G realizado segundo modificação da técnica descrita por Sanchez et al. (1973). De cada indivíduo foram analisadas 20 metáfases sob bandamento G, com resolução de 400 a 550 bandas cromossômicas, sendo estas capturadas pelo Sistema de Imagem de Cariótipo *Ikaros Metasystem®* para documentação.

4. 2.4 Estudo molecular

4. 2.4.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído segundo as instruções do fabricante, utilizando o *Gentra Puregene kit* (Qiagen-Sciences, Maryland, USA), sendo a qualidade e concentração do DNA determinadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Technologies).

4. 2.4.2 Técnica de *array*

A técnica de *array* genômico foi realizada seguindo protocolo *Affymetrix Genome-Wide Human SNP array kit*, com resolução SNP Array 6.0, SNP Array 750K ou SNP Array HD (Affymetrix Inc.®, Santa Clara, CA, USA).

Os procedimentos foram realizados em colaboração com o laboratório do *Core Facility* da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP), de acordo com as instruções presentes nos protocolos do fabricante (http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/cyto_assay_usermanual.pdf) e os dados analisados, utilizando-se *software Affymetrix® Chromosome Analysis Suite* (ChAS).

4. 2.4.2.1 Critério de análise do array genômico

Os dados obtidos das variações no número de cópias (CNVs) foram analisados com uma resolução de 200 kb para ganhos e 150 kb para perdas cromossômicas, com no mínimo 25 marcadores. O genoma de referência utilizado foi o *Genome Reference Consortium GRCh37* de Fevereiro de 2009 (GRCh37/hg19). A correlação dos resultados citogenômicos obtidos com o fenótipo dos pacientes foi realizada de acordo com os dados de bases disponíveis na internet, como:

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

PUBMED – *National Library of Medicine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

OMIM - *Online Mendelian Inheritance in Man* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>),
USCS - *University of California Santa Cruz Genome Browser and Database* (<http://genome.ucsc.edu>),

DGV - *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>),

DECIPHER – *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (<http://decipher.sanger.ac.uk>).

BANCO DE CNVs UNIFESP- Registro de dados formado de amostras de pacientes normais brasileiros utilizado em diferentes estudos da UNIFESP.

O fluxograma abaixo demonstra os critérios utilizados para a classificação da CNV em benigna, patogênica ou provavelmente patogênica.

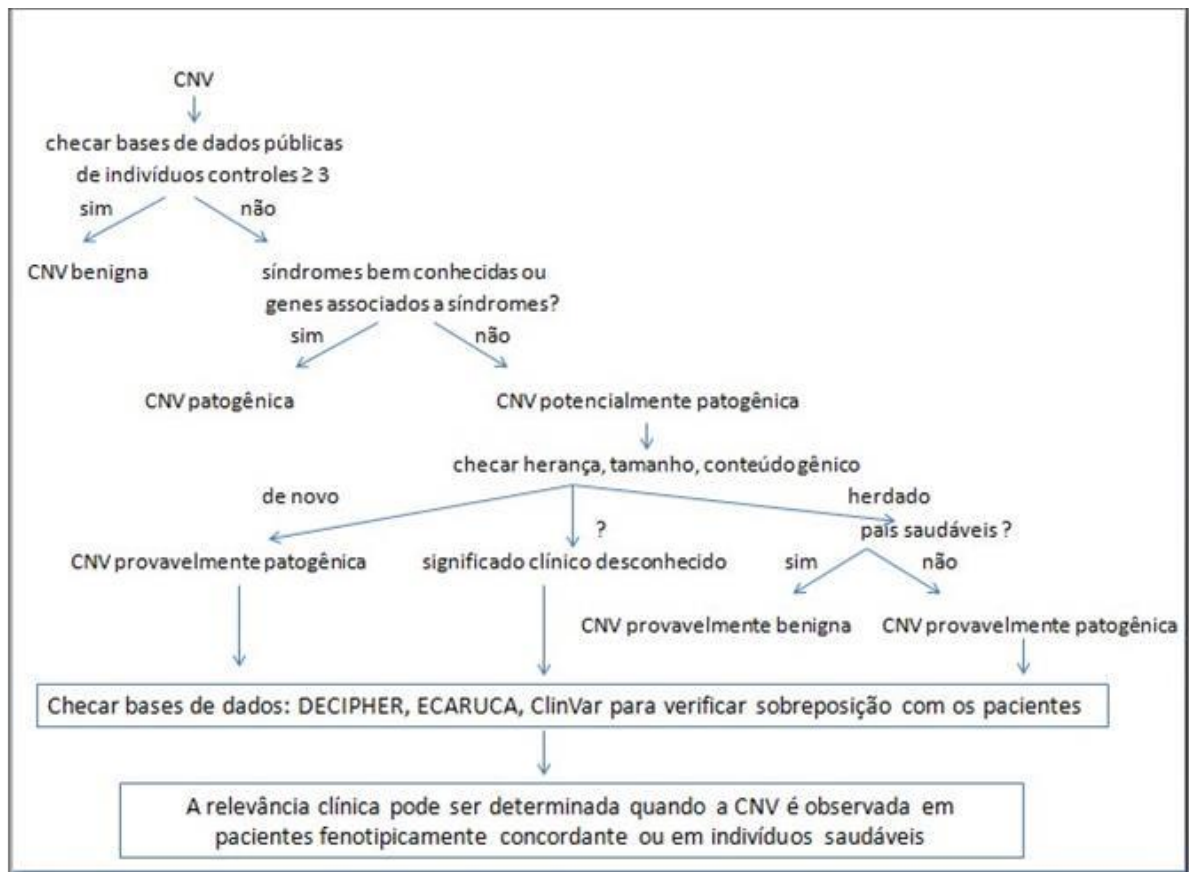


Figura 4. Critérios para a classificação das variantes consideradas benignas, provavelmente benignas, patogênicas ou provavelmente patogênicas (Adaptado de Gijsbers et al., 2011 em Colovati, 2016).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Clínica

Os critérios de inclusão e exclusão foram escolhidos, baseados na compreensão do OAVS como um contínuo de síndromes do primeiro e segundo arcos faríngeos, em que a microtia e a hipoplasia mandibular unilateral seriam a manifestação primária e menos grave conforme descrito pelos autores no item 3.1 deste estudo (Gorlin et al., 1963; Alasti, Van Camp, 2009; Huang et al., 2010; Johnson et al., 2011). Além disso, este foi, em nosso levantamento, o critério mínimo mais utilizado nos trabalhos consultados. Esta escolha visou delimitar a variabilidade do espectro, embora não excluindo anomalias em outros órgãos, exceto sistema esquelético.

Após a avaliação detalhada, foram excluídos:

- três pacientes (uma família), tendo sido confirmado o diagnóstico molecular (gene *GDF6*) da Síndrome de Klippel-Feil (OMIM #118100) e uma paciente com pequeno sulco na ponta do nariz, com mutação no gene *FREM1* (OMIM #608980 – Síndrome do Nariz bífido com ou sem anomalias anoretais e renais), cujos diagnósticos moleculares foram realizados através de análise do exoma no *Johns Hopkins Medicine*, unidade médica e científica da *Johns Hopkins University School of Medicine* e do *The Johns Hopkins Hospital and Health System*, em Baltimore nos EUA, pela Profa. Dra. Nara Lygia De Macena Sobreira, através de parceria científica para elucidação de genes de síndromes sem definição molecular.
- Um paciente apresentando alterações dos membros superiores (malformação radial)
- Uma paciente que apresentou mosaico cromossômico com tetrassomia do cromossomo 22q ao cariótipo convencional, conforme critérios de exclusão determinados no projeto.

Consideramos, portanto, 72 pacientes, com idades entre 0-52 anos, sendo 39/72 (54%) do sexo masculino e 33/72 (46%) do sexo feminino.

Dos 72 pacientes, 16/72 casos (22%) tinham história familiar de sinais clínicos de OAVS. Destes, um par de irmãos gêmeos, um caso de duas primas, um caso de mãe e duas filhas e um par de irmãs, todos os afetados, entraram para a amostra como probandos.

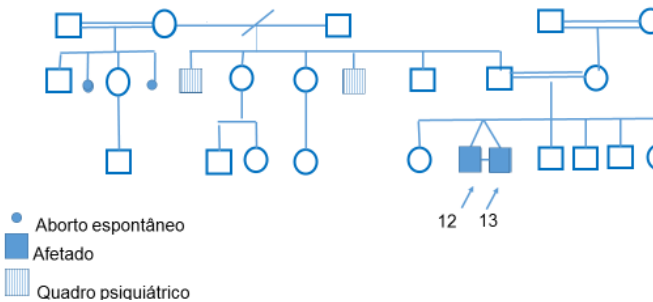
Em outra família com mãe, filha, tia materna, avó materna afetadas, somente mãe e filha foram incluídas como probandas, pois os demais afetados não preenchiam todos os critérios para sua inclusão. Apesar disto, também foi realizada a coleta e a investigação molecular de todos.

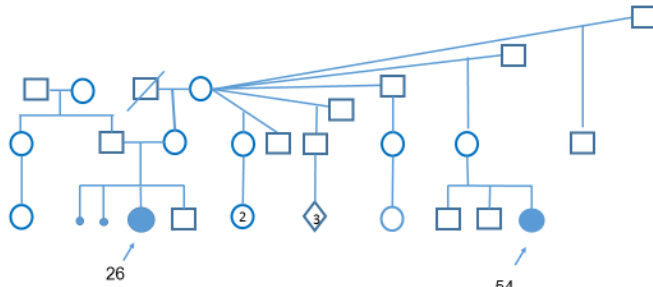
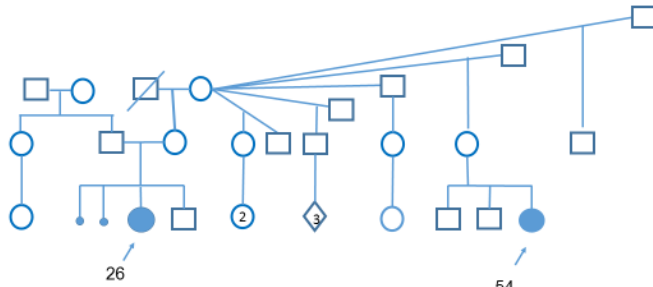
No caso de uma família com criança, mãe, avó materna e tio materno afetados, somente a criança entrou como propósito. Esta família era de origem coreana, e por questões culturais, não foram permitidas fotos dos afetados adultos. Tivemos muitas dificuldades de recrutá-los, embora tenhamos conseguido a coleta de sangue para investigação molecular específica de todos.

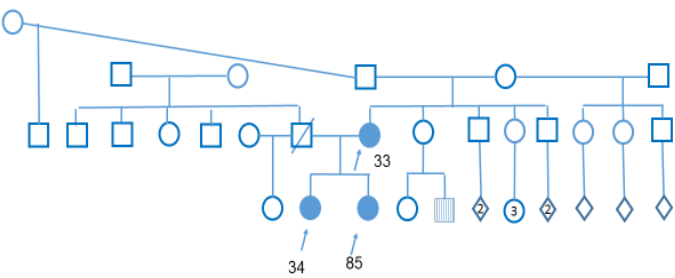
Nos outros 3 casos familiares, 1 caso de primos maternos, outro de primos paternos e dois casos de mãe e filho, apenas um membro do par foi incluído como probando, pois nos dois primeiros casos não conseguimos contato com os respectivos primos e nos casos das mães, estas não preenchiam todos os critérios clínicos para inclusão, embora tenham sido estudadas do ponto de vista molecular.

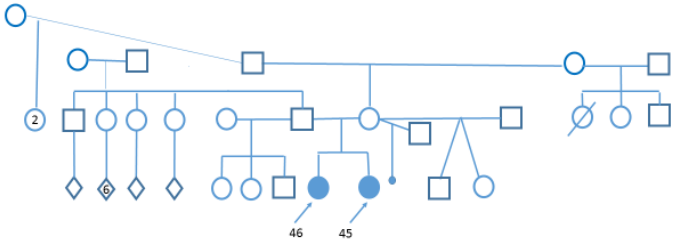
No quadro 2, apresentamos os casos familiares com suas principais características fenotípicas, heredograma e fotos.

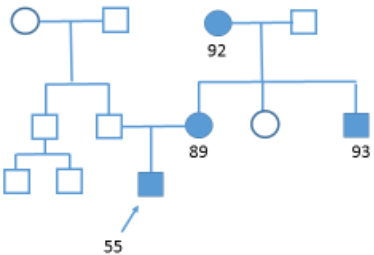
Quadro 2: História, heredograma e quadro clínico dos casos familiares

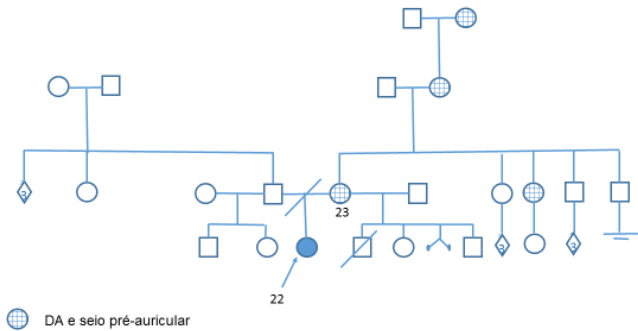
Família	HEREDOGRAMA	Principais características fenotípicas	Imagem craniofacial
1	 ● Aborto espontâneo ■ Afetado ▨ Quadro psiquiátrico	Etnia indígena (guarani), consanguinidade provável, apresentando microcefalia, microsomia hemifacial à esquerda, microtia I bilateral, apêndices pré-auriculares bilaterais, dermóide epibulbar à esquerda, mandíbula pequena e fossa glenoide rasa com ramo vertical mandibular curto à E, incompetência velofaríngea e cardiopatia (refluxo aórtico mínimo em valva trivalvular). Ao RX: corpo vertebral de C3 a C5 alterados, fusão de T4 a T6, hemivértebra 1º torácica e 4º lombar.	
		Assimetria de face e apêndice cutâneo no rosto, retirado cirurgicamente. Ao exame: assimetria facial, microtia I à esquerda, mandíbula pequena, e cardiopatia (valva aórtica bivalvular com refluxo mínimo).	

	26 P.V.H.A F, 8 a.		Sem consanguinidade, 2 abortos espontâneos maternos e hipertensão arterial gestacional. Ao nascimento: dermóide epibulbar, coloboma de pálpebra e apêndices periorais. Ao exame: baixa estatura, microssomia hemifacial à direita, microtia I à esquerda, coloboma de pálpebra superior à E, apêndices pré-auriculares e faciais bilaterais, perda auditiva condutiva bilateral, dermóide epibulbar pregresso à E, macrostomia, defeito de fechamento posterior de C2 e C7, fusão de 3° e 4° costelas a D, hemivértebra entre L5 e S1, cóclea malformada à E.	
2	54 L.G.P F, 9 m.		Prima da pac. 26, pais não consanguíneos. Ao nascimento, observados os apêndices semelhantes aos da prima. Ao exame: Microssomia hemifacial à E, dermóide epibulbar à E, microtia I e apêndice pré-auricular e perioral à esquerda, perda auditiva condutiva à E, micrognatia com ramo mandibular E mais curto, cadeia ossicular E deslocada e "encarcerada" no osso petroso.	

3	34 A.L.F.R F, 12 a	 Quadro Psiquiatrico	Pais não consanguíneos. Mãe usou Gardenal e medicamento para prevenir meningite (sic) na gestação. Ao exame: macrocrania, ADNPM, microsomia hemifacial, microtia III e apêndices pré-auriculares à direita, perda auditiva condutiva moderada à direita, órbita D maior, estrabismo com paralisia de abducente à D, macrostomia com desvio da comissura à D até a borda anterior do masseter. Ao exame de TC: alargamento do espaço subaracnóideo e proeminência do sistema ventricular infra e supratentorial com hipersinal em substância branca peritrigonal, correspondendo a mielinização tardia. Ao exame de TOT: atresia de MAE à D, cavidade timpânica e cadeia ossicular deformada à D. RX de coluna revela costela cervical	 
	85 A.P.F F, 24 a		Irmã mais velha da pac. 34, com discreta assimetria facial, microtia I e perda auditiva condutiva à direita, hipoplasia e assimetria mandibular à D.	
	33 U.F.R F, 51 a		Mãe de pac. 34 e 85, filha de não consanguíneos com assimetria facial, microtia I e apêndices pré-auriculares à direita, ramo mandibular D mais curto, clavícula D bifurcada em sua porção proximal, fusão de C2 e C3, hemivértebra em T1 e anomalias de costelas.	

	45 C.S.R F, 8a		Pais não consanguíneos, 1AE materno, mãe etilista e tabagista. Anoxia moderada ao nascimento. Ao exame: Microcefalia, assimetria facial, microtia II à direita com agenesia de MAE, malformação de cóclea e semicirculares à direita e microtia II à E com apêndices pré-auriculares bilaterais, perda auditiva bilateral, hipertelorismo ocular, estrabismo, microftalmia, micrognatia e fossa glenoide rasa com côndilo incongruente, macrostomia, deficiência intelectual grave, duplicação do sistema calicial ao US renal.	
4	46 C.S.R F, 9a		Irmã mais velha da paciente 45. ITU no 3º trimestre, mãe etilista e tabagista, hipoglicemia ao nascimento, laringomalacea e dificuldade de sucção. Ao exame: microcefalia, microsomia hemifacial e microtia III com agenesia de MAE à D e microtia II à E com apêndices pré-auriculares e facial à direita, perda auditiva neurossensorial bilateral, hipertelorismo com microftalmia, macrostomia, agalgirose intestinal com vício de rotação, deficiência intelectual, cardiopatia e hipoatenuação de substância branca ao exame de TC	

5	55 N.L Probando M, 6a		Consanguinidade provável, ascendência coreana. Ao exame: assimetria facial com paralisia periférica, microtia III à esquerda com atresia de MAE e cavidade timpânica displásica com malformação da cadeia ossicular e da orelha interna, com hipoplasia do canal semicircular lateral, aqueduto e janela oval à E, perda auditiva neurosensorial profunda à esquerda, ramo da mandíbula curto, macrostomia com fenda terminal lateral na borda anterior do masseter e cardiopatia (PCA)	
	89 EK Mãe		Microsomia hemifacial à esquerda, perda auditiva, microtia I com orifício pré-auricular à esquerda, útero bicornio.	Não autorizada
	92 JKN Avó materna		Microsomia hemifacial à esquerda perda auditiva, orifício pré-auricular à esquerda.	Não autorizada
	93 JYK Tio materno		Microsomia hemifacial à direita com ausência do ramo da mandíbula e anotia à direita e perda auditiva.	Não autorizada

	22 M.L.S Probanda,	 DA e seio pré-auricular	Pais não consanguíneos, avó, bisavó e tia materna também apresentam seio pré-auricular e perda auditiva, mãe diabética e hipotireoidea, RCIU, assimetria facial à esquerda, microtia I à esquerda, perda auditiva mista, dermóide epibulbar, hipertelorismo, apêndices pré-auriculares à E, mandíbula pequena com ramo curto, fenda palatina, atraso psicomotor, cardiopatia (CIA, estenose pulmonar) e alterações cerebrais (gliose periventricular). Características fenotípicas da síndrome de Wolf - Hirschhorn.	
6	23 M.L.S Mãe		Casal não consanguíneo, assimetria facial à direita, microtia I à direita e fosseta pré-auricular à direita, hipertelorismo, mandíbula pequena, DA, refluxo mitral mínimo e tricúspide leve.	

Na avaliação da história gestacional dos 72 pacientes, foram relatados eventos durante as gestações em 52/72 (72%). Destes, 3/72 casos foram de diabetes gestacional (4%), um caso de diabetes tipo I e hipotireoidismo e um caso de hiperpara tireoidismo.

Casos de infecções foram 29/72 (40%), sendo a infecção de trato urinário a mais frequente, seguida por vulvovaginite e gripe, um caso de pneumonia, um de pielonefrite e um de hepatite A.

Em 24/72 casos (33%) houve exposição a drogas ou medicamentos, sendo o tabaco em 11/72 casos (15%), álcool em 7/72 casos (10%), drogas vasoativas em 7/72 casos (10%), um caso de ingestão de ácido retinóico manipulado, um caso de uso de cocaína e de substância abortiva, 13/72 casos (18%) tiveram exposições a medicamentos diversos (antibióticos, hormônios, anticonvulsivantes).

Houve restrição de crescimento intrauterino em 14/72 casos (19%) e nascimento prematuro em 12/72 (17%).

Gestação gemelar envolvendo o propósito foi referida em 4/72 casos (6%), sendo uma gestação cujo o gêmeo resultou em aborto espontâneo (AE) no segundo mês, um par de gêmeos com ambos afetados e incluídos na amostra, e outro caso em que o segundo gêmeo não é afetado.

Consanguinidade foi relatada em 4/72 casos (6%), porém em outros 5/72 casos (7%) a consanguinidade é provável, o que resultaria num total de 9/72 casos (13%).

Após o nascimento, foram observados dados de avaliação antropométrica alterados em 16/72 (22%) e atraso no desenvolvimento psicomotor em 15/72 (21%). Estes dados estão compilados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Intercorrências pré e perinatais dos 72 casos avaliados

Tipo de Intercorrência	Número/total (%)	Detalhamento
Diabetes gestacional	3/72 (4%)	Mais 1 pré-gestacional (4/72)
Infecções	29/72 (40%)	Infecção de trato urinário; Vulvovaginite; Gripe; 1 caso de pneumonia; 1 caso de pielonefrite; 1 caso de hepatite A.
Exposição a drogas	24/72 (33%)	Tabaco - 11/72 (15%), Álcool - 7/72 (10%), Drogas vasoativas-7/72(10%) 1 ingestão de ácido retinóico manipulado, 1 caso de uso de cocaína e de substância abortiva, 13/72 casos (18%) - medicamentos diversos (antibióticos, hormônios, anticonvulsivantes e outros)
Restrição crescimento intrauterino	14/72 (19%)	
Prematuridade	12/72 (17%)	
Gemelaridade	4/72 (6%)	1 caso ambos afetados 1 caso somente um afetado 1 caso c/ AE de 1 gêmeo
Consanguinidade (CS)	4/72 (6%)	5 outros casos de provável (CS)
Antropometria pós-natal alterada	16/72 (22%)	
Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor	15/72 (21%)	
Total	52/72 (72%)	

Conforme os critérios mínimos de inclusão adotados, todos os pacientes apresentavam assimetria facial (microsomia hemifacial), sendo 42/72 (58%) à direita. Sessenta e oito casos em 72 (94%) apresentaram hipoplasia mandibular e/ou maxilar, 64/72 (89%) com deficiência em partes moles no lado afetado, 31/72 (43%) macrostomia, 14/72 (19%) fenda orofacial e 55/72 (76%) micrognatia.

Quanto às anormalidades de orelha, 34/72 (47%) eram unilaterais, sendo 20/34 (59%) destas à direita. Quatorze em 72 casos apresentaram anotia uni ou bilateral (19%), 67/72 (94%) microtia de diferentes graus exceto anotia, 32/72 (44%) apêndices pré-auriculares, 2/72 (3%) fossetas pré-auriculares e 53/72 (74%) alterações nos ossos temporais. Dos 72 pacientes, 52/72 (72%) apresentaram perda auditiva de diferentes graus e tipos, sendo 48/72 (67%) com componente condutivo exclusivo, em pelo menos uma das orelhas, 30/72 (42%) neurosensorial exclusivo e 26/72 (36%) mista em pelo menos uma das orelhas.

Dentre as alterações oculares: 11/72 (15%) apresentaram dermóide epibulbar, 5/72 (7%) coloboma, 21/72 (29%) microftalmia, 40/72 (56%) alteração da posição de órbita, 11/72 (15%) hipertelorismo e 6/72 (8%) outras alterações.

Trinta e dois casos em 72 (44%) dos pacientes apresentaram alterações vertebrais, 28/72 (39%) alterações cardíacas, 10/72 (14%) renais, 16/72 (22%) sistema nervoso central e 40/72 (56%) alterações em outros órgãos (gastrointestinal, genitourinário e outros). Estes dados apresentam-se compilados na tabela 3 abaixo.

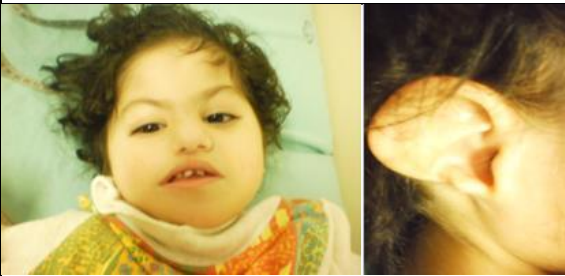
Tabela 3: Frequência das principais características do OAVS em nossa casuística

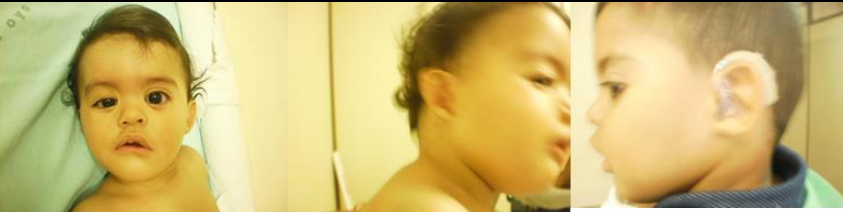
Anomalias Principais		Número/total (%)
Microsomia Hemifacial	Direita	42/72 (58%)
	Esquerda	30/72 (42%)
Mandíbula	Hipoplasia maxilar/Mandibular	68/72 (94%)
Orelha	Microtia unilateral	34/72 (47%)
	Anotia uni/bilateral	14/72 (19%)
	Apêndices pré-auriculares	32/72 (44%)
	Perda auditiva condutiva	48/72 (67%)
Olhos	Distopia Orbital	40/72 (56%)
	Hipertelorismo	06/72 (8%)
	Dermóide Epibulbar	11/72 (15%)
	Microftalmia	21/72 (29%)
Tecidos moles	Hipoplasia do lado afetado	64/72 (89%)
	Macrostomia	31/72 (43%)
Anomalias Craniofaciais Associadas		
Fenda Labial/ Palatina		14/72 (19%)
Coloboma ocular		5/72 (7%)
Disacusia Neurossensorial		26/72 (36%)
Seio pré-auricular		2/72 (3%)
Outras Anomalias		
Vértebras		32/72 (44%)
Cardíacas		28/72 (39%)
Sistema Nervoso Central		16/72 (22%)
Renal		10/72 (14%)
Outros		40/72 (56%)

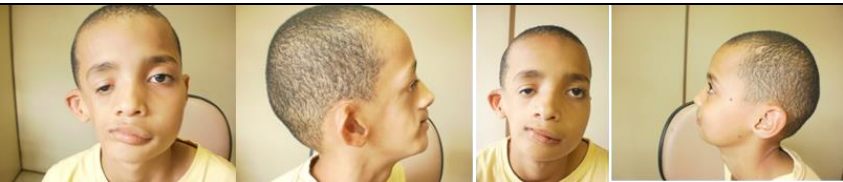
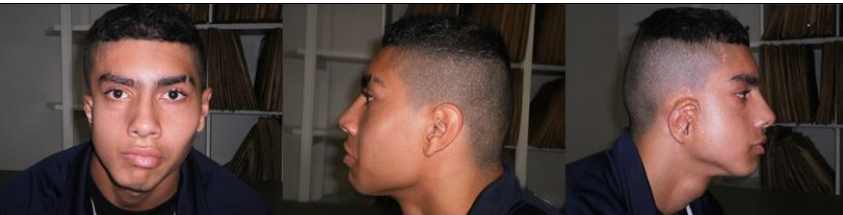
Os quadros clínicos com fotos de todos os casos isolados, cujos resultados citogenômicos foram considerados normais, estão descritos no quadro 3, abaixo. Os casos com resultados alterados, serão descritos e discutidos individualmente adiante.

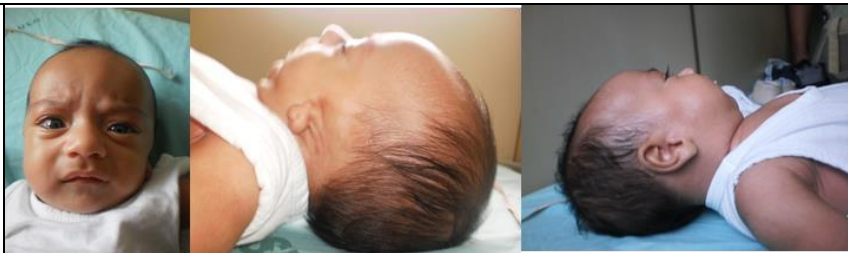
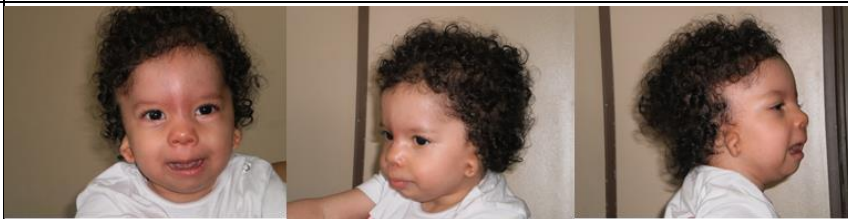
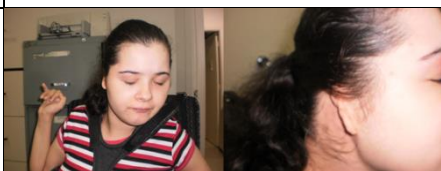
Quadro 3: Descrição dos pacientes que não apresentaram alteração molecular na casuística

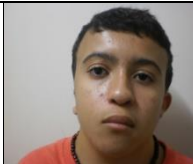
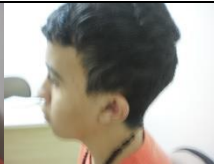
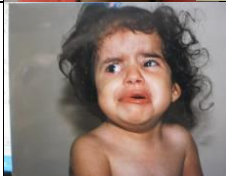
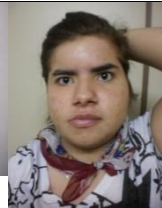
PACIENTE (nº/iniciais)	SEXO/ IDADE	HISTÓRIA/QUADRO CLÍNICO	FOTOS
2 A.C.R.	M, 2a	Pais não consanguíneos, criança abrigada, 2 meia-irmãs do lado materno com dificuldade de aprendizagem, sendo uma com diagnóstico de citomegalovírus na gestação, sangramento no 2º mês de gestação. Ao nascimento, apresentava microtia bilateral com paralisia facial à direita e dificuldade de sucção. Ao exame, assimetria facial com microssomia à direita, obstrução de via lacrimal à D, microtia III bilateral, DA NS bilateral e micrognatia. Ao RX: encurtamento do ramo horizontal da mandíbula à D, raquisquise de C7.	
3 R.S.S.	F, 3a	Pais não consanguíneos, mãe com ptose palpebral isolada, 2 AE, HA no 5ºm e ITU. Ao exame: microssomia hemifacial à D, com desvio de rima, hipertelorismo ocular, microtia III à D, DA condutiva à D. Ao exame de tomografia de face apresenta fossa glenoide rasa, hipoplasia de côndilo e do ramo mandibular à D, hipoplasia de masseter e glândula parótida à D, atresia óssea de MAE, caixa timpânica hipoplásica com cadeia ossicular rudimentar aderida à placa atrésica, canal do nervo facial anteriorizado e janela oval D displásica.	
4 C.J.	M, 2a	Casal não consanguíneo, HA no 8ºm., nasceu com anotia à E, paralisia facial e tetralogia de Fallot, com dificuldade de sucção. Ao exame: assimetria facial, com desvio de rima, telecanto, anotia à esquerda, perda auditiva condutiva moderada esquerda. Ao RX: hipoplasia do ramo mandibular esquerdo, hemivértebra entre T6-T7 e T8-T9 à E, segmentação vertebral anormal de T9 a L1, raquisquise em L1 e ossificação incompleta de L5 a S2. Ao Eco: tetralogia de Fallot com insuficiência pulmonar moderada após cirurgia com 6m.	
5 L.U.	F, 2a	Casal não consanguíneo, pai com mamilo extranumerário, sangramento no 2º semana de gestação. Nasceu com apêndices pré-auriculares e pés tortos, além da assimetria que, ao RX demonstrou anomalia em côndilo mandibular à E, corrigido com 8 anos. A radiografia de coluna mostra hemivértebra toracolombar.	

8 R.R.B.	F, 12a	Casal não consanguíneo, 1 AE, nasceu com criptofthalmia, apêndices pré-auriculares e alterações na coluna e desenvolveu atraso de desenvolvimento neuropsicomotor. Ao exame: microssomia com assimetria facial, hipoplasia da hemiface D, microftalmia e leucocoria à D, apêndices pré-auriculares à D e microtia I à E, macrostomia. Ao RX: defeito de segmentação de vértebras cervicotorácicas com hemivértebras e fechamento incompleto de corpos vertebrais, com fusão de arcos costais.	
10 M.M.A.S.	M, 3a	Casal não consanguíneo, segundo gemelar, cujo irmão é normal, ITU 8ºmes. Nasceu com assimetria facial, malformação em olho e orelha D, micrognatia, anquiloglossia, CIA, CIVs musculares apicais e refluxo gastroesofágico. Ao exame: microssomia hemifacial D, microftalmia à D, microtia III com agenesia de MAE à D, apêndices pré-auriculares à E, DA condutiva moderada à D e mista leve à E, micrognatia com ausência de ramo e fossa glenoide à D (visualizado a Tomo) e desvio de rima. Ao US ocular: atrofia do olho D sem cristalino e com descolamento de retina em funil em polo posterior. Ao RX: acentuada redução de espaço intervertebral entre C5-C6.	
14 G.P.C	M, 5a	Não consanguíneos, HA no 8ºm, ITU no início da gestação, sintomas de Lupus diagnosticado somente depois da gravidez. Ao nascimento: cianose, CIA, CIV e HP, hipocalcemia e hipomagnesemia, convulsões do 1º ao 4º anos de vida, microssomia hemifacial à E, micrognatia, microtia III à E e apêndices préauriculares à D, DA mista moderada à D e severa à E, macrostomia, fusão atlanto-axial e alteração de cadeia ossicular à TOT	
16 G.F.B	F, 4a	Filha de casal com deficiência intelectual, mãe moradora de rua, institucionalizada, apresentou mutação para o gene <i>FREM1</i> . Prematuridade (34 sem), pequena para idade gestacional, nasceu com PCA, agenesia de lóbulo da orelha e malformação do SNC (hipocampo e corpo caloso), ficou entubada por 8 dias. Convulsões desde os 40 dias de vida. Ao exame: assimetria craniofacial, microcefalia, microtia III à D, macrostomia com desvio de rima com paralisia facial periférica, gastrostomia e traqueostomia, forame oval patente e insuficiência cardíaca com refluxo mitral e tricúspide, rim E aumentado com função assimétrica e dilatação pielocalicial. A paciente foi a óbito antes do fim do estudo	

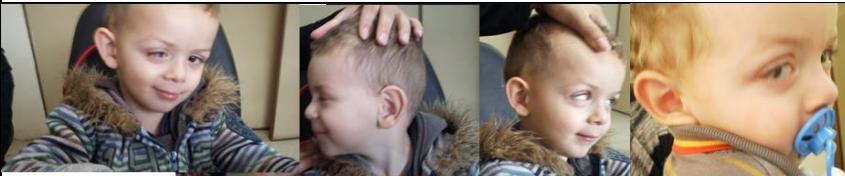
19 M.E.C	F, 2a	Casal não consanguíneo, mãe tabagista durante gestação. Nasceu com orelhas malformadas, lacrimejamento constante, FOP e PCA. Ao exame: assimetria discreta, mandíbula com ramo curto e fossa glenoide rasa à E, microtia III à E, alteração da cavidade timpânica, MAE e cadeia ossicular à E com DA condutiva à E.	
21 M.S.C	M, 1a	Casal não consanguíneo, pielonefrite no 5º m. Prematuridade, cianose, apneia, fratura de clavícula D ao nascimento, paralisia facial e criptorquidia bilateral. Ao exame: microssomia hemifacial D, assimetria orbitária, microtia III à E e II à D, bolsa escrotal hipoplásica, criptorquidia, disfagia moderada por alteração do músculo faríngeo, fechamento velofaríngeo inadequado, DA NS profunda à E e severa à D, paralisia do 7º e 9º par craniano, alteração da fossa glenoide E, cóclea E malformada, canais semicirculares não visualizados.	
24 L.R.	M, 18a	Casal não consanguíneo, sangramento até o quarto mês. Tio e tio-avô maternos nasceram com cardiopatia. Nasceu sem orelhas, com cardiopatia (CIV), criptorquidia e dificuldade de sucção, permanecendo internado por 6 meses, realizou 18 cirurgias. Ao exame: microssomia hemifacial E, micrognatia com agenesia do ramo vertical e fossa glenoide E, anotia à E e microtia III à D, com agenesia de MAE bilateral e DA condutiva bilateral severa, desvio de rima a E, fissura palatina central, hipoplasia do músculo mastigatório à E, anorquia bilateral, cardiopatia (CIV e Wolf-Parkison-White corrigidos, refluxos mitral, tricúspide e aortico e dilatação de VE), hipogonadismo. Ao exame de TOT: agenesia MAE bilateral cavidade timpânica reduzida bilateral, cadeia ossicular ausente a E e malformada à D.	
25 S.N.M	M, 10a	Pais não consanguíneos, ITU no 5ºm, sangramento no 6º e uso de omeprazol (sic). Nasceu com dermóide epibulbar à E. Ao exame: microssomia hemifacial E, alopecia areata em região parietal D, sinófrisis, dermóide epibulbar à E, microtia III com perda de audição mista moderada para severa, MAE estreito e malformação ossicular à esquerda, micrognatia com diminuição do ramo mandibular horizontal, zigomático e maxilar à esquerda, escoliose com convexidade D devido às hemivértebras posteriores entre T6 e T7, hipoplasia de primeiro arco costal e alterações de costelas.	

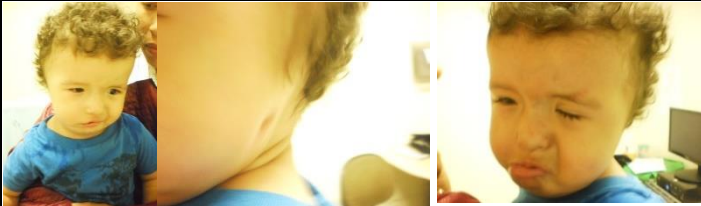
27 M.V.S	M, 11a	Pais não consanguíneos, nasceu com a Sd. dos pulmões úmidos, atresia de colon E com vício de rotação, assimetria facial e FP. Ao exame: microssomia hemifacial grave com microftalmia à D, agenesia do ramo mandibular e fossa glenoide D, microtia II à D, paralisia do nervo facial, deficiência grave de tecidos moles, colostomia, espinha bífida em L4 e S1, arco costal rudimentar entre T12 e L1 à D.	
28 J.P.S.	M, 9a.	Não consanguíneos, 2 AE anteriores, DHEG, mãe tomou aldomet. Nasceu sem orelha e problema na coluna, Sd. adaptativa do RN. Ao exame: assimetria facial discreta, com microtia III bilateral, com deficiência auditiva moderada condutiva à D e mista à E, mastoide não aerada à TOT, hemivértebra entre T9 – T10 e entre T12 e L1, fusão de L2 e L3 à D, fusão parcial de arcos costais (8°,9° e 10°), apresentando 10 arcos à D e 12 à E, sendo que 2 estão bifurcados.	
29 F.S.L	M, 16a	Pais não consanguíneos, DHEG a partir do 6° m., uso de droga vasoativa e tabaco. Obstrução do ducto lacrimal até 3 anos de vida. Ao exame: assimetria facial com microssomia à D, hipoplasia maxilar, zigomática e mandibular à D, microtia III à D (reconstruída), paralisia facial, moderada deficiência de tecidos moles, fechamento incompleto da primeira vertebra torácica, malformação de orelha média e interna à D.	
30 R.T.S	M, 17a	Pais não consanguíneos, 3AE, hiperparatireoidismo materno, polidrâmnio, trabalho de parto prematuro no 6°m. Nasceu com 8 meses, artéria umbilical única, rim E de dimensões reduzidas, atresia de artéria pulmonar E e anotia bilateral. Necessitou de manobras de reanimação. Ao exame: microssômico, assimetria facial, anotia bilateral, micrognatia, todos os ramos do nervo facial afetados; à RM: neurohipófise ectópica.	

31 L.H.D.P	M, 3m	Pais não consanguíneos, mãe tabagista. Nasceu com anotia à E, FP, FOP e dificuldade de sucção. Ao exame: microssômico, microssomia hemifacial à E, anotia e agensia de MAE à E, FP completa pré-forame em "U", micrognatia, emissões otoacústicas ausentes à D, rim E menor que D.	
32 K.H.A.S	M, 11m	Pais não consanguíneos, ITU no quinto mês de gestação. Nasceu com sopro cardíaco e microtia III bilateral, assimetria facial com pinçamento frontal, obstrução do ducto lacrimal, microtia bilateral III, paralisia facial, micrognatia, CIA e CIV.	
35 C.D.S	F, 1m	Casal não consanguíneo, polidrâmio, uso de atenolol e ingestão de medicamento manipulado para a pele. Diagnóstico pré-natal de hidrocefalia, malformação cardíaca. Ao nascimento diagnóstico de microtia III à D, atresia de esôfago e rins em "ferradura". Necessitou de manobras de reanimação e ventilação mecânica. Ao exame: macrocrania, face triangular, assimetria discreta, microtia III à E. RM: esquizencefalia. Eco com hipoplasia de VE (anomalia de Ebstein), dextroversão. RX: alteração de segmentação de vértebras e malformação de costelas. Foi a óbito no berçário.	
38 L.J.	F, 1m	Casal consanguíneo, parto domiciliar com alça de cordão e dificuldade de sucção. Intenso ADNPM, assimetria discreta com microtia III e agensia de conduto à D, redução cavidade da orelha média e malformação de cadeia ossicular. Ao exame de RX: diminuição do ramo mandibular à D, refluxo valvar tricúspide.	
40 J.R.S	F, 18a	Casal não consanguíneo, prematuridade. Ao exame: assimetria facial, com microtia III com agensia de MAE à E (corrigida) e apêndices pré-auriculares, cadeia ossicular e cavidade timpânica não visualizada à E na TOT, DA mista moderada à D e severa à E, fusão de C3-C4, C6-C7 e parcial com T1.	

43 E.B.S.J.	M, 16	Pais não consanguíneos, ITU no início da gestação. Nasceu com tetralogia de Fallot e paralisia facial. Ao exame: microssômico com assimetria facial e microtia III à D com agenesia de MAE bilateralmente e da cavidade da orelha média à D, fusão de vértebras cervicais, rins em ferradura. Ao exame de TC: dilatação simétrica do sistema ventricular supratentorial	  
44 B.M.S.	F, 15a	Não consanguíneos, 2 AE maternos, ITU no início da gestação. Nasceu com PIG, com agenesia auricular D, cardiopatia (CIA, CIV e hiperfluxo pulmonar) e micrognatia. Ao exame: assimetria facial, anotia à D e microtia III à E com fossetas e apêndices pré-auriculares bilaterais e DA condutiva à D e mista à E, redução do antro, cavidade timpânica, cadeia ossicular malformada à D, macrostomia com desvio de rima, fistula em pescoço. Ao exame de RM: acentuação de sulcos e fissuras corticais com ampla cisterna magna. Ao RX: diminuição de espaços entre C5-C6, C6-C7, L4-L5 e L5-S1.	   
47 Y.M	M, 8m	Não consanguíneos. Nasceu com artéria umbilical única, microtia III à E e apêndices pré-auriculares à D, assimetria facial e tumor no olho D. Necessitou de respiração assistida e ficou na UTI por 88 dias. Ao exame: assimetria facial com hipertelorismo, microftalmia à D, dermóide epibulbar e coloboma de pálpebra superior à D, microtia III com agenesia de MAE à E e apêndices pré-auriculares à D, malformação de cadeia ossicular à D e ausente à E, DA mista à D, micrognatia com ausência de condilo mandibular à E, macrostomia, FP pós-forame à D, refluxo gastroesofágico, cardiopatia (FOP com shunt E-D), anormalidade no cérebro (disgenesia de corpo caloso, ventriculomegalia), C1 de morfologia alterada e fusão parcial de C3-C4.	 
48 D.S.S	M, 4a	Não consanguíneos. Ao exame: Assimetria facial com microtia II bilateral com DA mista à D, assimetria de órbita, ossificação incompleta de S1.	  
51 G.S.R	M, 16a	Não consanguíneos. Nasceu com coarctação de aorta, CIV e PCA, ausência de orelhas, malformação de coluna, fenda palatina e alteração renal. Ao exame: anotia bilateral com DA condutiva bilateral, hipoplasia de MAE à D e agenesia à E, cadeia ossicular rudimentar, fundida a placa óssea e assimetria facial e de ramo mandibular, fusão de C4-C7 e T2-T3.	  

53 G.S.B	F, 14a	Não consanguíneo, 1AE materno, nasceu com ausência de orelhas e problema no coração (CIV, PCA). Ao exame: microcefalia, assimetria facial com buftalmo, nistagmo e coloboma de íris à D, microtia III com atresia de MAE à D com DA mista bilateral e rim E ausente. Ao exame de TOT: globo ocular aumentado com falha de fusão posterior e coloboma.	
57 M.C	M, 20a	Não consanguíneos, nasceu sem orelhas. Ao exame: assimetria facial com dermóide epibulbar, anotia bilateral e DA condutiva bilateral com cadeia ossicular rudimentar à D e atresia de MAE. Apresenta estreitamento de côndilo e hipoplasia do arco zigomático e mandíbula à D, deformidade de coluna de C1 a C6, sendo C1 a C3 fundidas, escape mitral e tricúspide.	  
59 C.D.R.A	M, 3m	Pais não consanguíneos, mãe tabagista. Prematuridade, necessitou de respiração assistida e fez sepse. Ao exame: luxação de côndilo do ramo D da mandíbula, hipoplasia maxilar, FO pérvio e anotia bilateral.	  
60 B.E.S	F, 8a	Não consanguíneos, HA primária, mãe etilista, prematuridade, ADNPM. Ao exame: assimetria facial, dermóide epibulbar à E, microtia I bilateral com apêndices pré-auriculares bilaterais, fusão de vértebras cervicais (C7, T1 e T2) e lombar (L1-L3) com hemivértebras (T1) e fusão parcial de costelas.	  
61 E.S.A	F, 7a	Não consanguíneos, HA no fim da gestação, nasceu com cisto no olho e orelhas malformadas. Ao exame: Assimetria facial, estrabismo, dermóide epibulbar à E (retirada), microtia II bilateral, macrostomia com desvio de rima, fusão de C2 a C4 e fechamento incompleto de C5-C6.	  

62 N.A.S.	M, 4a	Não consanguíneos, mãe usou metildopa durante toda gestação, ITU. Nasceu com apêndices pré-auriculares e fenda na narina E. Ao exame: assimetria facial, coloboma de pálpebra superior e dermóide epibulbar à E, microtia I à E e microtia II à D com apêndices pré-auriculares bilaterais e em face e narina E com fenda em sua porção anterior.	
68 A.C.D	F, 2a	Não consanguíneos, mãe usou insulina e levotiroxina durante toda gestação por Diabetes tipo I e hipotireoidismo. Nasceu com encefalocele occipital e apêndices pré-auriculares. Ao exame: assimetria facial e de ramo mandibular ao RX, microtia I com apêndices pré-auriculares bilaterais e DA profunda bilateral, desvio de rima à E, estenose do aqueduto de Silvius e afilamento de corpo caloso.	
69 K.R	M, 2a	Não consanguíneos, HÁ e ITU gestacional, nasceu com dermóide epibulbar à D. Ao exame: Assimetria facial, dermóide epibulbar à D e microtia I bilateral, micrognatía e desvio de rima, ramo mandibular E maior que D. Apresentou cisto aracnoide ao exame de RM crânio.	
70 C.J.S	M, 10a	Não consanguíneos, mãe usou insulina e metildopa durante toda gestação por Diabetes e HA gestacional, teve 3 óbitos fetais. Hipoglicemia e microtia. Ao exame: assimetria facial paralisia facial, microtia III com apêndices pré-auriculares bilaterais e DA condutiva à D e mista à E, desvio de rima à E, fissura submucosa oculta, com insuficiência velofaríngea, fusão parcial C2-C3 e diminuição de espaços entre L1 e L3 e hipotireoidismo.	
71 S.N.D	F, 8a	Não consanguíneos, 1AE anterior, sangramento vaginal no 3º m. Ao nascimento diagnosticada dextrocardia, agenesia de pulmão D, rim único e alteração na coluna. Ao exame: microsomia hemifacial D com microtia III à D, com atresia de MAE e malformação de orelha média, microtia II à E e ausência de cadeia ossicular, DA NS moderada à E, retrognatía, fusão C2-C4, hemivértebra torácica entre T4 e T5 com fusão parcial, dextrocardia com FO pérvio e CIV, arco aórtico à E, insuficiência mitral e tricúspide, ectasia calicial discreta e "situs inversus totalis"	

72 M.P.C	M, 7a	Não consanguíneos, gestação gemelar, sendo que o segundo gêmeo resultou em aborto. Mãe tabagista até 2º mes. Nasceu com 3 alças de cordão. Ao exame: assimetria facial com hipotelorismo ocular, microtia II bilateral e DA condutiva à D e mista à E, desvio de rima à E, fissura submucosa oculta, com insuficiência velofaríngea, fusão parcial C2-C3 e diminuição de espaços entre L1 e L3 e hipotireoidismo	
73 S.G.R.S	M, 3a	Não consanguíneos, HA no fim da gestação e parto. Ao nascimento, anoxia grave, insuficiência renal por válvula de uretra posterior, atresia de coana à E, criptorquidia bilateral, microtia III e agenesia de MAE à E, necessitou de ventilação mecânica por 34 dias. Ao exame: ADNPM, microssomia, hipotelorismo, assimetria facial, microtia III com agenesia de MAE à E e microtia I à D com apêndices pré-auriculares bilaterais e DA moderada bilateral, macrostomia, testículos ectópicos bilateralmente, fusão de vértebras cervicais (C1-C2) e lombar (L1-L3) com hemivértebras (T1) e fusão parcial de costelas, ECO doppler sugestivo de disfunção diastólica de VE. Aparentemente amaurótico. Realizou transplante renal.	
74 L.A.C	F, 16a	Não consanguíneos. Nasceu com apêndices e cisto pré-auriculares à E. Ao exame: assimetria facial, microtia I à E com apêndices e cisto pré-auriculares e em face, ADNPM e dificuldade escolar. Assimetria de ramo mandibular, sendo menor a D.	
75 C.L.E.L	M, 1a	Não consanguíneos, ITU gestacional, nasceu sem orelhas bilateralmente. Ao exame: microssomia hemifacial à E, microftalmia com assimetria de tamanho do disco óptico, obstrução do ducto lacrimal e anotia bilateral com agenesia de MAE e DA condutiva bilateral, micrognatia e desvio de rima com paralisia facial, ramo mandibular E maior que D. Apresentou cisto aracnoide ao exame de RM crânio.	
76 E.H.A.L.	M, 12a	Consanguíneos. ITU no 6ºm. Criptorquidia ao nascimento e deficiência auditiva profunda à E diagnosticada com 4a. Ao exame: macrocefalia, assimetria facial com assimetria de ramo mandibular, sendo menor à E, fendas palpebrais oblíquas para baixo, microtia I bilateral com DA e malformação de Mondini em orelha interna, rim em ferradura e dificuldade escolar.	

79 L.P.W.E.H. O.	M, 1m	Consanguinidade provável, pais indígenas. HA e Diabetes gestacional, uso de insulina. Ao US gestacional diagnóstico de cardiopatia complexa com aparente ventrículo único e artéria umbilical única. Prematuridade, necessitou de reanimação e respiração assistida. Ao exame: assimetria facial, microtia II à E e I à D, apêndice facial perioral, criptorquidia, heterotaxia com cardio e hepatomegalia. Eco com “ <i>situs ambiguus</i> ”, isomerismo cardíaco, dextrocardia, conexão atrioventricular com valva única, dupla saída do ventrículo, átrio único, arco aórtico à E e PCA	
83 A.L.C.M.F.	F, 5a	Não consanguíneos. Sangramento no 4º m. Nasceu sem orelha E e com apêndices pré-auriculares à D. Ao exame: assimetria facial discreta, microtia III à E com agenesia de MAE, hipoplasia de OM e malformação de cadeia ossicular e DA mista severa à E, apêndice pré-auricular à D, macrostomia com assimetria de ramos mandibulares e diminuição do côndilo mandibular à E.	
86 M.E.C.S	F, 42a	Não consanguíneos, um irmão nascido com anencefalia e outro com problema de coluna e um primo paterno com o mesmo quadro. Parto domiciliar, nasceu sem orelhas. Ao exame: microssomia hemifacial à D microtia III bilateral com agenesia de MAE e cadeia ossicular bilateral e DA mista severa bilateral, macrostomia com assimetria de ramos mandibulares, presença de costela cervical e cisto renal à D	

5.2 AVALIAÇÃO CITOGENÔMICA

5.2.1 Resultados dos cariótipos

Para os 72 pacientes avaliados clinicamente, foi realizado o exame de cariótipo por bandamento G. Todos apresentaram cariótipos aparentemente normais, sem alterações cromossômicas visíveis ao microscópio, na resolução padrão.

5.2.2 Resultados dos *arrays* genômicos

Todos os 72 pacientes cariotipados foram submetidos ao exame de *array* genômico, para identificar alterações no número de cópias no genoma.

Inicialmente, foram comparados os resultados de *array* dos pacientes com bancos de dados internacionais (DGV) e excluídas CNVs consideradas polimórficas e sem significado clínico na população. Em seguida, os dados das CNVs possivelmente patogênicas foram comparados com as do banco interno de CNVs da Disciplina de Genética da UNIFESP e excluídas as regiões consideradas CNVs possivelmente polimórficas na população brasileira (1p36.32, 2p11.2, 3p21.31, 5p15.2, 6q27, 8p11.22, 8q11.1, 8q24.23, 9p11.2, 10q11.22, 14q32.2, 15q11.1, 16q24.3, 17q21.31 e 19q13.2).

Após a análise detalhada, foram identificadas 22 alterações no número de cópias do genoma em 20/72 diferentes pacientes (28% dos casos), consideradas CNVs patogênicas e possivelmente patogênicas. Destas, sete eram deleções (4p16.3p15.33, 4q13.3q21.1, 8q13.3, 10q26.2q26.3, 16p13.3, 22q11.21 e Xp22.33) e quinze eram duplicações (2q32.1, 3p13, 3q28, 4p16.1 (3 casos), 4p16.3, 8q24.3, 10p14, 10p13, 16p13.11p12.3, 17q11.2, 19p13.11 e Xp22.33).

Nos pacientes listados no Quadro 4, que apresentaram CNVs patogênicas ou possivelmente patogênicas, foram verificados desequilíbrios genômicos relacionados com doenças conhecidas como: Síndrome oculoauricular, Síndrome de Wolf-Hirschhorn, OFTC1, Sd. da microdeleção de 16p e Sd. da deleção de 10q; pacientes relatados na literatura com clínica OAVS em regiões contendo ou não genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial como: *SOX10*, *HMX1*, *SNAIL3*, *PRKX*, *SOX9*, *NOMO1*, 2, 3, *EDNRA*, *ACTR* e *FGFR8*; e pacientes com alguma característica

clínica de OAVS, apresentando VUS de significado incerto. Os pacientes 15, 22, 36, 39, 42, 49 e 58 apresentaram CNVs já descritas em síndromes com anomalias congênitas múltiplas e/ou pacientes com características OAVS. Nos pacientes 1, 6, 20, 22, 34, 39, 41, 52, 54 e 78, as CNVs estavam em regiões contendo ou próximas a genes relacionados ao desenvolvimento dos arcos faríngeos ou desenvolvimento craniofacial.

Os demais pacientes (18, 37, 50 e 84) apresentaram CNVs contendo genes com morbidade no OMIM e funções em sistemas importantes, portanto devemos considerar a correlação genótipo-fenótipo.

Além das alterações possivelmente patogênicas, em cinco pacientes, as CNVs foram caracterizadas como VUS: as duplicações das regiões: 19p13.3 (Pacientes 20, 28 e 44), 15q21.1 (paciente 74) e a deleção da região Xp22.33 (Paciente 43).

Na amostra estudada, foram encontrados muitos pacientes (42/72) com CNVs da região 22q11.2 (chr22:22,864,05823,290,723/hg19) consideradas benignas na população geral, sendo 39 com duplicações e 3 com deleções nesta região.

Quadro 4. Deleções (del) ou duplicações (dup) consideradas de acordo com a patogenicidade, observadas pelo *array* genômico

Caso	Banda cromossômica	Coordenadas genômicas (GRCh37/hg19)	Tamanho (kb)	Tipo da CNV e patogenicidade
1	22q11.21	20,716,923-21,297,749	581	del (Provavelmente Patogênica)
6	4p16.1	8,716,373-9,668,706	952	dup (Patogênica)
15	3q28	188,985,132-189,345,114	360	dup (VUS)
18	3p13	71,612,202-71,869,065	257	dup (VUS)
20	8q24.3	144,636,785-144,953,893	317	dup (Provavelmente Patogênica)
22	4p16.3p15.33	68,345-13,569,183	13.500	del (Patogênica)
	Xp22.33p22.31	168,551-8,907,556	8.740	dup (Patogênica)
34	4p16.1	8,721,681-9,668,706	947	dup (Patogênica)
36	Xp22.33	919,024-4,279,960	3.360	del (Provavelmente Patogênica)
37	2q32.1	186,743,872-188,985,410	2.240	dup (VUS)
39	8q13.3	71,306,059-72,739,449	1.433	del (Patogênica)
41	10p14	12,099,022-12,323,390	224	dup (Patogênica)
	10p13	13,532,647-13,752,351	220	dup (Patogênica)
42	17q11.2	29,360,929-30,408,615	1.048	dup (Provavelmente Patogênica)
49	16p13.11p12.3	15,417,030-16,837,613	1.420	dup (Provavelmente Patogênica)
50	4q13.3q21.1	74,958,696-76,339,793	1.381	del (VUS)
52	10q26.2q26.3	128,083,064-135,427,143	7.340	del (Patogênica)
54	4p16.3	1,384,987-1,653,352	268	dup (VUS)
55	Xp22.33	1,211,539-1,452,793	241	dup (VUS)
58	16p13.3	85,880-2,056,874	1.971	del (Patogênica)
78	4p16.1	8,724,313-9,668,706	944	dup (Patogênica)
84	19p13.11	19,494,044-19,710,107	216	dup (VUS)

6. DISCUSSÃO

6.1. Características gerais da casuística

Em nosso estudo, verificamos maioria de casos esporádicos, porém também casos com história familiar (22%), sendo maior a incidência no sexo masculino (54%), dados que estão de acordo com a literatura (Rooryck et al., 2010; Barisic et al., 2014; Beleza-Meireles et al., 2015). Beleza-Meirelles et al. (2015) e Rooryck et al. (2009) identificaram em estudos coorte, 31% e 12% dos casos familiares, respectivamente, enquanto Barisic et al. (2014) encontraram 5,6% em 192 casos registrados no EUROCAT. Essa diferença, provavelmente, relaciona-se ao fato de que o estudo de Barasic foi realizado com base em registro de banco de dados, enquanto outros como o nosso, em histórias diretamente colhidas dos pacientes e familiares. Barisic et al. (2014) no maior estudo populacional encontrado, calcularam a proporção de masculinos e femininos em 1,4 :1, dados estes também concordantes com outros autores (Grabb et al. 1965, Rolnick et al. 1987, Tasse et al. 2005).

Dados de consanguinidade na população brasileira são extremamente variáveis. Os estudos são geralmente mais regionalizados, sendo as taxas mais altas encontradas no Nordeste, porém a taxa média brasileira é calculada em 4%. A taxa de consanguinidade em nosso estudo foi um pouco maior (6%) que a da população geral, o que poderia ser explicado pelo próprio objeto de estudo, uma vez que se sabe que a consanguinidade também é um dos fatores que aumenta a frequência quadros de origem multifatorial (Salzano et al., 1976).

Nossa casuística apresentou 6% (4/72) de casos com gemelaridade. Segundo dados Febrasgo, a prevalência de gêmeos no Brasil de 2015 era de 17,3/1000, sendo que cerca de 1 a 2% dos partos seriam gemelares. Estudos realizados no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, em levantamento de 1978 a 2009, ou seja, 32 anos de registros do serviço de Ginecologia e Obstetria do Hospital, dão conta de uma variação de 0,71 a 1,47% na prevalência de gestações gemelares (Rosário HB, 2012). Dados de um estudo demográfico de 2011 na América Latina estimaram o nascimento de 9 gêmeos por 1000 nascidos no Brasil (Smits e Monden, 2011).

Como já discutido, gestações gemelares têm aumentado com o uso de técnicas reprodutivas assistidas no decorrer dos últimos anos e têm sido associadas a

malformações, inclusive ao OAVS em diversas publicações (Ferraris et al., 1999; Roesch et al., 2001; Pison & D'Addato, 2006; Gittins et al., 2010; Barisic et al., 2014). Barisic et al. (2014) encontraram uma associação 5 vezes maior de gemelaridade em pacientes com OAVS, do que na população controle e discutem a associação com técnicas de reprodução assistida e idade materna mais avançada, também nestes casos, todos relacionados a dificuldades reprodutivas. Em nossa casuística, a gemelaridade não está associada a técnicas de reprodução assistida em nenhum caso.

Outros autores têm associado a gemelaridade a malformações craniofaciais, síndromes dismórficas, eventos epigenéticos e ao próprio espectro OAV, mesmo quando não relacionada à reprodução assistida. As hipóteses para esta associação já foram discutidas neste estudo na seção de revisão da literatura, item 3.1.4.1 (Jongbloet, 1987; Keusch et al., 1991; Wieczorek et al., 2007). Assim, poderíamos atribuir este aumento da prevalência de gêmeares também à seleção do próprio objeto do estudo, conforme os autores citados.

Outro achado na literatura, foi a relação com diabetes materno. De fato, a associação deste quadro nosológico com malformações é notória na literatura, com hipóteses de efeito disruptivo vascular e epigenéticos (Werler et al., 2004a; Wieczorek et al., 2007; Ballesta-Martínez et al., 2013). Barisic et al. (2014) encontraram um número dez vezes maior de casos de diabetes materno em gestações que resultaram em RNs com OAVS, porém a associação encontrada por estes autores foi relacionada a diabetes pré-gestacional, do qual tivemos um caso apenas. Wang et al. (2002), entretanto demonstraram a associação positiva com OAVS, dos dois tipos de diabetes pré ou gestacional, insulino-dependente ou não, apresentando *lod-scores* estatisticamente significativos em estudo caso/controle. Os autores hipotetizaram que a diabetes não controlada interfere na migração das células da crista neural. Em nossa amostra, 4%(3/72) de mães apresentaram diabetes gestacional e mais um caso de diabetes melitus tipo 1.

Em relação à exposição a drogas, 24 casos (33%) foram encontrados e destes, sete (29% dos expostos ou 10% da amostra total) estão relacionados ao uso de álcool. O uso de álcool na gestação é notoriamente associado ao espectro de alterações da síndrome fetal alcóolica, que inclui malformações de orelha externa e surdez entre seus achados (Minnes et al., 2006).

O nosso paciente 1 foi exposto à cocaína, durante o desenvolvimento embrionário e a substâncias abortivas não identificadas em nossa casuística. Graves manifestações de OAVS foram observadas em um feto exposto à cocaína (Lessick et al., 1991), porém estudos mais recentes não puderam replicar este padrão de associação (Minnes et al., 2006).

Encontramos um caso de uso de isotretinoína na nossa casuística, substância teratogênica bem conhecida, cujo fenótipo também se embrica com o OAVS. Wang et al. (2016) demonstraram que as malformações craniofaciais encontradas em modelos animais são idade gestacional dependentes, sendo o palato fendido mais frequente (81%) em exposições precoces (10º dia) e inibição do desenvolvimento maxilar e mandibular induzindo à assimetria em exposições mais tardias. Lopez et al. (2016), estudando expressão do gene *MYT1* em células tratadas com ácido retinóico, observou um aumento de duas vezes e meia da expressão deste gene. O tipo selvagem do *MYT1*, quando superexpresso, induz a diminuição de uma vez e meia do receptor do ácido retinoico (RARβ), demonstrando assim a relação entre o agente teratogênico e o gene.

Tivemos ainda um caso de uso de citalopram e onze (46% dos expostos ou 15% da amostra total) para o uso do tabaco. Werler et al. (2004) em estudo caso-controle, demonstrou associação estatisticamente significativa de OAVS com o uso concomitante de tabaco e drogas vasoativas de uso esporádico como ibuprofeno e ácido acetil-salicílico, porém a única droga vasoativa que demonstrou associação significativamente positiva de forma isolada foi a pseudoefedrina. Minnes et al. (2006) refere associação positiva de malformações craniofaciais com uso pesado de tabaco, e de malformações das orelhas com uso de álcool, porém afirma que em estudos controlados, a associação de dismorfias com a cocaína não foi encontrada.

O restante dos 24 casos, refere-se à utilização de medicamentos indicados para o tratamento de doenças crônicas, quatro dos quais (17% dos expostos ou 5,5% da casuística total) são substâncias vasoativas, que também são associadas com casos de OAVs. O uso de drogas vasoativas é considerado um fator ambiental relacionado ao aparecimento de casos do espectro OAV, porém somente a pseudoefedrina foi mais consistentemente associada. Acredita-se que um distúrbio vascular durante a embriogênese no suprimento da crista neural, possa ser responsável pela patogênese do quadro, interferindo no desenvolvimento dos arcos

faringeos (Poswillo et al., 1973). Os autores inferem que estes dados corroboram a hipótese de disrupção vascular como um mecanismo para OAVS.

Quanto às características fenotípicas, embora muitos estudos clínicos tenham sido realizados (Grabb et al., 1965; Tasse et al., 2005; Rooryck et al., 2009; Barisic et al., 2014; Beleza-Meirelles et al., 2015), uma análise comparativa do ponto de vista epidemiológico é difícil pela variabilidade de critérios de inclusão e exclusão, critérios de classificação utilizados e características populacionais diferentes. Além disto, existem vieses associados ao tipo de estudo e instituição onde foram selecionados os casos. Barisic et al. (2014) discutem a sua alta taxa de anomalias associadas (69,4%), excetuando-se crânio, pescoço e coluna vertebral, como sendo devido a coleta de informações a partir de um registro de anomalias congênitas. Em nossa casuística, também tivemos um alto índice de anomalias associadas: atraso no desenvolvimento psicomotor em 21%, alterações cardíacas em 39%, renais em 14%, cerebrais em 22% e 56% de alterações em outros órgãos. Acreditamos que, sendo um centro de referência quaternária, sejam drenados para nosso serviço, os casos mais graves, justificando assim as altas taxas de malformações associadas, além do fato de que realizamos a pesquisa sistemática destas anomalias em nossos pacientes.

De acordo com a classificação de Tasse et al. (2005), nossa casuística abrangeria apenas os grupos 2 e 3, uma vez que nosso critério mínimo de inclusão é a presença de microtia com microssomia. Assim, teríamos 36% (26/72) pertencentes ao grupo 2 de Tasse (sem alterações de coluna) e 64% (46/72) pertencentes ao grupo 3 (com anomalias de coluna), sendo metade da amostra (36/72) de quadros bilaterais (subgrupo 2 de Tasse) e a outra metade de casos unilaterais (subgrupo 1), sendo o lado direito preferencialmente afetado (64% da amostra - 46/72), ao contrário do que foi visto por Tasse et al. (2005). Segundo o algoritmo criado para esta classificação, 58% (42/72) casos tiveram valores maiores ou iguais a 10 na pontuação cujo máximo era 18, portanto a maioria dos nossos casos eram de maior gravidade. Também foram concordantes com a observação de Tasse, a associação de deficiência intelectual com os casos de maior pontuação (mais graves) e associações de alterações vertebrais com as geniturinárias, porém não houve concordância quanto das alterações oculares com as de SNC ou vertebrais ou fendas como na amostra de Tasse.

Quanto à classificação de OMENS, após a pontuação de cada estrutura facial de zero a 3 nos 6 itens apontados para avaliação em cada paciente, tivemos 21/72 (29%) apresentando pontuação maior ou igual a 10 e destes, metade tinha anomalias associadas.

Todos os nossos pacientes que apresentavam dermóide epibulbar, também apresentavam anomalias vertebrais, além da microssomia e microtia, portanto um quadro clássico de Síndrome de Goldenhar, perfazendo 15% (11/72) da casuística. Conforme discutido anteriormente, o dermóide epibulbar pode aparecer isoladamente ou associado a síndromes específicas como: síndrome oculoectodérmica (OMIM %600268 – OES); displasia frontofacial (OMIM %229400); lipomatose encefalocraniocutânea (ECCL - OMIM #613001); síndrome de Proteus (OMIM #176920); síndrome Townes-Brokes (TBS – OMIM #107480) e lipomatose múltipla (OMIM %151900), além da própria síndrome de Goldenhar, porém nenhum dos nossos casos é compatível com estes outros diagnósticos.

Comparativamente aos dados compilados por Heike, Luquetti, Hing (2014) em Genereviews®, adaptado de Cousley e Calvert (1997), de trabalhos publicados entre 1983 a 2014, todos os nossos achados para as anomalias principais e craniofaciais, conforme listados na tabela 1, estão dentro da variabilidade esperada.

Com relação as anomalias associadas, nossos dados mostram-se acima da variação apresentada por estes autores, porém mais próximos dos dados de Barasic et al. (2014), que obteve frequências maiores destas anomalias. Novamente, nossa posição de centro de alta complexidade e além disto, de termos construído um protocolo específico para busca de anomalias associadas com exames subsidiários para estes diagnósticos, poderia explicar esta discrepância.

6.2. Correlação genótipo-fenótipo

O nosso grupo é o terceiro no mundo a estudar, através de técnicas de citogenômica, uma amostra de mais de 50 pacientes com características clínicas da OAVS (Rooryck et al., 2010, Beleza-Meirelles et al., 2015).

Nossos dados citogenômicos não apontaram uma região genômica única relacionada com o quadro clínico em estudo, porém os estudos por *array* revelaram desequilíbrios cromossômicos recorrentes nas regiões 4p16.1, 19p13.3, 22q11.2 e

Xp22.33. Outros trabalhos já haviam relatado tais desequilíbrios nas regiões 22q11.2 e Xp22.33, em pacientes OAVS (Rooryck et al., 2010; Torti et al., 2013; Beleza-Meireles et al., 2015).

6.2.1 Cromossomo 4

Em nossa casuística, 6 pacientes (Pacientes 6, 22, 34, 50, 54 e 78) apresentaram alterações no número de cópias do cromossomo 4, sendo cinco delas no braço curto: uma duplicação em 4p16.3 e uma deleção em 4p16.3p15.33, incluindo os genes *BAPX1* (4p15.33), responsável pela microsomia hemifacial (OMIM #164210); *MSX1* (4p16.2), caracterizado como responsável pelo desenvolvimento craniofacial (Attanasio et al., 2013) e *HMX1* (4p16.1), envolvido na síndrome oculoauricular (OMIM #612109), e três duplicações em 4p16.1, englobando o gene *HMX1*.

O gene *BAPX1* pertence à família da *NK2* de fatores de transcrição, que são reguladores do desenvolvimento da orelha média (OM) e tem um papel essencial em sua formação. Em 40% dos casos de OAVS, encontrou-se desequilíbrio da expressão deste gene em fibroblastos, mas nenhuma mutação foi encontrada, que corroborasse a hipótese proposta de desregulação epigenética deste, como a causa dos mesmos (Fischer et al., 2006).

A partir do estudo de ligação em cinco gerações de uma família chinesa com microtia isolada, Li et al. (2014) sugeriram a suscetibilidade do *locus* 4p15.32-4p16.2 para a condição clínica. Os autores realizaram o sequenciamento dos genes *EVC*, *HMX1* e *BAPX1*, identificando 38 variantes, sendo que 9 delas segregavam com o fenótipo da doença. Gillespie et al. (2015) identificaram uma mutação *missense* em homozigose no gene *HMX1*, em dois pacientes com a síndrome oculoauricular, associada a malformações oculares e evidenciando que esse gene estaria envolvido nas vias do desenvolvimento ocular do cristalino e retina. A expressão de *BAPX1* se sobrepõe em função, ao produto do gene *GSC* que é um fator de transcrição e desempenha um papel importante na gastrulação, sendo igualmente importante para a formação de OM, mas este último, está localizado na região 14q32, a qual foi associada em uma família com microsomia hemifacial, mesmo não havendo

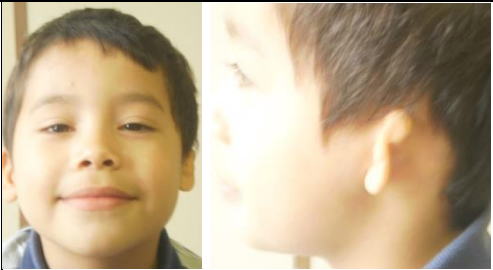
nenhuma mutação neste gene em outras famílias, nem em 120 casos isolados. (Kelberman et al., 2001).

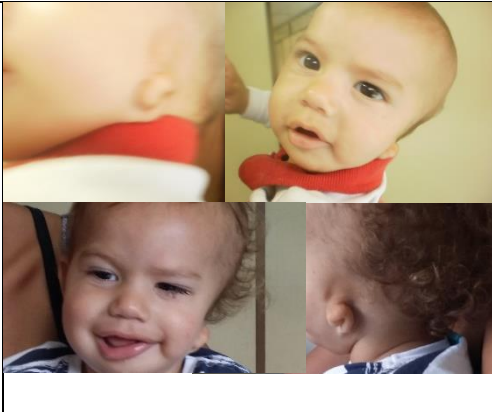
O nosso relato da recorrência da duplicação em 4p16.1, incluindo o gene *HMX1*, em pacientes com OAVS é de extrema importância para a definição do *locus* e função dos genes responsáveis pela etiologia da doença, merecendo investigações moleculares adicionais dessa região.

No quadro 5 abaixo, descrevemos as características destes pacientes para uma melhor comparação de seus quadros clínicos.

Por tratar-se de diagnóstico específico (Síndrome de Wolf-Hirschhorn), a paciente 22 não será apresentada neste quadro. A discussão deste caso será feita em separado.

Quadro 5: Características fenotípicas dos pacientes com alterações do número de cópias no cromossomo 4

CASO	HISTÓRIA/QUADRO CLÍNICO	REGIÃO E GENES	FOTOS
6 R.O. M, 3a	Casal não consanguíneo, ITU no 6ºm. Assimetria facial, microtia III com agenesia do MAE à E, com disacusia condutiva, fossa glenoide pequena com ramo mandibular curto	dup 4p16.1 (CNV patogênica) <i>HMX1</i>	
34 A.L.F.R F, 12a	Casal não consanguíneo, microsomia hemifacial à D, microtia III e apêndices pré-auriculares e perda auditiva condutiva à D, assimetria de órbitas, paralisia facial, macrostomia, alterações nos ossos temporais pela TC.	dup 4p16.1 (CNV patogênica) <i>HMX1</i>	
54 L.G.P. F, 9m	Casal não consanguíneo. Assimetria facial, microtia I à com apêndice pré-auricular e perioral à E, cadeia ossicular E encarcerada, dermóide epibulbar, micrognatia com assimetria de ramos	dup 4p16.3 (VUS)	

78 M.A.R M, 6m	Não consanguíneos, 1AE. Assimetria facial severa com assimetria de orbitas, paralisia facial, deficiência severa de tecidos moles à E, microtia III com agenesia do MAE e hipoplasia da orelha média à E, macrostomia	dup 4p16.1 (CNV patogênica) <i>HMX1</i>	
-------------------------------	--	--	--

É interessante notar, que os pacientes deste quadro apresentam quadro clínico muito semelhante. Três deles (6, 34 e 78) apresentam duplicações na mesma região (4p16.1), envolvendo o gene *HMX1* e com pouquíssima variação no tamanho (952, 947 e 944 kb). Todos eles têm seu quadro clínico limitado ao segmento craniofacial. O gene *HMX1*, da família de genes *homeobox NKX5*, expresso no olho em desenvolvimento, na raiz dorsal do gânglio trigeminal e no segundo arco faríngeo, é responsável pela síndrome oculoauricular quando mutado. Esta síndrome apresenta clinicamente um envolvimento ocular importante com microftalmia, microcornea, disgenesia de câmara anterior, catarata, coloboma, alterações do epitélio pigmentar e distrofia de cones, além da malformação auricular. Poderíamos inferir que a alteração do número de cópias encontrada nesta região tenha efeito mais limitado a região de segundo arco faríngeo e ramo facial do trigêmeo, já que nenhum destes pacientes tem envolvimento ocular.

Já a nossa paciente de número 54, apresenta uma duplicação em uma região (4p16.3) mais próxima do gene *MSX1* (4p16.2), que é outro gene *homeobox* responsável pelo desenvolvimento craniofacial e está associado à Displasia Ectodérmica 3, tipo Witkop e a fendas orofaciais e agenesia dentária seletiva. Nossa paciente apresenta um quadro clínico muito leve de síndrome de Goldenhar e a sua duplicação é muito pequena. Embora sua história familiar seja positiva, a prima também afetada, não apresentou alterações significativas do número de cópias em nenhum cromossomo, ao exame molecular.

Encontramos também uma deleção no braço longo, em 4q13.3q21.1. O único relato na literatura com envolvimento de CNV do braço longo do cromossomo 4 (4q35.11q13.1) em um paciente com o fenótipo OAVS foi feito por Rooryck et al.

(2010). A Figura 5 abaixo mostra o fenótipo do paciente 50, no qual encontramos tal deleção.



Figura 5: Fotos do paciente 50 de frente e perfil direito e esquerdo

O paciente é do sexo masculino, tem 3 anos, filho de casal não consanguíneo. Ao exame apresentava assimetria facial discreta, microtia III com agenesia do MAE à E e apêndices pré-auriculares à D, DA mista à E, micrognatia com assimetria de ramo mandibular, insuficiência tricúspide mínima e sincondrose de costela cervical com T1.

A deleção em 4q13.3 do nosso paciente 50 é significativa com 1,3Mb. A disostose mandibulofacial com alopecia, está relacionada com região próxima 4q31, onde se encontra o gene da endotelina A (*EDNRA*), responsável pela síndrome. Apesar do quadro clínico ser no mesmo campo de desenvolvimento para as duas síndromes, a distância genômica é importante entre estas duas regiões.

Nossa paciente de número 22, nos foi encaminhada aos seis meses, por apresentar dermóide epibulbar à esquerda, apêndices e pertuito pré-auriculares à esquerda com microtia II e MAE em fundo cego. Ao exame, apresentava ainda macrostomia com cantos da boca para baixo, fenda palatina, retrognatia, sonda nasogástrica, pescoço curto com fechamento incompleto dos corpos vertebrais cervicais, estenose pulmonar, gastrostomia e importante atraso no desenvolvimento neuropsicomotor com convulsões. A descoberta de uma deleção de 13,5 Mb em 4p16.3 com uma duplicação de 8,7 Mb em Xp22 e a reavaliação clínica agora sem a sonda, nos levou ao diagnóstico de Síndrome de Wolf-Hirschhorn e à busca na literatura da associação deste quadro com o dermóide epibulbar. Não encontramos, após exaustivos esforços, nenhuma descrição na literatura da associação da Síndrome de Wolf-Hirschhorn com dermóide epibulbar, o que nos levou ao primeiro relato publicado. (Bragagnolo et al., 2016)

6.2.2 Cromossomo 19

Em três pacientes (Pacientes 20, 28 e 44) observamos duplicações em 19p13.3, possivelmente VUS e no caso 84, uma duplicação 216 pb em 19p13.11 (19,494,044-19,710,107) possivelmente patogênica. O paciente 28 foi descrito no quadro 3 e o 20 será objeto de discussão posterior por apresentar outra variação no número de cópias no cromossomo 8.

O paciente 84 é do sexo masculino, tem 3 anos e foi encaminhado por apresentar deficiência auditiva profunda à esquerda, diagnosticada ao nascimento. É filho de pais não consanguíneos, com um primo paterno com DA bilateral, cuja mãe (3G) havia tido um AE anterior e durante a gestação do paciente teve sangramento em grande quantidade no 2º e 3º mês de gestação. A criança nasceu a termo sem intercorrências, porém evoluiu com ADNPM. Ao exame, apresentou-se microssômico com prominência da sutura metópica, dolicocefalia, assimetria facial discreta, microtia I, costela cervical à E, raquisquise de C7, hemivértebra entre T1, T2 e T3 e clavículas curtas, além de escoliose e prega palmar única. A figura 6 mostra as características fenotípicas do paciente 84.



Figura 6: Características fenotípicas do paciente 84

Na literatura, o estudo de um paciente com dismorfismos faciais, alterações cardíacas e perda auditiva revelou uma deleção 19p13.3, incluindo genes candidatos para anomalias craniofaciais, como o *GNA11* e *TLE2*, sendo que este último faz parte da via Nodal (Al-Kateb et al., 2010). No banco de dados DECIPHER e ClinGen, casos

com duplicações 19p13.3 semelhantes, foram descritos e essas alterações foram consideradas patogênicas, sendo que em um deles (Paciente 253949 do DECIPHER), alterações faciais foram relatadas, porém não especificadas.

6.2.3 Cromossomo 22

Em nossa coorte, encontramos CNVs da região 22q11.2, consideradas benignas na população normal, em 41 dos 72 pacientes (57% da amostra), sendo que 39 (54% - 39/72) duplicações e 3 (4% - 3/72) deleções nessa região. A alta frequência destas alterações no cromossomo 22 nos surpreendeu, pois estas microdeleções ou microduplicações se encontravam em uma região próxima a genes envolvidos no desenvolvimento dos arcos faríngeos, sugerindo que um possível efeito posicional na expressão desses genes, poderia causar o fenótipo do OAVS.

Ressaltamos essas CNVs mesmo benignas, devido à frequência em que ocorreram e por estarem em uma região que contém genes candidatos: o *YPEL1* e o *ERK2*, que participam do desenvolvimento dos arcos faríngeos. Conforme discutido por Beleza-Meireles et al. (2015), a alta incidência de CNVs polimórficas no cromossomo 22, em pacientes com características do OAVS, deve ser considerada, pois não é possível descartar a patogenicidade destas variações e nem seu papel nas vias de sinalização, durante o desenvolvimento craniofacial.

Descrevemos o sétimo caso (Paciente 1) de microdeleção em 22q11.2 com características fenotípicas de OAVS da literatura, com a utilização da técnica de *array* genômico (Jackson et al., 2007; Xu et al., 2008; Lafay-Cousin et al., 2009; Tan et al., 2011; Torti et al., 2013; dos Santos et al., 2014). O relato deste caso detalhado foi publicado na *Cytogenetic and Genome Research* (Colovati et al., 2016 - Anexo 6). A figura 7 mostra as características deste paciente, que descrevemos abaixo.



Figura 7: Fenótipo do paciente 1 com deleção de 581 kb em 22q11.21

Paciente do sexo masculino, 9 meses, criança adotada, filho de mãe drogadita usuária de cocaína. A mãe fez uso de cinta (compressão mecânica) para esconder a gestação, tentativa de aborto com medicação desconhecida e teve diagnóstico de hepatite A na gestação. Uma meia irmã materna nasceu com anencefalia. Ao exame, o paciente apresentava peso e estatura abaixo terceiro percentil, microssomia hemifacial à D, micrognatia, microtia III, agenesia do meato auditivo externo e de cadeia ossicular com perda auditiva mista moderada à direita, cavidade glenóide, côndilo e ramo mandibular alterados ao raio X à D, fenda de palato mole pós-forame e fechamento incompleto do corpo vertebral em coluna vertebral, na porção torácica.

A deleção encontrada no paciente incluía 21 genes, porém sem a deleção da região crítica responsável pela Síndrome de Di George.

Os genes candidatos para OAVS da região 22q11.2 (*YPEL1* e *ERK2/MAPK1*) são genes expressos nos arcos faríngeos e associados a alterações cranofaciais e cardíacas, porém encontram-se um pouco distantes (924kb) da região deletada em nosso paciente. Entretanto o gene *CRKL*, que ativa as vias de transformação de fibroblastos e, em modelo animal, causa defeitos craniofaciais, cardíacos e outros derivados da crista neural, encontra-se dentro da região deletada em nosso paciente. Assim consideramos o achado molecular como CNV provavelmente patogênica.

As alterações citogenômicas observadas na região 22q11.2, reforçam a ideia dos trabalhos publicados anteriormente, indicando que essa região é candidata para a ocorrência do OAVS.

6.2.4 Cromossomo X

Em nosso estudo, observamos duas duplicações e duas deleções envolvendo a região Xp22.33, em quatro pacientes (Pacientes 22, 36, 43 e 55). Os pacientes 22 e 55 já foram descritos no quadro 3, sendo que no paciente 22, a influência desta duplicação de 8,7 Mb, resultante de uma translocação materna, foi descrita em detalhes, em artigo exclusivo para o caso (Bragagnolo et al. 2016 – Anexo 5). No caso do paciente de número 55, sua duplicação de apenas 241pb foi considerada como VUS, assim como no caso 43, que apresentou uma pequena deleção de 187pb.

Já o paciente de número 36 apresentou uma grande deleção de 3,3Mb e seu quadro clínico e aspecto fenotípico estão descritos abaixo e podem ser apreciados na figura 8.



Figura 8: Paciente 36 em foto de frente, perfil D e perfil E

Filho de pais não consanguíneos. A mãe teve um aborto espontâneo anterior a gestação do paciente, é etilista social e tabagista e apresentou sangramento no 3º mês de gestação. O paciente do sexo masculino nasceu pré-termo, pequeno para idade gestacional, com orelha direita malformada e hérnia inguinal bilateral. Compareceu à consulta com 13 anos, apresentando assimetria facial, micrognatia, microtia III com agenesia do meato acústico externo e deficiência auditiva condutiva à direita. Ao exame radiológico, apresentou assimetria de ramo mandibular e da fossa glenoide. A deleção em Xp22.33 de nosso paciente 36 foi considerada CNV provavelmente patogênica e englobava o gene *PRKX*, que está relacionado com proliferação, migração celular e formação de vasos na angiogênese (Li et al. 2013).

Na literatura, um paciente diagnosticado com dismorfias craniofaciais (dermóide epibulbar, hipoplasia mandibular e apêndices pré-auriculares) mostrou duplicação de Xp22.33, incluindo o gene *PRKX* (Rooryck et al., 2010).

Laugel-Haushalter et al. (2014) propuseram que o gene *RAS2*, em Xp22.33, seria um modulador do desenvolvimento craniofacial. Sabe-se, porém, que mutações nesse gene estão associadas à síndrome Coffin-Lowry ligada ao X (OMIM #303600).

As deleções e duplicações na região Xp22.33, presentes no DECIPHER e ClinGen, estão todas relacionadas com deficiência intelectual.

6.2.5 Demais cromossomos

Os demais dados citogenômicos encontrados, são discutidos a seguir pela ordem cromossômica.

Nosso paciente 37, do sexo masculino, apresentou uma duplicação da região 2q32.1 de 2,2 Mb (186,743,872-188,985,410). Filho de pais não consanguíneos, a mãe teve diabetes gestacional e infecções urinárias de repetição na gestação. O paciente apresentou hipoglicemia após o nascimento. À avaliação clínica, com 11 anos e meio, apresentou microcefalia, assimetria facial, microtia III com agenesia do meato acústico externo à esquerda e apêndices pré-auriculares bilaterais e na linha entre orelha e o canto da boca à esquerda, orelha média e cadeia ossicular displásicas, com deficiência auditiva leve a moderada, diminuição da mobilidade do palato mole e assimetria do ramo mandibular com envolvimento do nervo facial, sopro cardíaco, além de criptorquidia bilateral, mas o seu desenvolvimento psicomotor é normal e sem convulsões. O fenótipo do paciente pode ser visto na figura 9 abaixo.



Figura 9: Paciente 37 em foto de frente e perfil D e E

Na literatura, há apenas um caso de duplicação 2q32.1 relatado, numa paciente com atraso de desenvolvimento, epilepsia e autismo. A região duplicada desta paciente era recíproca a da síndrome da deleção 2q32-q33. A alteração do número de cópias do nosso paciente foi considerada VUS.

Dois pacientes apresentaram duplicações no cromossomo 3 (pacientes 15 e 18), uma em 3q e outra em 3p, respectivamente. O primeiro paciente (15) tem uma duplicação de 360 kb em 3q28 (188,985,132-189,345,114) e apresentava assimetria

facial ao nascimento, fenda facial 4 de Tessier com agenesia do ponto lacrimal e ectrópio da pálpebra inferior à esquerda, fenda palatina pós-forame, lábio leporino e hipospádia. O fenótipo do paciente pode ser conferido na figura 10.



Figura 10: Paciente 15 em foto de frente e perfil D e E

No DECIPHER, dois pacientes têm sobreposição com a região duplicada de 3q de nosso paciente com alguns dos sinais clínicos presentes neste. Um com face anormal e fissuras orais, porém a duplicação foi considerada benigna (herdada do pai) e outro paciente com hipospádia, assimetria facial e ponte nasal larga e com patogenicidade considerada incerta.

A síndrome de microduplicação 3q29 intersticial, descrita por Lisi et al. (2008) numa família em 3 gerações com 5 membros afetados, apresentava deficiência intelectual de leve a moderada e microcefalia. O significado clínico deste achado ainda é incerto. Na duplicação em 3q28, somente o gene *TPRG1* está envolvido. Esse gene regula uma proteína p63, que está associada com doença coronariana. Recentemente, um paciente com OAVS foi relatado apresentando alteração no cromossomo 3, uma microduplicação em 3q29 e essa região foi relacionada com a via de sinalização craniofacial nodal (Guida et al., 2015). A alteração do número de cópias de nosso paciente engloba a região do gene *TPRG1* e foi considerada VUS.

A paciente 18 do sexo feminino apresentou uma duplicação de 257 kb em 3p13 (71,612,202-71,869,065) e ao exame com 5 anos tinha assimetria facial, microtia bilateral assimétrica, grau III com atresia de MAE e deformidade de cadeia ossicular à direita, macrostomia atresia duodenal, cardiopatia (CIA, CIV e PCA) e desorganização da coluna torácica com hemivértebras e alterações de costelas. A paciente é filha de casal não consanguíneo e a mãe usou álcool e tabaco na gestação. Ao nascimento apresentou anóxia grave, tendo permanecido em ventilação mecânica

por uma semana. O fenótipo da paciente encontra-se na figura 11.



Figura 11: Paciente 18 em foto de frente e perfil D e E

Existem 3 principais genes (*PROK2*, *GPR27*, *EIF4E3*) nesta região, descritos no OMIM, porém nenhum diretamente relacionado com o desenvolvimento craniofacial. No DECIPHER, o paciente 272123 apresenta sobreposição de 84 kb com a região duplicada em nosso paciente e apresenta malformações de orelha externa, olhos encovados, orelhas de implantação baixa, deficiência auditiva e cardiopatia, porém os fenótipos não são coincidentes no restante do quadro clínico. Além disso, sua duplicação foi herdada de um progenitor normal. Em nossa paciente esta alteração genômica foi considerada VUS.

Dois pacientes (20 e 39) de nossa casuística tiveram CNVs no cromossomo 8. A primeira paciente 20 do sexo feminino e com 6 anos de idade, apresentou uma duplicação de 317kb em 8q24.3 (144,636,785-144,953,893). Filha de casal não consanguíneo, mãe tabagista e etilista social, com um AE de outro relacionamento e um filho nascido com extrema prematuridade, que foi a óbito com horas de vida. Ao exame, a paciente apresentava microsomia hemifacial à D, com assimetria e deslocamento orbital, ramo mandibular curto e alterado na forma à D, microtia III à D com agenesia do MAE, do recesso timpânico e da cadeia ossicular, DA condutiva e macrostomia com desvio de rima, como pode-se observar na figura 12, abaixo.



Figura 12: Fotos de frente e perfil da paciente 20

Não há genes descritos no OMIM no exato intervalo da duplicação da paciente, porém muito próximo a ele estão os genes *PUF60* e *SCRIB*, que quando excluídos em modelos animais, foram relacionados a anomalias craniofaciais, microcefalia e coloboma (Dauber et al., 2013). Verheij et al. (2009) descreveram a mutação do gene *PUF60* em dois pacientes com coloboma, alterações cardíacas congênitas, anormalidades dos membros e atraso psicomotor. A síndrome de Verheij (OMIM 625583) é caracterizada por baixa estatura, microcefalia, alterações nos olhos, nariz, boca e pescoço, anomalias cardíacas e renais e de coluna e assim torna-se outro diagnóstico diferencial para OAVS. Nossa paciente de número de 20 tem um quadro restrito a região craniofacial sem acometimento de outros sistemas e órgãos associados. Sua alteração genômica foi considerada CNV provavelmente patogênica.

A paciente 39 é do sexo feminino, 16 anos e tem em 8q13.3, uma deleção de 1,4 Mb incluindo gene *EYA1*, importante para o desenvolvimento craniofacial e responsável pela síndrome Bronquiotorenal (BOR OMIM # 166780) e síndromes alélicas (Otofaciocervical tipo I ou OTFC1 e Branquiótica ou BO). Nossa paciente é filha de pais não consanguíneos e apresentou anoxia moderada ao nascimento, com aspiração de mecônio e permanência em UTI neonatal por 3 dias. Havia feito desobstrução do conduto lacrimal. Evoluiu com ADNPM, microcefalia, deficiência intelectual e insuficiência renal, tendo sido transplantada, porém as alterações do parênquima renal eram adquiridas. Ao exame, apresentava microtia III à D e apêndices e fistulas pré-auriculares e em região cervical à D com deficiência auditiva mista bilateral. Aos exames de imagem, apresentou alterações de cóclea e orelha média, fusão de vértebras cervicais, anomalias de costelas e escápulas, que se aproxima bastante da descrição da síndrome de Otofaciocervical. Neste caso, enfatizamos a dismorfologia reversa, onde as alterações cromossômicas em 8q13.3, envolvendo gene *EYA1*, associada às características dismorfológicas do paciente, nos levaram à conclusão do diagnóstico diferencial como síndrome OTFC1. As características da paciente 39 podem ser observadas na figura 13.



Figura 13: Paciente 39 em fotos de frente e perfil

Nossa paciente 41, sexo feminino, 9 anos, filha de pais não consanguíneos, necessitou de ventilação assistida logo ao nascimento por apresentar defeito de septo átrio-ventricular (CIA, CIV) e PCA, isomerismo cardíaco com hipoplasia de ventrículo direito e atresia pulmonar (valva bicúspide), sendo operada aos 3 dias de vida. Esta paciente apresentou 2 duplicações em 10p13 (220pb) e outra em 10p14 (224pb). Esta região abriga a segunda região crítica para síndrome de Di George, descrita por Daw et al. em 1996, em pacientes com o fenótipo da síndrome e sem deleção em 22q, com sobreposição de deleções em 10p13/10p14, concluindo que havia grande evidência para haploinsuficiência de um ou mais genes em 10p. Lichtner et al. (2000) concluíram tratar-se de uma síndrome de genes contíguos. Nossa paciente 41 apresentava assimetria com microtia II à esquerda e apêndices pré-auriculares que foram retirados, coloboma de pálpebra superior do mesmo lado e ao exame de US de abdome, revelou-se silhueta hepática à E e baço não caracterizado. O fenótipo da paciente 41 pode ser apreciado na figura 14.



Figura 14: Paciente 41 em fotos de frente e perfis

Nosso paciente de número 52, sexo masculino, apresentou uma grande deleção de 7,3Mb em 10q26.2q26.3. Ele é filho de casal não consanguíneo, cuja mãe apresenta deficiência auditiva mista à D e neurosensorial moderada à E, teve um AE anterior ao nascimento do paciente e foi tratada de pneumonia durante a gravidez. O paciente teve anóxia moderada e criptorquidia ao nascimento, necessitando de ventilação assistida. Evoluiu com convulsões desde 3º mês de vida, perda de força no braço E com 1 ano e ADNPM seguido de deficiência cognitiva moderada. Aos 17 anos ao exame, apresentou microssomia, assimetria facial discreta, estrabismo convergente, microftalmia à esquerda com microcórnea, microtia I com cadeia ossicular anormal, perda auditiva mista, paralisia facial, macrostomia, palato ogival,

pescoço curto, malformação de costelas, tórax tubular, hemiparesia de marcha e osteopenia. Ao exame de ressonância magnética de crânio, tinha substância branca cerebral periventricular reduzida e megaventriculia, compatível com sequela de anóxia. A deleção de nosso paciente engloba pelo menos 21 genes listados no OMIM. Na figura 15, podemos observar o fenótipo do paciente.



Figura 15: Fotos do paciente 52 com 1 ano e aos 17 anos

O segmento deletado neste paciente está contido na região que determina a Síndrome da deleção de 10q26 (OMIM#609625), uma síndrome de genes contíguos e que foi assim designada para deleções de pelo menos 600kb em 10q26.2, podendo o ponto de quebra ir de 10q23.3 a 10qter e tendo um quadro clínico bastante polimórfico de acordo com o tamanho da deleção. Nosso paciente apresenta diversos sinais descritos nesta síndrome como ADNPM, retardo de crescimento, distúrbios de linguagem, convulsões, deficiência cognitiva, microcefalia, bossa frontal, facies triangular, assimetria facial, estrabismo, orelhas baixo implantadas, micrognatia, filtrum longo e apagado, lábios finos e criptorquidia. Assim o achado citogenômico do paciente foi considerado patogênico e causal da síndrome da del 10q26.

Dois pacientes (pacientes 49 e 58) apresentaram alterações do numero de cópias na região 16p13, sendo uma duplicação de 1,4Mb em 16p13.11 e uma deleção de 1,9Mb em 16p13.3.

Nossa paciente 49, do sexo feminino, com 14 anos, é filha de casal não consanguíneo, cuja mãe teve sangramento no 3º mês de gestação. Nasceu com dermóide epibulbar à D e apêndices pré-auriculares do mesmo lado com desvio de rima bucal. Ao exame apresentou assimetria facial, paralisia facial, assimetria mandibular e cicatriz cirúrgica pré-auricular D. Ao exame radiológico apresentava 13

pares de costelas à D com escoliose dextrocôncava por presença de hemivértebra entre T12 e T13, além de espinha bífida. Seu fenótipo pode ser observado na figura 16 abaixo.

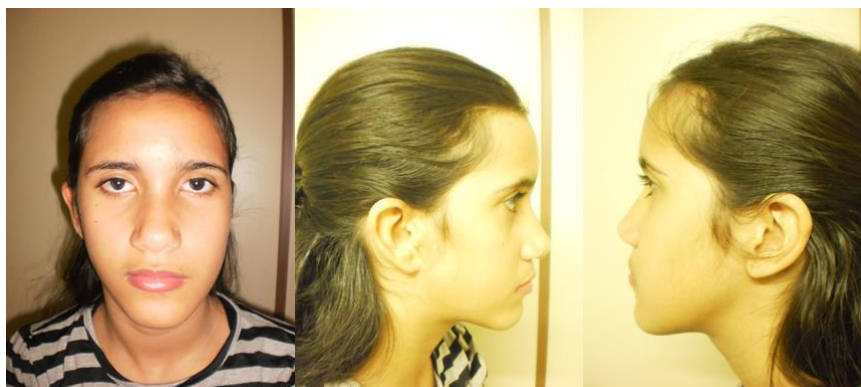


Figura 16: Paciente 49 em foto de frente e perfis

A duplicação em 16p13.11p12.3 da nossa paciente 49, considerada como CNV provavelmente patogênica em nosso estudo, se sobrepõe a dois pacientes descritos no DECIPHER, sendo um deles com uma deleção um pouco maior (1,9Mb) e apresentando assimetria facial, microtia e alteração do MAE, coloboma ocular e alterações vertebrais. Os genes contidos neste intervalo (*NDE1*, *ABCC6* e *MYH11*) são relacionados a síndrome descritas no OMIM, porém sem correlação com o fenótipo de nossa paciente

A paciente 58, do sexo feminino, 19 anos, é filha de casal não consanguíneo, cuja mãe teve 2 AE anteriores à paciente e apresentou ITU e descolamento prematuro de placenta, com sangramento no 6º mês de gestação. Ao nascimento, foi feito o diagnóstico de cardiopatia e traço falciforme. Evoluiu com ADNPM e deficiência cognitiva, além de hipotireoidismo. Aos 19 anos, apresentava assimetria facial com epicanto bilateral, assimetria orbitária, microtia III com ausência de MAE, hipoplasia de orelha média com deformidade de cadeia ossicular e surdez condutiva à D e mista à E, nariz tubular, paralisia facial, micrognatia e macrostomia. Ao exame de RM de crânio, cisto do plexo coroide. A paciente apresentou uma deleção de 1,9Mb em 16p13.3, que foi considerada patogênica. Na literatura, essa região (16p13.3) foi relacionada com o desenvolvimento craniofacial em uma paciente com um rearranjo complexo envolvendo a região 16p13.33 (del-trip-dup) (Gu et al., 2011; Hammond et al., 2014). A deleção de nossa paciente envolve 30 genes listados no OMIM, porém

sem correlação clínica com o seu fenótipo. Abaixo na figura 17, as características fenotípicas da paciente podem ser contempladas.



Figura 17: Paciente 58 em fotos de frente, perfil D e E

Nossa paciente de número 42 tem uma duplicação de 1Mb em 17q11.2. A paciente é do sexo feminino e tem 7 anos e meio, filha de casal não consanguíneo e cuja mãe teve 2AE. Ao exame, a paciente apresentou ADNPM, assimetria facial leve, microtia II à D com agenesia de MAE e DA condutiva à D e algumas manchas “café com leite”. Ao ECO, valva aórtica bicúspide e persistência de veia cava superior. O fenótipo da paciente encontra-se na figura 18 abaixo.



Figura 18: Paciente 42 em fotos de frente e perfis D e E

No DECIPHER, há uma descrição de um paciente com uma duplicação de 2Mb, abrangendo a região duplicada do nosso paciente e que apresenta características comuns a ela, como anomalias da orelha externa com baixa implantação, fronte ampla com implantação alta de cabelo, face hipomímica, filtro longo, micrognatia e deficiência intelectual. Na descrição do DECIPHER, há também ataxia e malformações do sistema nervoso central, que não foram encontradas em nosso paciente. Esta região cromossômica também contém genes para deficiência auditiva neurossensorial isolada autossômica recessiva e o gene NF1, responsável pela

neurofibromatose tipo 1 (OMIM *613113). A duplicação de nossa paciente foi considerada CNV provavelmente patogênica.

É importante enfatizar que todas as CNVs encontradas neste estudo, também foram comparadas a um banco interno de dados de CNVs da UNIFESP, o qual continua sendo alimentado com CNVs presentes na população brasileira saudável. A constante alimentação deste banco, auxiliará no esclarecimento e na conclusão de muitos resultados que ainda estiverem inconclusivos.

Os genes e loci candidatos descritos neste estudo merecem investigações adicionais, considerando que a alteração da arquitetura genômica, pode ser ainda um fator crucial para os mecanismos moleculares e celulares, envolvidos no desenvolvimento do primeiro e segundo arcos faríngeos.

6.3 OAVS e gene *MYT1*

Graças a um estudo colaborativo com pesquisadores do *Service de Génétique Medicale* do *Centre de Référence Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs* de *Bordeaux* na França, três de nossos pacientes (pacientes 13, 28, 44) tiveram associados aos seus quadros clínicos, alterações envolvendo o gene *MYT1* (20q13.33), descrito recentemente por este grupo, relacionando-o ao OAVS (Lopez et al., 2016).

Por estudos funcionais determinou-se que mutações neste gene interferem na via RA do ácido retinóico. Na paciente 44, descrita no quadro 3, foi encontrada uma mutação patogênica “de novo” ainda não descrita. No paciente 28, uma duplicação de 82kb, envolvendo os dois primeiros exons do gene foi encontrada, com ponto de quebra no íntron 2. No paciente 13, a duplicação de 99kb, mostrou ponto de quebra no íntron 1 e no paciente 53, uma duplicação de 89kb a 9kb *upstream* ao gene, o que poderia ter efeito em sua expressão ou modificar a organização espacial da cromatina.

6.4. Limitações do estudo

Mesmo limitando os critérios clínicos de inclusão, não é possível excluir todos os diagnósticos diferenciais do espectro. Uma metodologia molecular mais ampla, que exclua síndromes com genes conhecidos, poderia minimizar esta limitação.

7. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste estudo de acordo com os objetivos propostos, podemos concluir que:

- A grande heterogeneidade clínica dos casos requer uma definição de critérios mínimos de classificação cada vez mais estreitos, sendo assim, a criação de um protocolo específico para o estudo e a realização de exames complementares obrigatórios, como os realizados neste estudo, são importantes na separação dos casos mais leves dos mais graves, o que nos permitiria estudá-los separadamente
- A avaliação citogenômica dos casos nos permitiu a formação de grupos mais homogêneos clinicamente e que possuem alterações citogenômicas específicas como no caso dos pacientes do grupo do cromossomo 4p, com genes importantes para o desenvolvimento craniofacial.
- A confirmação de alteração no gene *MYT1* permitiu a identificação da 3ª mutação em um paciente com características do OAVS com esta alteração gênica nesta amostra.
- A enorme gama de genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial e suas interações são alguns dos principais fatores responsáveis pela variabilidade de quadros clínicos envolvidos com o espectro e síndromes semelhantes. A elucidação destas interações poderá ser o caminho para melhor caracterização de cada síndrome que esteja, no momento, incluída sobre a égide do espectro oculaurículovertebral
- A paciente 22 apresenta características da síndrome de Wolf-Hirschhorn (OMIM #194190) e é o primeiro caso desta síndrome, descrito na literatura, com dermóide epibulbar, uma característica fenotípica para a síndrome de Goldenhar.
- Portanto, as alterações citogenômicas observadas nesse estudo podem contribuir para elucidação da etiologia do fenótipo do OAVS.

- De forma geral, devemos considerar que os rearranjos, que formam deleções ou duplicações, podem culminar em alterações de fenótipo por diversos mecanismos moleculares, principalmente alterando o número de cópias de um gene (ou genes) sensível à dose ou um efeito posicional impactando genes próximos a CNV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelmoity AT, Hall JJ, Bittel DC, Yu S. (2011). 1.39 Mb inherited interstitial deletion in 12p13.33 associated with developmental delay. *Eur J Med Genet.* 54(2):198-203

Aerts S, Lambrechts D, Maity S, Van Loo P, Coessens B, De Smet F, Tranchevent LC, De Moor B, Marynen P, Hassan B, Moreau Y. (2006). Gene prioritization through genomic data fusion. *NatBiotechnol.* 24(5):537-44.

Al-Kateb H, Hahn A, Gastier-Foster JM, Jeng L, McCandless SE, Curtis CA (2010) Molecular characterization of a novel, de novo, cryptic interstitial deletion on 19p13.3 in a child with a cutis aplasia and multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet A.* 152A (12):3148-53.

Ala-Mello S, Siggberg L, Knuutila S, von Koskull H, Taskinen M, Peippo M. (2008) Further evidence for a relationship between the 5p15 chromosome region and the oculoauriculovertebral anomaly. *Am J Med Genet A.* 146A (19):2490-4.

Alasti F & Van Camp G. (2009). Genetics of Microtia and associated syndromes. *J Med Genet* 46:361-369.

Antle CM, Pantzar JT, White VA. (1990). The ocular pathology of trisomy 22: report of two cases and review. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 27(6):310-4.

Attanasio C, Nord AS, Zhu Y, Blow MJ, Li Z, Liberton DK, Morrison H, Plajzer-Frick I, Holt A, Hosseini R, Phouanavong S, Akiyama JA, Shoukry M, Afzal V, Rubin EM, FitzPatrick DR, Ren B, Hallgrímsson B, Pennacchio LA, Visel A. (2013). Fine tuning of craniofacial morphology by distant-acting enhancers. *Science.* 342 (6157):1241006.

Balci S, Engiz O, Yilmaz Z, Baltaci V. (2006) Partial trisomy (11;22) syndrome with manifestations of Goldenhar sequence due to maternal balanced t(11;22). *Genet Couns.* 17(3):281-9.

Ballesta-Martínez MJ, López-González V, Dulcet LA, Rodríguez-Santiago B, García-Miñaur S, Guillen-Navarro E. (2013). Autosomal dominant oculoauriculovertebral spectrum and 14q23.1 microduplication. *Am J Med Genet A*.161A (8):2030-5.

Barisic I, odak L, Loane M, Garne E, Wellesley D, Calzolari E, Dolk H, Addo M-C, Arriola L, Bergman J, Bianca S, Doray B, Khoshnood B, Klungsory K, McDonnell B, Pierini A, Rankin J, Rissmann A, Rounding C, Queisser-Luft A, Scarano G, Tucker D. (2014). Prevalence, prenatal diagnosis and clinical features of oculo-auricul-vertebral spectrum: a registry-based study in Europe. *Eur J Hum Genet* 22:1026-1033.

Beemer FA, de Nef JJ, Delleman JW, Bleeker-Wagemakers EM, Shprintzen RJ.(1986). Additional eye findings in a girl with the velo-cardio-facial syndrome.*Am J Med Genet*. 24(3):541-2.

Beleza-Meireles A, Clayton-Smith J, Saraiva JM, Tassabehji M. (2014). Oculo-auriculo-vertebral spectrum: a review of the literature and genetic update. *J Med Genet*. 51(10):635-45.

Beleza-Meireles A, Hart R, Clayton-Smith J, Oliveira R, Reis CF, Venâncio M, Ramos F, Sá J, Ramos L, Cunha E, Pires LM, Carreira IM, Scholey R, Wright R, Urquhart JE, Briggs TA, Kerr B, Kingston H, Metcalfe K, Donnai D, Newman WG, Saraiva JM, Tassabehji M (2015). Oculo-auriculo-vertebral spectrum: clinical and molecular analysis of 51 patients. *Eur J Med Genet*. 58(9):455-65.

Bennun RD, Mulliken JB, Kaban LB, Murray JE. (1985). Microtia: a microform of hemifacial microsomia. *Plast Reconstr Surg* 76:859–65.

Biesecker LG, Rosenberg M, Dziadzio L, Ledbetter DH, Ning Y, Sarneso C, Rosenbaum K. (1995). Detection of a subtle rearrangement of chromosome 22 using molecular techniques. *Am J Med Genet*. 58(4):389-94.

Blandau RJ. (1954). The effects on development when eggs and sperm are aged before fertilization. *Ann N Y Acad Sci*. Jan 15;57(5):526-30.

Bragagnolo S, Colovati ME, Guilherme RS, Dantas AG, de Souza MZ, de Soares MF, Melaragno MI, Perez AB. (2016). Wolf-Hirschhorn Syndrome with Epibulbar Dermoid: An Unusual Association in a Patient with 4p Deletion and Functional Xp Disomy. *Cytogenet Genome Res.* 150(1):17-22.

Brun A, Cailley D, Toutain J, Bouron J, Arveiler B, Lacombe D, Goizet C, Rooryck C. (2012). 1.5 Mb microdeletion in 15q24 in a patient with mild OAVS phenotype. *Eur J Med Genet.* 55(2):135-9.

Brunskill EW, Potter AS, Distasio A, Dexheimer P, Plassard A, Aronow BJ, Potter SS. (2015). A gene expression atlas of early craniofacial development. *Dev Biol.* 391:133-46.

Callier P, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Marle N, Mosca AL, D'Athis P, Guy J, Masurel-Paulet A, Joly L, Guiraud S, Teyssier JR, Huet F, Mugneret F. (2008). Array-CGH in a series of 30 patients with mental retardation, dysmorphic features, and congenital malformations detected an interstitial 1p22.2-p31.1 deletion in a patient with features overlapping the Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A.* 146 A (16):2109-15.

Carlson BM (2014). *Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento*, 5^a ed. Elsevier Brasil; 520 p.

Castilla EE, Orioli IM. (1986). Prevalence rates of microtia in South America. *Int J Epidemiol.* 15:364-8.

Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE. (1996). Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn.* 206(4):379-90.

Choong YF, Watts P, Little E, Beck L. (2003). Goldenhar and cri-du-chat syndromes: a contiguous gene deletion syndrome? *J AAPOS.* 7:226-7.

Cohen MM Jr (1991). The process of syndrome delineation and the heterogeneity of hearing loss. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;630:133-42.

Colovati MES (2016). Identificação de Regiões Cromossômicas e Genes Candidatos em Pacientes com Características Fenotípicas do Espectro Oculauriculovertebral (OAVS). [Tese] São Paulo. Universidade Federal de São Paulo.

Colovati MES, Bragagnolo S, Guilherme RS, Dantas AG, SoaresMF, Kim CA, Perez ABA, Melaragno MI. (2015). Atypical 581-kb 22q11.21 Deletion in a Patient with Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum Phenotype. *Cytogenet Genome Res* 147:130–134.

Converse, J. M., McCarthy, J. G., Coccato, P. J., et al. (1979). Clinical aspects of craniofacial microsomia. In J. M. Converse, J. G. McCarthy and D. Wood-Smith (Eds.), *Symposium on Diagnosis and Treatment of Craniofacial Anomalies*. St. Louis: Mosby. Pp. 461–462.

Copf T, Rabet N, Averof M. (2006). Knockdown of spalt function by RNAi causes derepression of Hox genes and homeotic transformations in the crustacean *Artemia franciscana*. *Dev Biol.* 298:87-94.

Cousley RR, Wilson DJ. (1992). Hemifacial microsomia: developmental consequence of perturbation of the auriculofacial cartilage model? *Am J Med Genet.* 15;42(4):461-6.

Cousley RR. (1993). A comparison of two classification systems for hemifacial microsomia. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 31(2):78-82.

Couslet & Calvert. (1997). Current concepts in understanding and management of hemifacial microsomia. *Br J Plast Surg* 50:536-551.

Dabir TA, Morrison PJ. (2006). Trisomy 10p with clinical features of facio-auriculo-vertebral spectrum: a case report. *Clin Dysmorphol.* 15(1):25-7.

David, D. J., Mahatumarat, C., and Cooter, R. D. (1987). Hemifacial microsomia: A

multisystem classification. *Plast.Reconstr.Surg.* 80: 525.

Dauber A, Golzio C, Guenot C, Jodelka FM, Kibaek M, Kjaergaard S, Leheup B, Martinet D, Nowaczyk MJ, Rosenfeld JA, Zeesman S, Zurich J, Beckmann JS, Hirschhorn JN, Hastings ML, Jacquemont S, Katsanis N. (2013). SCRIB and PUF60 are primary drivers of the multisystemic phenotypes of the 8q24.3 copy-number variant. *Am J Hum Genet.* 93(5):798-811.

DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. (2003). Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet.* 72(1):156-60.

de Ravel TJ, Legius E, Brems H, Van Hoestenbergh R, Gillis PH, Fryns JP.(2001). Hemifacial microsomia in two patients further supporting chromosomal mosaicism as a causative factor.*Clin Dysmorphol.* 10(4):263-7.

Derbent M, Zerrin Y, Volkan B, Arda S, Birgül V and Kürşat T. (2003). Chromosome 22q11.2 Deletion and Phenotypic Features in 30 Patients With Conotruncal Heart Defects. *Am J Med Genet* 116A:129–135.

Descartes M. (2006) Oculoauriculovertebral spectrum with 5p15.33-pter deletion.*Clin Dysmorphol.* 15(3):153-4.

Devriendt K, Eyskens B, Swillen A, Dumoulin M, Gewillig M, Fryns JP. (1996). The incidence of a deletion in chromosome 22Q11 in sporadic and familial conotruncal heart disease. *Eur J Pediatr.* 155(8):721.

Digilio M, Marino B, Capolino R, Dallapiccola B.(2005). Clinical manifestations of Deletion 22q11.2 syndrome (DiGeorge/Velo-Cardio-Facial syndrome). *Images Paediatr Cardiol.* 7(2):23-34.

Digilio MC, McDonald-McGinn DM, Heike C, Catania C, Dallapiccola B, Marino B, Zackai EH.(2009) Three patients with oculoauriculo-vertebral spectrum and

microdeletion 22q11.2. Am J Med Genet Part A 149A:2860–2864.

dos Santos, PAC; Freitas, EL; Safatle, HPN; Rosenberg, C; Ferrari, I; Oliveira, SF; Mazzeu, JF.(2012). Array-CGH analysis in patients with Goldenhar syndrome. Annual meeting of American Society of Human Genetics, 2012,pg 149.

dos Santos PA, de Oliveira SF, Freitas EL, Safatle HP, Rosenberg C, Ferrari I, Mazzeu JF. (2014). Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. Am J Med Genet A. 164A (2):551-3.

Eicher PS, McDonald-McGinn DM, Fox CA, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH. (2000). Dysphagia in children with a 22q11.2 deletions: unusual pattern found on modified barium swallow.J Pediatr. 137(2):158-64.

Farra C, Yunis K, Yazbeck N, Majdalani M, Charafeddine L, Wakim R, Awwad J. (2011). A Lebanese family with autosomal recessive oculo-auriculo-vertebral (OAV) spectrum and review of the literature: is OAV a genetically heterogeneous disorder? Appl Clin Genet. 6;4:93-7.

Ferraris S, Silengo M, Ponzzone A, Perugini L. (1999) Goldenhar anomaly in one of triplets derived from in vitro fertilization. Am J Med Genet. 84(2):167-8.

Fischer S, Lüdecke HJ, Wieczorek D, Böhringer S, Gillissen-Kaesbach G, Horsthemke B. (2006). Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of BAPX1 in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. Hum Molec Genet 15: 581-587.

Garavelli L, Viridis R, Donadio A, Sigorini M, Banchini G, Balestrazzi P, Fryns JP. (1999). Oculo-auriculo-vertebral spectrum in Klinefelter syndrome. Genet Couns.10(3):321-4.

GeneReviews – NCBI BOOKSHELF <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5199/>
Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 (**Craniofacial Microsomia**

Overview.) Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al. editors, 2011

Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y (2003). In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet.* 72(5):1338-41.

Gijsbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA. (2011). Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res.*135:222-7.

Gillespie RL, Urquhart J, Lovell SC, Biswas S, Parry NR, Schorderet DF, Lloyd IC, Clayton-Smith J, Black GC. (2015). Abrogation of HMX1 function causes rare oculoauricular syndrome associated with congenital cataract, anterior segment dysgenesis, and retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 56(2):883-91.

Gimelli S, Cuoco C, Ronchetto P, Gimelli G, Tassano E. (2013). Interstitial deletion 14q31.1q31.3 transmitted from a mother to her daughter, both with features of hemifacial microsomia. *J Appl Genet.* 54(3):361-5.

Gittins V, Kasraie J. (2010) Case report: Goldenhar syndrome following donor oocyte IVF. *J Assist Reprod Genet.* 27(910):561-3.

Goodin K, Prucka S, Woolley AL, Kohlhase J, Smith RJ, Grant J, Robin NH. (2009) Familial transmission of oculoauriculovertebral spectrum (Goldenhar syndrome) is not due to mutations in either EYA1 or SALL1. *Am J Med Genet A.*149A (3):535-8.

Goldenhar M. (1952). Associations malformatives de l'oeillet de l'oreille: en particulier, le syndrome: dermoïde epibulbaire-appendices auriculaires—fistula auris congênita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J Genet Hum* 1: 243-282.

Gorlin RJ, Jue KL, Jacobsen U, Goldschmidt E. (1963). Oculoauriculovertebral dysplasia. *J Pediatr* 63: 991-999.

Gorlin, R. J., Cohen, M. M., and Hennekam, R. C. M. (2001) *Syndromes of the Head and Neck*. New York: Oxford University Press, Pp. 790–79

Gougoutas AJ, Singh DJ, Low DW, Bartlett SP. (2007). Hemifacial microsomia: clinical features and pictographic representations of the OMENS classification system. *Plast Reconstr Surg* 120:112e–20e.

Grabb WC. (1965). The first and second branchial arch syndrome. *Plast Reconstr Surg* 36:485–508.

Grammatopoulos GA, Bell E, Toole L, Lumsden A, Tucker AS. (2000). Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Development*. 127:5355-65.

Gu J, Sreenath Nagamani SC, Hopwood VL, Sanchez B, Saeidinejad Y, Ou Z, Peacock S, Grange DK, Stankiewicz P, Cheung SW. (2011). Complex genomic rearrangement of chromosome 16p13.3 detected by array comparative genomic hybridization in a patient with multiple congenital anomalies, dysmorphic craniofacial features, and developmental delay. *Am J Med Genet A*. 155A(10):2589-92.

Guida N, Laudati G, Anzilotti S, Secondo A, Montuori P, Di Renzo G, Canzoniero LM, Formisano L. (2015). Resveratrol via sirtuin-1 downregulates RE1-silencing transcription factor (REST) expression preventing PCB-95 induced neuronal cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*. 288(3):387-98.

Guo C, Sun Y, Zhou B, Adam RM, Li X, Pu WT, Morrow BE, Moon A, Li X. (2011). A *Tbx1-Six1/Eya1-Fgf8* genetic pathway controls mammalian cardiovascular and craniofacial morphogenesis. *J Clin Invest*. 121(4):1585-95. Erratum in: *J Clin Invest*. 121(5):2060.

Hall JG. (2003). Twinning. *Lancet*. 362(9385):735-43. Review

Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, Amor JD (2004). Beckwith-Wiedemann

syndrome and IVF: a case control study. *Am J Hum Genet* 75:526–528.

Hammond P, McKee S, Suttie M, Allanson J, Cobben JM, Maas SM, Quarrell O, Smith AC, Lewis S, Tassabehji M, Sisodiya S, Mattina T, Hennekam R.(2014). Opposite effects on facial morphology due to gene dosage sensitivity. *Hum Genet.* 133(9):1117-25.

Harvold EP, Vargervik K, Chierici G (1983). Treatment of hemifacial macrosomia. New York. Allan R Liz , Inc.

Hathout EH, Elmendorf E, Bartley J. (1998). Hemifacial Microsomia and Abnormal Chromosome 22. *Am J Med Genet* 76:71–73.

Heike CL, Luquetti DV, Hing AV, Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K. (1993-2016). Craniofacial Microsomia Overview. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Herman GE, Greenberg F, Ledbetter DH. (1988). Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndrome With Goldenhar Complex Due to a Terminal Del(22q). *Am J Med Genet* 29:909-915.

Hoyme HE, Higginbottom MC, Jones KL (1981). Vascular etiology of disruptive structural defects in monozygotic twins. *Pediatrics* 67:288–291.

Huang XS, Xiao L, Li X, Xie Y, Jiang HO, Tan C, Wang L, Zhang JX. (2010). Genome-Wide Scanning Reveals Complex Etiology of Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum. *Tohoku J Exp Med* 222(4):311-318.

ISCN (2013): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. (eds); Karger, Basel, 2013.

Jackson EM, Shaikh TH, Gururangan S, Jones MC, Malkin D, Nikkel SM, Zuppan

CW, Wainwright LM, Zhang F, Biegel JA. (2007). High-density single nucleotide polymorphism *array* analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Human Genetics* 122 (2): 117-127.

Jakobiec FA, Pineda R, Rivera R, Hsu-Winges C, Cherwek D.(2010). Epicorneal polypoidal lipodermoid: lack of association of central corneal lesions with goldenhar syndrome verified with a review of the literature. *Surv Ophthalmol.* 55(1):78-84.

Johnson JM, Moonis G, Green GE, Carmody R, Burbank, HN. (2011). Syndromes of the first and Second Branchial Arches, Part2: Syndromes. *Am J Neuroradiol* 32:230-37.

Jongbloet PH (1987) Goldenhar syndrome and overlapping dysplasia, in vitro fertilisation and ovopathy. *J Med Genet* 24:616–620.

Josifova DJ, Patton MA, Marks K (2004). Oculoauriculovertebral spectrum phenotype caused by an unbalanced t(5;8)(p15.31;p23.1) rearrangement. *Clin Dysmorphol.* 13(3):151-3.

Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. (1981). Three-dimensional approach to analysis and treatment of hemifacial microsomia. *Cleft Palate J* 18(2):90-9.

Kaban LB, Moses MH, Mulliken JB. (1988) Surgical correction of hemifacial microsomia in the growing child. *Plast Reconstr Surg.* 82(1):9-19.

Kaye CI, Martin AO, Rollnick BR, Nagatoshi K, Israel J, Hermanoff M, Tropea B, Richtsmeier JT, Morton NE. (1992) Oculoauriculovertebral anomaly: segregation analysis. *Am J Med Genet.* 43(6):913-7

Keegan CE et al. (2001). Townes-Brocks syndrome versus expanded spectrum hemifacial microsomia: review of eight patients and further evidence of a "hot spot" for mutation in the SALL1 gene. *Genet Med* 3:310–3.

Kelbermann et al. (2001). Hemifacial microsomia; Progress In Understanding The Genetic Basis Of Complex Malformation Syndrome. *Hum Genet* 109:638-645.

Keusch CF, Mulliken JB, Kaplan LC (1991). Craniofacial anomalies in twins. *Plast Reconstr Surg* 87:16–23.

Kirby ML, Waldo KL. (1990). Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation*. 82(2):332-40.

Kobrynski L, Chitayat D, Zahed L, McGregor D, Rochon L, Brownstein S, Vekemans M, Albert DL.(1993). Trisomy 22 and facioauriculovertebral (Goldenhar) sequence. *Am J Med Genet*. 46(1):68-71. Review

Kosaki R, Fujimaru R, Samejima H, Yamada H, Izumi K, Iijima K, Kosaki K. (2007). Wide phenotypic variations within a family with SALL1 mutations: Isolated external ear abnormalities to Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A*. 143A(10):1087-90.

Ladekarl S.(1968). Combination of Goldenhar's syndrome with the Cri-Du-Chat syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 46(3):605-10.

Lafay-Cousin L, Payne E, Strother D, Chernos J, Chan M, Bernier FP. (2009). Goldenhar phenotype in a child with distal 22q11.2 deletion and intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor. *Am J Med Genet Part A* 149A:2855–2859.

Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT. (1985). Retinoic acidembryopathy. *N Engl J Med*. 313(14):837-41.

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

Laugel-Haushalter V, Paschaki M, Marangoni P, Pilgram C, Langer A, Kuntz T, Demassue J, Morkmued S, Choquet P, Constantinesco A, Bornert F, Schmittbuhl M,

Pannetier S, Viriot L, Hanauer A, Dollé P, Bloch-Zupan A. (2014). RSK2 is a modulator of craniofacial development. *PLoS One*. 9(1): e84343.

Lauritzen,C.,Munro,I.R.,and Ross,B.R.(1985). Classification and treatment of hemifacial microsomia. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 19: 33, 1985.

Lessick M, Vasa R, Israel J. (1991). Severe manifestations of oculoauriculovertebral spectrum in a cocaine exposed infant. *J Med Genet.* 28(11):803-4.

Li X, Iomini C, Hyink D, Wilson PD. (2013). PRKX critically regulates endothelial cell proliferation, migration, and vascular-like structure formation. *Dev Biol.* 381:502.

Li X, Hu J, Zhang J, Jin Q, Wang DM, Yu J, Zhang Q, Zhang YB. (2014). Genome-wide linkage study suggests a susceptibility locus for isolated bilateral microtia on 4p15.32-4p16.2. *PLoS One*. 9(7):e101152.

Lisi EC1, Hamosh A, Doheny KF, Squibb E, Jackson B, Galczynski R, Thomas GH, Batista DA (2008). 3q29 interstitial microduplication: a new syndrome in a three-generation family. *Am J Med Genet A.* 146A(5):601-9.

Lopez E, Berenguer M, Tingaud-Sequeira A, Marlin S, Toutain A, Denoyelle F, Picard A, Charron S, Mathieu G, de Belvalet H, Arveiler B, Babin PJ, Lacombe D, Rooryck C. (2016). Mutations in MYT1, encoding the myelin transcription factor 1, are a rare cause of OAVS. *J Med Genet.* 103774.

Low JS, Chin YM, Mushiroda T, Kubo M, Govindasamy GK, Pua KC, Yap YY, Yap LF, Subramaniam SK, Ong CA, Tan TY, Khoo AS; Malaysian NPC Study Group, Ng CC. (2016). A Genome Wide Study of Copy Number Variation Associated with Nasopharyngeal Carcinoma in Malaysian Chinese Identifies CNVs at 11q14.3 and 6p21.3 as Candidate Loci. *PLoS One*. 11(1):e0145774.

Lüdecke HJ, Schmidt O, Nardmann J, von Holtum D, Meinecke P, Muenke M, Horsthemke B. (1999). Genes and chromosomal breakpoints in the Langer-Giedion

syndrome region on human chromosome 8. *Hum Genet.* 105(6):619-28.

Luquetti DV, Heike CL, Hing AV, Cunningham ML, Cox TC. (2012). Microtia: Epidemiology and Genetics. *Am J Med Genet Part A* 158A:124-139.

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

Maher ER, Brueton LA, Bodin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W et al (2003). Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 40:62–64.

Melnick M, Myrianthopoulos NC, Paul NW. (1979). External ear malformations: epidemiology, genetics, and natural history. *Birth Defects Orig Artic Ser*15: i–ix,1-140.

Minnes S, Robin NH, Alt AA, Kirchner HL, Satayathum S, Salbert BA, Ellison L, Singer LT. (2006). Dysmorphic and anthropometric outcomes in 6-year-old prenatally cocaine-exposed children. *Neurotoxicol Teratol.* 28(1):28-38.

Minoux M, Rijli FM. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development.* 137(16):2605-21.

Miller R, Stephan MJ, Hume RF, Walker WO, Kelly P, Calhoun BC, Hoeldtke NJ, Hayden JE, Martin LS. (2001). Extreme elevation of maternal serum alpha-fetoprotein associated with mosaic trisomy 8 in a liveborn. *Fetal Diagn Ther.* 16(2):120-2.

Ming JE, McDonald-McGinn DM, Megerian TE, Driscoll DA, Elias ER, Russell BM, Irons M, Emanuel BS, Markowitz RI, Zackai EH. (1997). Skeletal anomalies and deformities in patients with deletions of 22q11. *Am J Med Genet.* 72(2):210-5.

Mlynarski EE, Xie M, Taylor D, Sheridan MB, Guo T, Racedo SE, McDonald-McGinn DM, Chow EW, Vorstman J, Swillen A, Devriendt K, Breckpot J, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B, Philip N, Simon TJ, Roberts AE, Piotrowicz M, Bearden CE, Eliez S, Gothelf D, Coleman K, Kates WR, Devoto M, Zackai E, Heine-Suñer D, Goldmuntz E, Bassett AS, Morrow BE, Emanuel BS; International Chromosome 22q11.2 Consortium. (2016). Rare copy number variants and congenital heart defects in the 22q11.2 deletion syndrome. *Hum Genet.* 135(3):273-85.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *Embriologia Clínica*. 10° ed. (2016) Rio de Janeiro. Elsevier Editora

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 20:613-6.

Neu KW, Friedman JM, Howard-Peebles PN. (1982). Hemifacial microsomia in cri du chat (5p-) syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 2(4):295-8.

Nicot R, Hottenstein M, Raoul G, Ferri J, Horton M, Tobias JW, Barton E, Gelé P, Sciote JJ. (2015). Nodal pathway genes are down-regulated in facial asymmetry. *J Craniofac Surg.* 25:e548-55.

Northup JK, Matalon D, Hawkins JC, Matalon R, Velagaleti GV. (2010). Pericentric inversion, inv(14)(p11.2q22.3), in a 9-month old with features of Goldenhar syndrome. *Clin Dysmorphol.* 19(4):185-9.

Newbern J, Zhong J, Wickramasinghe RS, Li X, Wu Y, Samuels I, Cherosky N, Karlo JC, O'Loughlin B, Wikenheiser J, Gargasha M, Doughman YQ, Charron J, Ginty DD, Watanabe M, Saitta SC, Snider WD, Landreth GE. (2008). Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(44):17115-20.

Online Mendelian Inheritance in Man (online). Johns Hopkins University 2012

Disponível em: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>(OAV 164210; OAVS 144210)

Opitz JM. The developmental field concept. (1985). Am J Med Genet. 21(1):1-11

Opitz JM. (1986) Developmental field theory and observations--accidental progress? Am J Med Genet Suppl. 2:1-8. Review.

Opitz JM, Lewin SO.(1987). The developmental field concept in pediatric pathology--especially with respect to fibular a/hypoplasia and the DiGeorge anomaly. Birth Defects Orig Artic Ser. 23(1):277-92.

Ou Z, Martin DM, Bedoyan JK, Cooper ML, Chinault AC, Stankiewicz P, Cheung SW. (2008) Branchiootorenal syndrome and oculoauriculovertebral spectrum features associated with duplication of SIX1, SIX6, and OTX2 resulting from a complex chromosomal rearrangement. Am J Med Genet A. 146A(19):2480-9.

Pachajoa H, Rodríguez CA, Isaza C. (2010). Hemifacial microsomia (oculo-auriculo-vertebral spectrum) in Pre-Hispanic Tumaco-La Tolita ceramic culture (300 b.C. to 600 a.C.). Arch Soc Esp Oftalmol. 85:154-5.

Parada C, Han D, Grimaldi A, Sarrión P, Park SS, Pelikan R, Sanchez-Lara PA, Chai Y.(2015). Disruption of the ERK/MAPK pathway in neural crest cells as a potential cause of Pierre Robin sequence. Development. 142(21):373445.

Pison G, D'Addato AV (2006) Frequency of twin births in developed countries. Twin Res Hum Genet. 9(2):250-9.

Pizzuti A, Novelli G, Ratti A, Amati F, Mari A, Calabrese G, Nicolis S, Silani V, Marino B, Scarlato G, Ottolenghi S, Dallapiccola B (1997). UFD1L, a developmentally expressed ubiquitination gene, is deleted in CATCH 22 syndrome. Hum Mol Genet 6(2):259-65.

Poonawalla HH, Kaye CI, Rosenthal IM, Pruzansky S.(1980) Hemifacial microsomia

in a patient with Klinefelter syndrome. *Cleft Palate J.* 17(3):194-6.

Poswillo D. (1973). The pathogenesis of the first and second branchial arch syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 35(3):302-28.

Pridjian G, Gill WL, Shapira E. (1995). Goldenhar Sequence and Mosaic Trisomy 22. *Am J Med Genet* 59: 411-413.

Pruzansky, S. (1969) Not all dwarfed mandibles are alike. *Birth Defects* 1: 120.

Quintero-Rivera F, Martinez-Agosto JA. (2013). Hemifacial microsomia in cat-eye syndrome: 22q11.1-q11.21 as candidate loci for facial symmetry. *Am J Med Genet A.* 161A:1985-91.

Rao VB, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K, Mohanty D. (2005). Maternal origin of extra marker chromosome 1Q31.1-qter and 13pter-q12.12 in a child with dysmorphic features. *Genet Couns.* 16(2):139-43.

Raft S, Nowotschin S, Liao J, Morrow BE. (2004). Suppression of neural fate and control of inner ear morphogenesis by Tbx1. *Development.* 131(8):1801-12.

Roesch C, Steinbicker V, Korb C, von Rohden L, Schmitt J. (2001). Goldenhar anomaly in one triplet derived from intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Am J Med Genet* 101(1):82-3.

Rollnick BR, Kaye CI. (1983). Hemifacial microsomia and variants: pedigree data. *Am J Med Genet.* 15(2):233-53.

Rollnick BR. (1988). Oculoauriculovertebral anomaly: variability and causal heterogeneity. *Am J Med Genet Suppl* 4:41–53.

Rooryck C, Stef M, Burgelin I, Simon D, Souakri N, Thambo JB, Chateil JF, Lacombe D, Arveiler B. (2009). 2.3 Mb terminal deletion in 12p13.33 associated with

oculoauriculovertebral spectrum and evaluation of WNT5B as a candidate gene. *Eur J Med Genet.* 52(6):446-9.

Rooryck C, Souakri N, Cailley D, Bouron J, Goizet C, Delrue MA, Marlin S, Lacombe FD, Arveiler B. (2010). *ArrayCGH Analysis of Cohort of 86 patients with Oculoauriculovertebral Spectrum.* *Am J Med Genet Part A* 152A: 1984-1989.

Rooryck C, VuPhi Y, Souakri N, Burgelin I, Saura R, Lacombe D, Arveiler B, Taine L. (2010). Characterization of a de novo balanced translocation t(9;18)(p23;q12.2) in a patient with oculoauriculovertebral spectrum. *Eur J MedGenet.* 53(2):104-7.

Rosa RF, Mombach R, Zen PR, Graziadio C, Paskulin GA. (2010). Clinical characteristics of a sample of patients with cat eye syndrome. *Rev Assoc Med Bras.* 56(4):462-5.

Rosário HB (2012). Nascimentos gemelares no Hospital do Servidor Publico Estadual de São Paulo entre os anos de 1978 a 2009: Prevalência e Fatores Associados [Tese] São Paulo. Unversidade Presbiteriana Mackenzie

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

Sanchez O, Escobar JI, Yunis JJ. (1973). A simple G-banding technique. *Lancet.* 2(7823):269.

Saraux, H., Grignon, J.-L., Dhermy, P. (1963). A propos d'une observation familiale de syndrome de Franceschetti-Goldenhar. *Bull Soc Ophtal Franc* 63: 705-707.

Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. (2001). Evolutionarily conserved low

copyrepeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med.*3(1):6-13.

Shao R, Liu J, Yan G, Zhang J, Han Y, Guo J, Xu Z, Yuan Z, Liu J, Malumbres M, Wan L, Wei W, Zou W. (2016). Cdh1 regulates craniofacial development via APC-dependent ubiquitination and activation of Goosecoid. *Cell Res.* 26(6):699-712.

Shaikh TH, Kurahashi H, Saitta SC, O'Hare AM, Hu P, Roe BA, Driscoll DA, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Budarf ML, Emanuel BS. (2000). Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet.* 9(4):489-501.

Sharma N, Passi S. (2013). Goldenhar syndrome. *Indian J Dent Res.* 24(1):149.

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

Smits J & Monden C.(2011). Twinning across the Developing World. *PLoS One* 6(9):e25239.

Stankiewicz P & Lupski JR. (2002). Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18:74– 82.

Stankiewicz P & Lupski JR. (2010). Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 61:437-55.

Stewart FJ, Nevin NC, Brown S.(1993) Axial mesodermal dysplasia spectrum. *Am J Med Genet.* 45(4):426-9. Review

Szabo-Rogers HL, Smithers LE, Yakob W, Liu KJ. (2010). New directions in craniofacial morphogenesis. *Dev Biol.* 341(1):84-94.

Su PH, Yu JS, Chen JY, Chen SJ, Li SY, Chen HN (2007). Mutations and new

polymorphic changes in the TCOF1 gene of patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and Treacher-Collins syndrome. *Clin Dysmorphol* 16:261–7.

Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, Temple K, Reardon W, Wilson L, Clayton-Smith J, Brueton LA, Bannister W, Maher ER (2006). Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey. *Hum Reprod* 21:1009–1011.

Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z, Gordon CT, Leventer RJ, Pope K, Forbes R, Crolla JA, Ganesamoorthy D, Burgess T, Bruno DL, Slater HR, Farlie PG, Amor DJ. (2011). Phenotypic Variability of Distal 22q11.2 Copy Number abnormalities. *Am J Med Genet Part A* 155:1623–1633.

Tan TY, Gordon CT, Miller KA, Amor DJ, Farlie PG. (2015). YPEL1 overexpression in early avian craniofacial mesenchyme causes mandibular dysmorphogenesis by up-regulating apoptosis. *Dev Dyn*. 244(8):1022-30.

Tasse C, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Albrecht B, Horn D, Janecke A, Kling R, König R, Lorenz B, Majewski F, Maeyens E, Meinecke P, Mitulla B, Mohr C, Preischl M, Umstadt H, Kohlhasse J, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D. (2005). Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for new classification. *Eur J Med Genet* 48:397:411.

Tasse C, Majewski F, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D. (2007). A family with autosomal dominant oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Clin Dysmorphol* 16:1–7.

Teconi R & Hall B. (1983). Hemifacial microsomia: Phenotypic classification, clinical implications and genetic aspects. In: Harvold E, ed. *Treatment of Hemifacial Microsomia*. New York: Alan R Liss:39-49.

Torti EE, Braddock SR, Bernreuter K, Batanian JR. (2013). Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum, Cat Eye, and Distal 22q11 Microdeletion Syndromes: A Unique Double Rearrangement. *Am J Med Genet Part A* 161A(8):1992-8.

Van Mierop LH & Kutsche LM. (1986). Cardiovascular anomalies in DiGeorge syndrome and importance of neural crest as a possible pathogenetic factor. *Am J Cardiol.* 58(1):133-7.

Vendramini-Pittoli S, Kokitsu-Nakata NM.(2009). Oculoauriculovertebral spectrum: report of nine familial cases with evidence of autosomal dominant inheritance and review of the literature. *Clin Dysmorphol*;18:67–77.

Vento, A. R., LaBrie, R. A., and Mulliken, J. B. (1991) The O.M.E.N.S. classification of hemifacial microsomia. *Cleft Palate Craniofac. J.* 28: 68.

Vitelli F & Baldini A. (2003). Generating and modifying DiGeorge syndrome-like phenotypes in model organisms: is there a common genetic pathway? *Trends Genet.* 19(11):588-93.

Wang R, Martínez-Frías ML, Graham JM Jr. (2002). Infants of diabetic mothers are at increased risk for the oculo-auriculo-vertebral sequence: A case-based and case-control approach. *J Pediatr.* 141(5):611-7.

Wang W, Jian Y, Cai B, Wang M, Chen M, Huang H. (2016). All-Trans Retinoic Acid-Induced Craniofacial Malformation Model: A Prenatal and Postnatal Morphological Analysis. *Cleft Palate Craniofac J.* [Epub ahead of print]

Werler MM, Sheehan JE, Hayes C, Mitchell AA, Mulliken JB. (2004). Vasoactive exposures, vascular events, and hemifacial microsomia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70:389–95.

Wieczorek D, Ludwig M, Boehringer S, Jongbloet PH, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. (2007). Reproduction abnormalities and twin pregnancies in parents of sporadic patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum/Goldenhar syndrome. *Hum Genet.* 121:369–76.

Wilson GN, Barr M Jr. (1983) Trisomy 9 mosaicism: another etiology for the manifestations of Goldenhar syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 3(4):313-6.

Xu J, Fan YS, Siu VM. (2008). A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide *array* CGH: Is this a candidate region for the syndrome? *Am J Med Genet Part A* 146A:1886–1889.

Yamagishi H & Srivastava D. (2003). Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome. *Trends Molec Med* 9(9):383-389.

Yang Y, Guo J, Liu Z, Tang S, Li N, Yang M, Pang Q, Fan F, Bu J, Yuan ST, Xiao X, Chen Y, Zhao K. (2006). A locus for autosomal dominant accessory auricular anomaly maps to 14q11.2-q12. *Hum Genet* 120: 144-147.

Yovich JL, Stanger JD, Grauaug AA, Lunay GG, Dawkins RL, Mulcahy MT (1985). Fetal abnormality (Goldenhar syndrome) occurring in one of triplet infants derived from in vitro fertilisation with possible monozygotic twinning. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 2:27–32.

Zeitz MJ, Lerner PP, Ay F, Van Nostrand E, Heidmann JD, Noble WS, Hoffman AR. (2013). Implications of COMT long-range interactions on the phenotypic variability of 22q11.2 deletion syndrome. *Nucleus*.4(6):487-93.

Zielinski D, Markus B, Sheikh M, Gymrek M, Chu C, Zaks M, Srinivasan B, Hoffman JD, Aizenbud D, Erlich Y. (2014). OTX2 duplication is implicated in hemifacial microsomia. *PLoS One*. 9(5): e96788.

Anexo 1 - Termo De Consentimento Livre E Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO SÍNDROME DE GOLDENHAR: ESTUDO CLÍNICO E CITOGENÔMICO

A Síndrome de Goldenhar é uma doença genética que causa malformações na face como diferença entre os dois lados do rosto e malformações de orelha. Podem ainda aparecer problemas nos olhos e ossos do pescoço. Vários fatores estão associados à doença como o uso de certos remédios, sangramento e diabetes na gravidez, baixo peso ao nascimento. Estas situações podem acontecer junto com características genéticas.

Os objetivos deste estudo são:

- 1) Examinar os pacientes encaminhados ao Centro de Genética Médica com características típicas em face e orelhas, e verificar quais podem ser classificados como a síndrome através de comparações com medidas já determinadas nos trabalhos científicos anteriores;
- 2) Realizar estudo dos cromossomos (estruturas que carregam a informação genética) destes pacientes;
- 3) Estudar variações genéticas que aparecem em alguns destes cromossomos e genes que possam estar alterados;
- 4) Verificar a importância e necessidade da realização de exames laboratoriais nos casos de Síndrome de Goldenhar.

Para isso, os pacientes com diagnóstico da síndrome serão avaliados de acordo como protocolo clínico, serão fotografados para melhor caracterização de suas características físicas, apresentação em congressos e publicação científica exclusivamente.

Para o estudo genético, serão coletados cerca de 15 mL de sangue da veia do antebraço, uma única vez, com material estéril e descartável. Não é necessário jejum. Os desconfortos da punção podem ser dor e vermelhidão local, considerados sem complicação clínica.

Não haverá qualquer custo ou despesa para o paciente ou seu(s) responsável(s). Também não haverá nenhum tipo de compensação financeira referente à sua participação e os resultados obtidos poderão ser consultados a qualquer momento.

As amostras coletadas serão utilizadas exclusivamente para este estudo, sendo desprezadas após sua conclusão.

Os pesquisadores envolvidos comprometem-se a proteger a privacidade dos participantes e a utilizar os dados clínicos, laboratoriais e a documentação fotográfica somente para pesquisa e publicação científica.

Em qualquer etapa do estudo, os profissionais responsáveis estarão à disposição para esclarecer eventuais dúvidas. É garantida ao participante, a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Os principais investigadores são a Profa. Dra. Ana Beatriz Alvarez Perez e a pesquisadora Dra. Silvia Bragagnolo, que podem ser contatadas por e-mail (sbragagnolo@unifesp.br e anabia.morf@epm.br), pelo telefone 5085.0188, ou no Centro de Genética Médica, situada à Rua Coronel Lisboa, no 966, CEP 04020-041, São Paulo, Capital.

No caso de alguma consideração ou qualquer dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- Rua Botucatu, 572- 1º andar cj 14, telefone: 5571-1062, FAX: 5539-7162, E-mail: cepunifesp@epm.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo essa investigação clínica.

Eu discuti com a Dr(a)..... sobre a minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus riscos e desconfortos, as garantias de confiabilidade e de esclarecimentos permanentes.

Nome do paciente	_____	Data
------------------	-------	------

Assinatura do(a) paciente ou representante legal	_____	Data
---	-------	------

Assinatura da testemunha	_____	Data
-----------------------------	-------	------

Assinatura do responsável pelo estudo	_____	Data
--	-------	------

Anexo 2 – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/ Hospital São Paulo

PROJETO DE PESQUISA

Título: SÍNDROME DE GOLDENHAR: ESTUDO CLÍNICO E CITOGENÔMICO

Área Temática:

Pesquisador: SILVIA BRAGAGNOLO

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de São Paulo -
UNIFESP/EPM

CAAE: 03493312.0.0000.5505

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 66348

Data da Relatoria: 13/08/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer 56512 de 16/7/2012

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer 56512 de 16/7/2012

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer 56512 de 16/7/2012

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer 56512 de 16/7/2012

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer 56512 de 16/7/2012

Recomendações:

Conforme parecer 56512 de 16/7/2012

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pendencias atendidas. Projeto pode ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acatou o parecer do relator. Projeto aprovado.

SAO PAULO, 03 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

Anexo 3 – Protocolo de Avaliação Clínica

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO PAULO

CENTRO DE GENÉTICA MÉDICA

PROTOCOLO DE PESQUISA SÍNDROME DE GOLDENHAR

Data: ____/____/____

CGM: _____

DN _____/_____/_____

Idade: _____

RG HSP: _____

Nome: _____ Sexo _____

Natural: _____ Ocupação: _____ Esc: _____

Pai: _____ Idade: _____

Natural: _____ Ocupação: _____ Esc: _____

Mãe: _____ Idade _____

Natural: _____ Ocupação: _____ Esc: _____

Endereço: _____

CEP: _____ Cidade: _____ Telefone: _____

Renda familiar: _____

H.P.M.A/I.S.D.A.: _____

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS:

Gesta		Gestação	S	N	Pré-natal	
Para		planejada			Nº consultas	
AE		desejada			mês primeira	
AP		Rep.Assist			início mov fetal	
laqueada		técnica			vigor e frequência	

Idade materna à gestação: _____

Idade Paterna à gestação: _____

Outros procedimentos diagnósticos: _____

INTERCORRÊNCIA	S	N	ESPECIFICAR TRIMESTRE E MEDICAÇÃO
Hipertensão Arterial			
Diabetes			
Infecções/Gripe			
Sangramentos			
RX			
Álcool			
Tabagismo			
Medicamentos: vit. A			
isotretinoína			
imunossupressor			
Talidomida			
vasoativas			
Anemia			

Parto		Apresentação		Cronologia		IG	sem
espontâneo		Cefálica		Termo		PN	G
cesárea		Pélvica		Pré-termo		EN	Cm
fórceps		Córmica		Pós-termo		PC	Cm
Massa corp. mat.		Outras				Apgar	/

Demorou para Chorar: ()S ()N

Cianose ()S ()N

INTERCORRÊNCIAS NEONATAIS

(condições de nascimento, problemas no berçário, condições de alta, amamentação, etc)

Orelhinha: Direita passou() falhou() Esquerda passou() falhou() ã fez()

Reflexo vermelho: OD presente() ausente() OE presente() ausente() ã fez()

Triagem Neonatal: FAL. _____ T4 _____ Outras: _____

ANTECEDENTES MÓRBIDOS (Internações, Cirurgias, Doenças Crônicas):

CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO:

Sorriso Social: _____ Sustentou Cabeça: _____ Sentou com Apoio: _____

Sentou sem Apoio: _____ Engatinhou _____ Andou sem Apoio: _____

Primeiras Palavras _____ Controle de Esfíncteres: _____

Comportamento e DNPM Atual / Escolaridade: _____

ACOMPANHAMENTO ESPECIALIZADO (FONO, T.O., FISIO, ESCOLA ESPECIAL, ETC):

ANTECEDENTES FAMILIARES: CONSANGÜINIDADE: () SIM () NÃO

Irmandade do Propósito (A):

gestação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
nv,nm,ae,ap										
sexo: m,f,i										
Microtia/pit/tag										
Alt. craniofacial										
disacusia										
peso nasc.										
estatura nasc.										
idade										

IRMANDADE DO PAI (B:)

IRMANDADE DA MÃE (C:)

HEREDOGRAMA:

Informações gerais sobre a família

Origem geográfica da família materna e paterna, (algum dos 4 avós é nascido fora do Brasil?)

Sobrenome materno: _____ Sobrenome paterno: _____

A família informa alguma etnia especial ? _____

EXAME FÍSICO GERAL:

Cor: Branco () Negro () Pardo () Amarelo ()

Origem Geográfica da Família: _____

Aspecto Geral , Atividade, Nutrição _____

FC: _____ FR: _____ PA: _____

ANTROPOMETRIA: Idade Cron.: _____ Idade Estat.: _____

Dado	Valor	Perc.	Dado	Valor	Perc.	Dado	Valor	Perc.
Peso			Font.			PT		
Est.			DAT			DIM		
Env.			DT			Esterno		
DPP			I.Cef			Mão D		
DCC			DICE			Mão E		
SS/SI			DICI			Dedo D		
PC		id	DIP			Dedo E		
		est	Orelha D			Pé D		
			Orelha E			Pé E		

Exame Físico Especial	Descrição: identificar o número
1. sem desvios fenotípicos	
2. crânio:	
3. olhos	
4. orelhas	
5. nariz	
6. boca	
7. pescoço	
8. tórax	
9. abdomen	
10. genitais externos	
11. membros superiores	
12. membros inferiores	
13. coluna vertebral	
14. pele e anexos	
15. neurológico	
16. desvios fenotípicos em familiares	

Checklist:

Anomalias Principais		sim	não
Mandíbula	Hipoplasia Mandibular		
	Fossa glenoidea Malformada		
Orelha	Microtia		
	Apêndices pré-auriculares		
	Perda auditiva Condutiva		
	Malformações de orelha média		
Face média	Hipoplasia Maxilar		
	Hipoplasia Zigomática		
	Má oclusão		
Olhos	Distopia Orbital		
	Dermóide Epibulbar		
Nervos	Paralisia de VII par		
Tecidos moles	Hipoplasia músculo Mastigatório		
	Macrostomia		
Insuficiência Velofaríngea			
Desvio Palatal			
Anomalias da base do Crânio			
Fenda palatina/Lábio leporino			
Coloboma pálpebra superior			
Hipodontia/ hipoplasia dentária			
atresia/estenose ducto Lacrimal			
plagiocefalia Frontal			
Disacusia Neurosensorial			
Seio pré-auricular			
hipoplasia glândula Parótida			
Vertebrais/costelas			
Coluna Cervical			
Escoliose			
Cardíacas			
Pigmentação			
Membros			
Sistema nervoso Central			
Geniturinário			
Pulmonar			
Gastrointestinal			

(check all that apply)

Side (Each side evaluated separately in cases of bifacial microsomia)

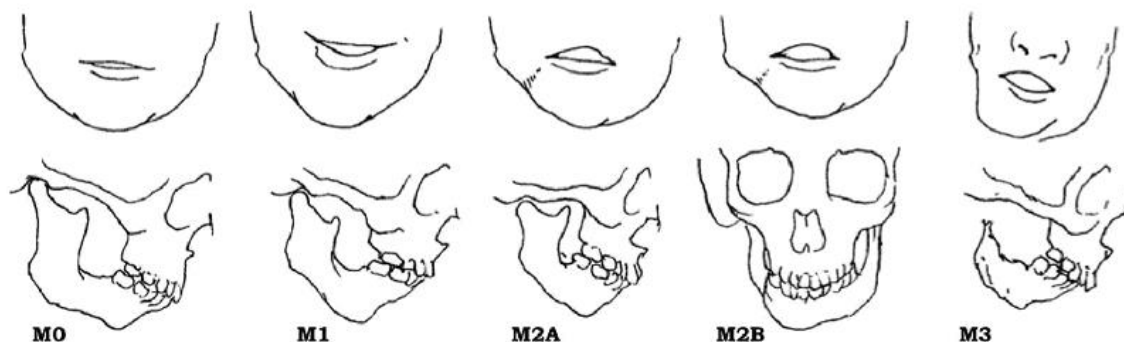
 R L

Orbit²



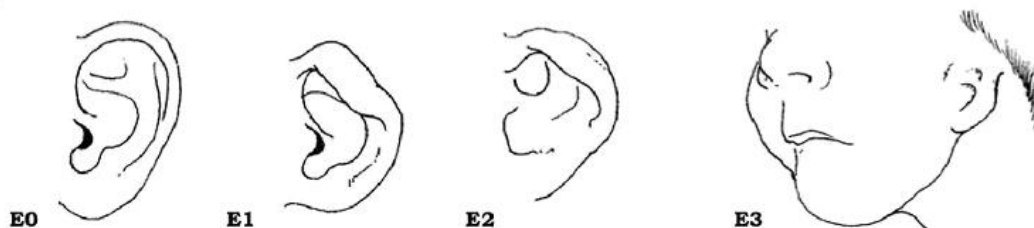
 O0 Normal orbital size and position **O1** Abnormal orbital size **O2↓** Inferior orbital displacement **O2↑** Superior orbital displacement **O3** Abnormal orbital size and position

Mandible



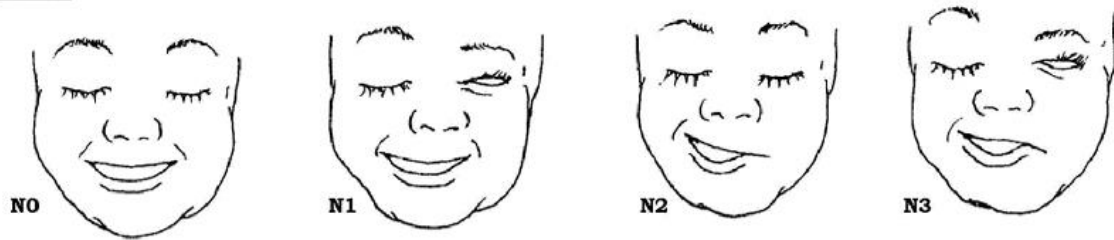
 M0 Normal mandible **M1** Small mandible and glenoid fossa with short ramus
 M2A Abnormally shaped and short ramus³ (Glenoid fossa in acceptable position with reference to contralateral TMJ) **M2B** Abnormally shaped and short ramus (Glenoid fossa is inferiorly, medially and anteriorly displaced with a severely hypoplastic condyle) **M3** Absence of ramus and glenoid fossa (no TMJ)

Ear



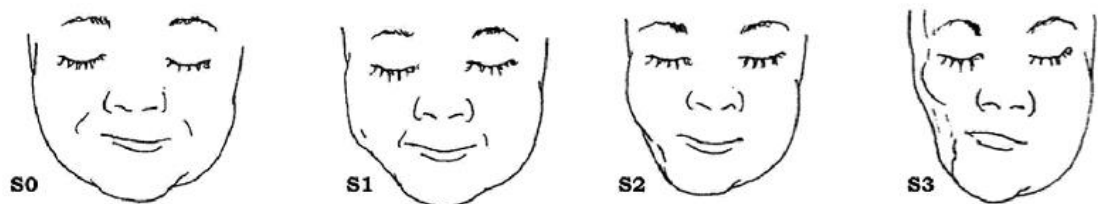
 E0 Normal auricle **E1** Mild hypoplasia and cupping with presence of all structures **E2** Absence of external canal with variable hypoplasia of concha **E3** Malpositioned lobule with absent auricle; lobular remnant typically inferiorly and anteriorly displaced

Nerve



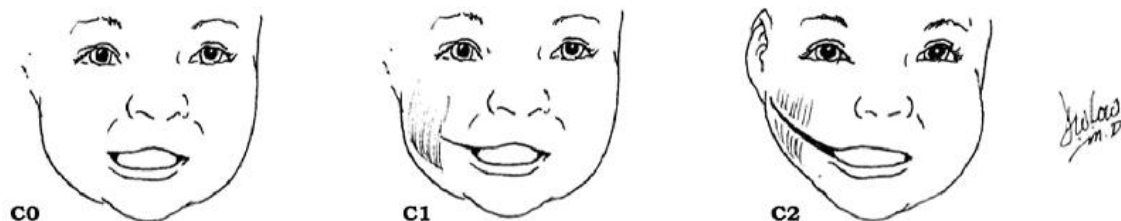
__ **N0** No facial nerve involvement __ **N1** Temporal and or Zygomatic branch involvement
 __ **N2** Buccal and/or Mandibular and/or Cervical branch involvement __ **N3** All branches affected

Soft Tissue



__ **S0** No soft tissue deficiency __ **S1** Minimal soft tissue deficiency
 __ **S2** Moderate soft tissue deficiency (between S1 and S3) __ **S3** Severe soft tissue deficiency

Macrostomia (Tessier # 7 Cleft)



__ **C0** No cleft __ **C1** Cleft terminates medial to anterior border of masseter __ **C2** Cleft terminates lateral to anterior border of masseter

Miscellaneous

O.M.E.N.S. (+)⁴ { __ Yes
 __ No
 __ **Goldenhars** (Hemifacial Microsomia with epibulbar lipodermoids and fused/hemivertebrae)

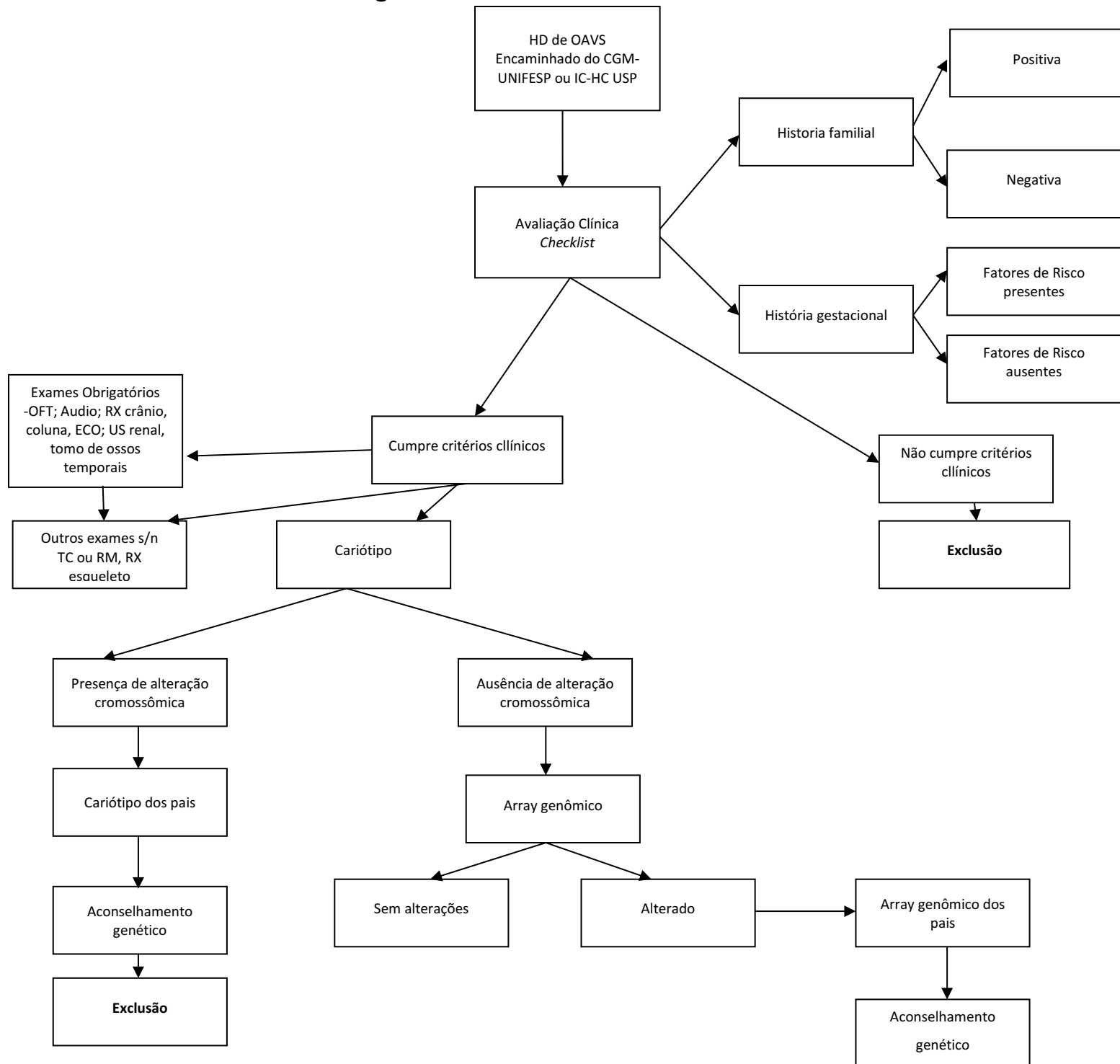
Notes:

4. Horgan, J.E., Padwa, B.L., LaBrie, R.A., et al. OMENS-plus: analysis of craniofacial and extracraniofacial anomalies in hemifacial microsomia. *Cleft Palate Craniofac. J.* 32:405, 1995.

Fotografias: Sim ()

Não () Quem tirou: Dr. _____

Anexo 4 - Fluxograma



Short Report

Cytogenetic and
Genome Research

Cytogenet Genome Res
DOI: 10.1159/000452237

Accepted: August 10, 2016
by M. Schmid
Published online: November 15, 2016

Wolf-Hirschhorn Syndrome with Epibulbar Dermoid: An Unusual Association in a Patient with 4p Deletion and Functional Xp Disomy

Silvia Bragagnolo^a Mileny E.S. Colovati^a Roberta S. Guilherme^a
Anelisa G. Dantas^a Malú Zamariolli de Souza^a Maria F. de Soares^b
Maria I. Melaragno^a Ana B. Perez^a

^aDepartment of Morphology and Genetics, and ^bDepartment of Radiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key Words

Deletion 4p · Epibulbar dermoid · Translocation sequencing · Wolf-Hirschhorn syndrome · Xp duplication

Abstract

Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) is a contiguous gene and multiple malformation syndrome that results from a deletion in the 4p16.3 region. We describe here a 6-month-old girl that presented with WHS features but also displayed unusual findings, such as epibulbar dermoid in the left eye, ear tags, and left microtia. Although on G-banding her karyotype appeared to be normal, chromosomal microarray analysis revealed an ~13-Mb 4p16.3p15.33 deletion and an ~9-Mb Xp22.33p22.31 duplication, resulting from a balanced maternal t(X;4)(p22.31;p15.33) translocation. The patient presented with functional Xp disomy due to an unbalanced X-autosome translocation, a rare cytogenetic finding in females with unbalanced rearrangements. Sequencing of both chromosome breakpoints detected no gene disruption. To the best of our knowledge, this is the first patient described in the literature with WHS and epibulbar dermoid, a typical characteristic of the oculoauriculovertebral spectrum (OAVS). Our data suggest that possible candidate genes for OAVS may have been deleted along with the WHS critical region.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) is a contiguous gene syndrome that affects 1 in 50,000 live births, with a 2:1 female-to-male ratio. It results from a deletion in the 4p16.3 region, and most of the cases (85%) arise de novo, usually from the paternal chromosome. Familial translocation, often of maternal origin, is observed in the other 15% of patients [Sheth et al., 2012]. All affected individuals reported so far presented pre- and postnatal growth deficiency and retardation, hypotonia with muscle underdevelopment, and developmental delay/intellectual disability of variable degrees. Typical WHS craniofacial features in infancy consist of 'Greek warrior helmet' appearance, microcephaly, high forehead with prominent glabella, ocular hypertelorism, epicanthus, high-arched eyebrows, short philtrum, downturned mouth, micrognathia, and poorly formed ears with pits/tags. The patients usually present seizures (50–100%), skeletal anomalies (60–70%), congenital heart defects (~50%), hearing loss (>40%), urinary tract malformations (25%), and structural brain abnormalities (33%). The ocular abnormalities include strabismus, refractive errors, proptosis, downslanting palpebral fissures, microphthalmos, microcornea, coloboma of the iris, coloboma of the optic nerve, ocular cyst, ptosis, glaucoma, and nystagmus

S.B. and M.E.S.C. contributed equally to the study.

KARGER

© 2016 S. Karger AG, Basel
1424–8581/16/0000–0000\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/cgr

Dr. Ana Beatriz Alvarez Perez
Department of Morphology and Genetics
Universidade Federal de São Paulo
Rua Botucatu, 740, São Paulo, SP 04023-900 (Brazil)
E-Mail ana.beatriz@unifesp.br

[Dickmann et al., 2009]. Candidate genes for the major manifestations of this syndrome are located in the WHS critical region (WHSCR1), initially defined by Wright et al. [1997] within chromosome region 4p16.3 between 1.4 and 1.9 Mb from the distal part of the telomere. Zollino et al. [2003] proposed another critical region, contiguous distally to WHSCR1, which they designated as WHSCR2. Among the candidate genes already described for WHS, these authors considered *LETM1* likely to be pathogenetically involved in seizures. Andersen et al. [2014] suggested that hemizyosity of *WHSC1* and *LETM1* could be a major contributor to the pathogenesis of WHS. However, not all patients with deletions overlapping both *WHSC1* and *LETM1* express the full WHS phenotype, and deletions elsewhere in 4p16.3 have been identified in patients with features overlapping WHS. Although no compelling evidence exists to support this assumption, Zollino et al. [2014] inferred that additional genes for seizures reside in an ~1.1-Mb interval, between 0.4 and 1.5 Mb from the 4p telomere. A total of 23 known annotated genes are located within this newly characterized interval. The authors hypothesize that *CPLX1*, encoding complexin 1, could be a good additional candidate gene for epilepsy in WHS. Recently, Ho et al. [2016] finely mapped the breakpoints in patients with WHS and identified a small susceptibility region for seizures in a 197-kb segment of the terminal 4p region that includes 2 genes and 1 pseudogene, of which *PIGG* is the best candidate gene for seizure susceptibility. In 15 out of 34 patients studied by array, Battaglia et al. [2008] found a 4p deletion associated with other chromosomal imbalances, usually partial duplications. In these cases, the phenotypic features are mostly attributed to the 4p monosomy and are compatible with WHS [Iwanowski et al., 2011; Dai et al., 2013]. In contrast to the well-defined phenotype of the 4p deletion, pure Xp duplications with an autosome as the recipient chromosome producing functional Xp disomy are rarely found in the literature, with only few cases reported resulting from unbalanced X-autosome translocations, and the phenotypic effects of this imbalance are poorly known. Among the few reported cases, there is a family with 2 male and 2 female patients with a duplication Xp22pter who presented intellectual disability and other phenotypic findings [Melaragno et al., 1998], and a patient with Xp21.2pter duplication with mild phenotypic anomalies, developmental delay, and seizures [Gustashaw et al., 1994]. Besides larger duplications, submicroscopic Xp22.31 duplications have been reported as a possible cause of intellectual disability and/or developmental delay [Mencarelli et al., 2008; Li et al., 2010; Olson et al., 2014].

Here, we present the clinical and molecular findings of a patient with a 4p deletion and an Xp duplication who displays a WHS phenotype with severe seizures in addition to characteristics of OAVS, due to an unbalanced t(X;4) maternal translocation.

Clinical Report

The proband is a female patient born to a 42-year-old mother. Prenatal evaluation showed growth deficiency and clubfoot. The proband was born at 37 weeks of gestation, weighing 1,975 g (<10 centile) and presenting cleft palate, pulmonary stenosis, atrial septal defect, and gastroesophageal reflux. A first examination at the age of 6 months (fig. 1) showed growth deficiency, developmental delay, apparent facial asymmetry, high forehead, epibulbar dermoid in the left eye, ear tags and left microtia, cleft palate, pectus carinatum, and a pre-sacral pit. She underwent several hospitalization episodes due to infections, seizures, and dysphagia. Abdominal ultrasonography showed pyelocalyceal dilatation, echocardiography revealed patent foramen ovale and pulmonary insufficiency, and endoscopy and bronchoscopy showed subglottic tracheal stenosis and tracheomalacia. Otoacoustic emissions were absent bilaterally; spine radiography showed incomplete closure of cervical vertebral bodies, her EEG was abnormal, and a brain CT scan showed frontal periventricular gliosis and asymmetric lateral ventricles. The proband's mother was diagnosed with hearing loss and preauricular sinus at the age of 10 years and presented kyphoscoliosis and oligodontia. The proband has a normal sister and a brother with mild hearing loss. The proband's maternal grandmother also had hearing loss (although probably age-related). The patient's mother and maternal aunt have ear pits.

Cytogenomic and Molecular Analyses

G-banding analysis of chromosomes from peripheral blood of the patient, her sister, brother, mother, maternal aunt, and grandmother, performed at a 550-band resolution, showed apparently normal karyotypes. Using a Gentra Puregene kit (Qiagen-Sciences, Germantown, Md., USA), genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of the patient for genomic array analysis (CytoScan[®] 750K Array, Affymetrix). According to GRCh37/hg19, the following result was found: 46,XX, arr 4p16.3p15.33(68,345–13,569,183)×1,Xp22.33p22.31(168,551–8,907,556)×3. Thus, the patient presents an ~13-Mb 4p16.3p15.33 deletion and an ~9-Mb Xp22.33p22.31 duplication (fig. 1). Array analysis of the proband's mother and aunt gave normal results. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with the X-whole chromosome painting (X-wcp) probe, performed in blood cells of the patient, revealed hybridization signals on both normal X chromosomes and on the derivative

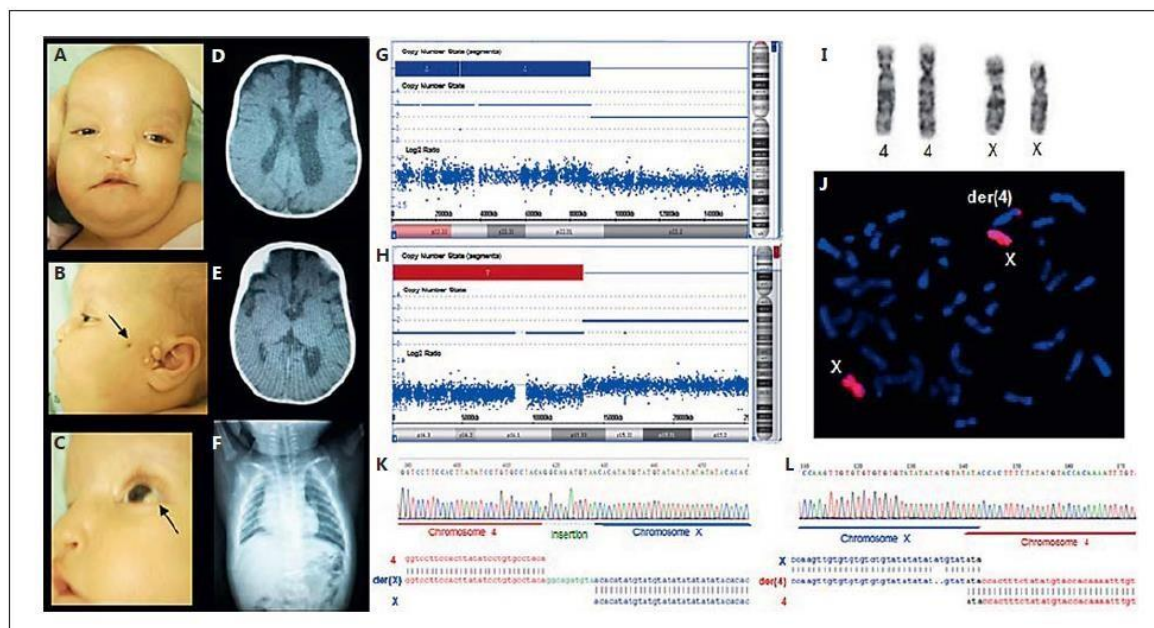


Fig. 1. A–C Proband showing facial asymmetry (A), ear tags, left microtia (B), and epibulbar dermoid in the left eye (C). D, E CT scans showing asymmetry of the lateral ventricles. F Spine X-ray showing incomplete closure of cervical vertebral bodies. G–L Cytogenomic findings of the proband. Array showing a duplication

in Xp (G) and a deletion in 4p (H); conventional G-banded chromosomes 4 and X showing no evident alteration (I); FISH showing extra X chromosome material in the derivative chromosome 4 (J). Sequencing results and alignment of the amplified fragments to the normal chromosome sequences from der(X) (K) and der(4) (L).

chromosome 4, as follows: ish der(4)t(X;4)(p22.31;p15.33)mat(wcpX+). FISH analysis further showed a balanced translocation in the patient's mother and brother and normal results in her sister, aunt, and grandmother. To better define the breakpoints, a customized oligonucleotide array-CGH on an 8×60K slide (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Calif., USA) was designed with probes targeting the breakpoints, according to Guilherme et al. [2015]. The customized array determined the following genome coordinates for the breakpoints: 8,915,059 in Xp22.31 and 13,566,307 in 4p15.33. In order to amplify the breakpoint regions in both derivative chromosomes of the patient's mother and in the patient's derivative chromosome 4, different sets of primers were designed around the junction fragments, and long-range PCRs (Takara®, Japan) were performed according to Guilherme et al. [2015] for DNA sequencing. All PCR primers and protocols are available upon request from the corresponding author. The amplicons were sequenced in an ABI PRISM 3500xl genetic analyzer (Life Technolo-

gies), and the sequence chromatograms were analyzed using the BioEdit software. DNA sequences from the PCR products were aligned to the human genome reference assembly (GRC37/hg19) using the BLAT tool of the UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>). Sequencing analysis showed the loss of 1 chromosome-4 nucleotide and of 11 chromosome-X nucleotides. The der(4) exhibited a 3-nucleotide (ATA) microhomology at the breakpoint. In the der(X) junction, there was a 3-nucleotide sequence (ACA) from both chromosomes X and 4 flanking a 10-nucleotide inserted sequence of unknown origin (fig. 1). According to the nomenclature proposed by Ordulu et al. [2014], the sequencing results found in the mother could be identified as seq[GRCh37/hg19] t(X;4)(4pter→4p15.33(13,565,508)::GGCAGATGTA::Xp22.31(8,912,601)→Xqter;Xpter→Xp22.31(8,912,580)::Xp22.31(8,912,583)→Xp22.31(8,912,5{87–89})::4p15.33(13,565,5{10–12})→4qter)dn.

Based on the results of the cytogenetic and molecular studies, the proband's karyotype was concluded

Table 1. Clinical characteristics of our patient with Xp duplication and 4p deletion compared with OAVS patients from the literature

Reference	Duplication Xp								Deletion 4p			OAVS			this study
	Xpter→Xp21.2/p22				dupXp22.31				f	g	h	i	j	k	
Number of patients	1 F	2 M	2 F	2 F	15 M	14 F	5 M	4 F	166	2	10	87	95	53	
Prenatal growth delay			1						54			66			+
Postnatal growth delay									124	1		65			+
Short stature				1	1	1	1	1				70	5		+
Skeletal anomalies	1	2	1	1			3		37			52			+
Developmental delay	1	1	1				3					87	5	11	+
Hypotonia	1	1			4		2		63	2		87			+
Absent speech and walking									5			44	3		+
Feeding difficulties	1				2	2	2					65			+
Intellectual disability		1	2		12	8	4	4	83	1		75			+
Central nervous system anomalies	1		1	1			1				3	70	8	2	+
Seizures	1		2		1	3	3	1	117			81			+
Microcephaly					2	1		1	125	1		79	3		–
Frontal bossing	1				2	1									+
‘Greek warrior helmet’			1						156			87			+
Hemifacial microsomia/asymmetry				1								52	44	80	+
Microphthalmia										1	2		10	11	–
Ocular coloboma									38	2	3	35			–
Ocular hypertelorism		1	1							2	10			9	+
Epibulbar dermoids													11	29	+
Ptosis			1	1	2	1					1	44			+
Anotia or microtia	1	1	2	1	1	1						70	53	64	+
Hearing loss	1						1					35	29	53	+
Preauricular sinus/pit														7	+
Preauricular tags										1		70	53	64	+
Mandibular/maxillary hypoplasia							1							65	+
Macrostomia/facial cleft													9	12	+
Cleft lip and/or palate							1		33			26	12	17	+
Micrognathia										1				21	+
Vertebral anomalies													10	33	+
Congenital heart defects	1	1		1	1	1			62	1		44	8	25	+
Renal abnormalities	1								38			29		6	–
Urogenital anomalies									21				9	7	+

a = Gustashaw et al., 1994; b = Melaragno et al., 1998; c = Mencarelli et al., 2008; d = Li et al., 2010; e = Esplin et al., 2014; f = Zollino et al., 2008; g = Bataglia et al., 2008; h = Dickmann et al., 2009; i = Sheth et al., 2012; j = Tasse et al., 2005; k = Belez-Meireles et al., 2014; F = female; M = male.

to be 46,XX,der(4)t(X;4)(p22.31;p15.33)mat.arr[hg19] 4p16.3p15.33(68,345–13,566,307)×1,Xp22.33p22.31 (168,551–8,915,059)×3.seq[GRCh37/hg19] der(4)(Xpter→Xp22.31(8,912,580)::Xp22.31(8,912,583)→Xp22.31(8,912,5{87–89})::4p15.33(13,565,5{10–12})→4qter)mat.

Discussion

The proband's karyotype 46,XX,der(4)t(X;4)(p22.31;p15.33)mat revealed a deletion of the WHS critical region and a duplication of Xp, with Xp22.32pter functional disomy, because the genes in this extra segment remain active in the der(4), since the translocated Xp segment does

not include the inactivation center. Table 1 shows clinical data of our patient and of patients from the literature with WHS, OAVS, and also with Xp22.33 duplication, these separated by gender, due to different X inactivation patterns. The patient described here presented with WHS features, including several ocular findings compatible with ocular anomalies and early-onset glaucoma previously described in patients with this syndrome, suggesting that the association of ocular anomalies with WHS is not coincidental [Tutunculer et al., 2004]. Tutunculer et al. [2004] reported a patient with a 4p deletion, WHS, bilateral coloboma of the iris, and a large left intraorbital coloboma cyst causing exophthalmos. Wu-Chen et al. [2004] described 10 WHS patients with ophthalmic findings including exodeviation (9/10), nasolacrimal obstruc-

addition to the WHS phenotype, the patient showed epibulbar dermoid, supporting the hypothesis that the 4p15.33 region, especially the *BAPX1* and *HMX1* genes, may be candidates for OAVS.

Acknowledgements

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant 2013/04623-2.

References

- Andersen EF, Carey JC, Earl DL, Corzo D, Suttie M, et al: Deletions involving genes *WHSC1* and *LETM1* may be necessary, but are not sufficient to cause Wolf-Hirschhorn syndrome. *Eur J Hum Genet* 22:464–470 (2014).
- Battaglia A, Filippi T, Carey JC: Update on the clinical features and natural history of Wolf-Hirschhorn (4p-) syndrome: experience with 87 patients and recommendations for routine health supervision. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 148C:246–251 (2008).
- Beleza-Meireles A, Clayton-Smith J, Saraiva JM, Tassabehji M: Oculo-auriculo-vertebral spectrum: a review of the literature and genetic update. *J Med Genet* 51:635–645 (2014).
- Dai Y, Yang J, Chen Y, Bao L, Cheng Q: Microarray analysis of unbalanced translocation in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Pediatr Int* 55:368–370 (2013).
- Dickmann A, Parrilla R, Salerni A, Savino G, Vasta I, et al: Ocular manifestations in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J AAPOS* 13:264–267 (2009).
- Esplin ED, Li B, Slavotinek A, Novelli A, Battaglia A, et al: Nine patients with Xp22.31 microduplication, cognitive deficits, seizures, and talipes anomalies. *Am J Med Genet A* 164A:2097–2103 (2014).
- Fischer S, Lüdecke HJ, Wiczorek D, Böhringer S, Gillissen-Kaesbach G, Horsthemke B: Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of *BAPX1* in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Mol Genet* 15:581–587 (2006).
- Gillespie RL, Urquhart J, Lovell SC, Biswas S, Parry NR, et al: Abrogation of *HMX1* function causes rare oculoauricular syndrome associated with congenital cataract, anterior segment dysgenesis, and retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:883–891 (2015).
- Guilherme RS, Hermetz KE, Varela PT, Perez AB, Meloni VA, et al: Terminal 18q deletions are stabilized by neotelomeres. *Mol Cytogenet* 8:32 (2015).
- Gustashaw KM, Zurcher V, Dickerman LH, Stallard R, Willard HF: Partial X chromosome trisomy with functional disomy of Xp due to failure of X inactivation. *Am J Med Genet* 53:39–45 (1994).
- Ho KS, South ST, Lortz A, Hensel CH, Sdano MR, et al: Chromosomal microarray testing identifies a 4p terminal region associated with seizures in Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Med Genet* 53:256–263 (2016).
- Iwanowski PS, Panasiuk B, Van Buggenhout G, Murdolo M, Mysliwiec M, et al: Wolf-Hirschhorn syndrome due to pure and translocation forms of monosomy 4p16.1→pter. *Am J Med Genet A* 155A:1833–1847 (2011).
- Li F, Shen Y, Köhler U, Sharkey FH, Menon D, et al: Interstitial microduplication of Xp22.31: causative of intellectual disability or benign copy number variant? *Eur J Med Genet* 53:93–99 (2010).
- Li X, Hu J, Zhang J, Jin Q, Wang DM, et al: Genome-wide linkage study suggests a susceptibility locus for isolated bilateral microtia on 4p15.32–4p16.2. *PLoS One* 9:e101152 (2014).
- Melaragno MI, Ramos MA, Brunoni D: Partial Xp duplication due to a translocation t(X;15) in two male and two female patients: a familial case report and review of the literature. *Ann Genet* 41:189–194 (1998).
- Mencarelli MA, Katzaki E, Papa FT, Sampieri K, Caselli R, et al: Private inherited microdeletion/microduplications: implications in clinical practice. *Eur J Med Genet* 51:409–416 (2008).
- Olson H, Shen Y, Avallone J, Sheidley BR, Pinsky R, et al: Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Ann Neurol* 75:943–958 (2014).
- Ordulu Z, Wong KE, Currall BB, Ivanov AR, Pereira S, et al: Describing sequencing results of structural chromosome rearrangements with a suggested next-generation cytogenetic nomenclature. *Am J Hum Genet* 94:695–709 (2014).
- Sanlaville D, Prieur M, de Blois MC, Genevieve D, Lapierre JM, et al: Functional disomy of the Xq28 chromosome region. *Eur J Hum Genet* 13:579–585 (2005).

Statement of Ethics

The study was approved by the Ethics Committee (CEP/UNIFESP 66348).

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

- Sheth F, Akinde OR, Datar C, Adeteye OV, Sheth J: Genotype-phenotype characterization of Wolf-Hirschhorn syndrome confirmed by FISH: case reports. *Case Rep Genet* 2012:878796 (2012).
- Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, et al: Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving *MECP2* in one female and two male patients. *Am J Med Genet A* 161A:1779–1785 (2013).
- Tasse C, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Albrecht B, et al: Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification. *Eur J Med Genet* 48:397–411 (2005).
- Tutunculer F, Acunas B, Hicdonmez T, Deviren A, Pelitli V: Wolf-Hirschhorn syndrome with posterior intraorbital coloboma cyst: an unusual case. *Brain Dev* 26:203–205 (2004).
- Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, et al: A transcript map of the newly defined 165 kb Wolf-Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Mol Genet* 6:317–324 (1997).
- Wu-Chen WY, Christiansen SP, Berry SA, Engel WK, Fray KJ, Summers CG: Ophthalmic manifestations of Wolf-Hirschhorn syndrome. *J AAPOS* 8:345–348 (2004).
- Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, et al: Mapping the Wolf-Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet* 72:590–597 (2003).
- Zollino M, Murdolo M, Marangi G, Pecile V, Galasso C, et al: On the nosology and pathogenesis of Wolf-Hirschhorn syndrome: genotype-phenotype correlation analysis of 80 patients and literature review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 148C:257–269 (2008).
- Zollino M, Orteschi D, Ruiter M, Pfundt R, Steindl K, et al: Unusual 4p16.3 deletions suggest an additional chromosome region for the Wolf-Hirschhorn syndrome-associated seizures disorder. *Epilepsia* 55:849–857 (2014).

Atypical 581-kb 22q11.21 Deletion in a Patient with Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum Phenotype

Mileny E.S. Colovati^a Silvia Bragagnolo^a Roberta S. Guilherme^a
Anelisa G. Dantas^a Maria F. Soares^b Chong A. Kim^c Ana B.A. Perez^a
Maria I. Melaragno^a

^aGenetics Division, Department of Morphology and Genetics, and ^bDepartment of Imaging Diagnosis, Universidade Federal de São Paulo, and ^cGenetics Unit, Instituto da Criança, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key Words

Atypical deletion · Candidate genes · OAVS · 22q11.2

Abstract

The oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS) is defined as a group of malformations involving the ears, mouth, mandible, eyes, and cervical spine. Establishing an accurate clinical diagnosis of OAVS is a challenge for clinical geneticists, not only because these patients display heterogeneous phenotypes, but also because its etiology encompasses environmental factors, unknown genetic factors and different chromosome aberrations. To date, several chromosomal abnormalities have been associated with the syndrome, most frequently involving chromosome 22. In the literature, six 22q11.2 microdeletions have been described within the same region, suggesting possible OAVS candidate genes in this segment. Here, we report on a patient with an ~581-kb 22q11.21 deletion, detected by genomic array and MLPA. This is the 7th case described with OAVS and 22q deletion, suggesting that the 22q11.2 region may be related to the regulation of body symmetry and facial development.

The oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS, OMIM 164210) is a developmental disorder affecting the 1st and 2nd branchial arches during embryogenesis. It includes conditions previously known as hemifacial microsomia and Goldenhar syndrome and is characterized by a wide and heterogeneous spectrum of symptoms and physical features that may vary greatly in severity from case to case, ranging from isolated unilateral microtia to multiple visceral malformations [Sharma and Passi, 2013]. Its main features are uni- or bilateral ear anomalies (anotia, microtia, preauricular tags and pits), hemifacial microsomia, ocular defects (upper eyelid coloboma, epibulbar dermoids, microphthalmia), conductive and/or sensorineural hearing loss, orofacial clefts, vertebral malformations and, more rarely, cardiac, renal and cerebral malformations, and intellectual disability [Gorlin et al., 1963; Rooryck et al., 2010].

The incidence of OAVS has been estimated at 1/5,600 individuals. The majority of cases appear to be sporadic. Among the genetic forms of OAVS, familial cases mostly

© 2016 S. Karger AG, Basel

M.E.S.C. and S.B. contributed equally to this paper.

KARGER 125

© 2016 S. Karger AG, Basel
1424-8581/16/1473-0130\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/cgr

Maria Isabel Melaragno, PhD
Department of Morphology and Genetics
Universidade Federal de São Paulo
Rua Botucatu 740, São Paulo, SP 04023-900 (Brazil)
E-Mail melaragno.maria@unifesp.br



Fig. 1. Patient at the age of 4 months (a), 9 months (b, c), and 3 1/2 years (d). e Cranial X-ray showing hemifacial asymmetry due to right mandibular ramus hypoplasia. f Computed tomography of temporal bones showing agenesis of the external auditory canal and ossicular chain. g Spinal X-ray showing scoliosis and incomplete closure of the vertebral body in the thoracic portion.

favor an autosomal dominant transmission with incomplete penetrance and variable expressivity [Brun et al., 2012]. Non-genetic factors such as maternal diabetes, retinoic acid, pyrimidone and thalidomide, or vascular disruption have been described in association with this disorder, indicating a possible environmental influence [Ballesta-Martínez et al., 2013].

Several chromosomal abnormalities have also been found in association with OAVS, suggesting different chromosomal candidate regions [Rooryck et al., 2010; Brun et al., 2012; Ballesta-Martínez et al., 2013; Beleza-Meireles et al., 2014]. However, chromosome 22 anomalies have been most frequently reported in patients with OAVS, particularly distal 22q deletions [Herman et al., 1988; Kobrynski et al., 1993; Balci et al., 2006; Xu et al., 2008; Digilio et al., 2009; Tan et al., 2011; Quintero-Rivera and Martínez-Agosto, 2013; Torti et al., 2013; dos Santos et al., 2014; Beleza-Meireles et al., 2015].

The 22q11.2 region is susceptible to multiple rearrangements (deletions or duplications), due to the presence of 8 low copy repeats (LCRs A–H). LCRs can cause genomic instability and either mediate or stimulate the occurrence of copy number variation (CNV), resulting in deletion or duplication of the genomic segment [Stankiewicz and Lupski, 2010]. The most common CNV

in 22q11.2 is an ~3-Mb deletion between LCRs A and D that is associated with the velocardiofacial/DiGeorge syndrome (OMIM 192430 and 188400) [Torti et al., 2013]. The critical region for the 22q11.2 deletion syndrome is an ~1.5-Mb region between LCRs A and B. We report here on a male patient with OAVS phenotype and an atypical 581-kb deletion at 22q11.21, between LCRs B and D.

Clinical Report

The patient, a male, was the second child of a nonconsanguineous couple, born at term by vaginal delivery, with a weight of 2,530 g (3rd–10th centile), length of 47 cm (10th centile), and Apgar score of 9–10. During pregnancy, the mother used abortive substances and cocaine, and had a hepatitis A infection. The proband (fig. 1) was first evaluated at the age of 9 months. OAVS was diagnosed due to the presence of hemifacial microsomia, retrognathia, agenesis of the external auditory canal and ossicular chain with moderate hearing loss on the right, besides an abnormal right glenoid cavity found on X-ray, soft cleft palate, and incomplete closure of the vertebral body in the thoracic portion. Moreover, an increased eye papilla led to the investigation of glaucoma, which, however, was not found. There was no history of recurrent infections or electrolyte imbalances. Thyroid function test, echocardiogram, and transfontanelar and abdominal ultrasounds were normal.

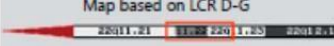
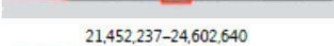
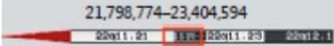
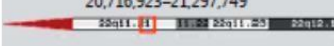
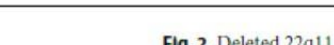
Genomic region deleted and genomic coordinates (GRCh37/hg19)	Clinical features	Reference
 Map based on LCR D-G 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5	cleft palate, gastroesophageal reflux, palpebral fissures, epicanthal folds, simple ears, facial asymmetry, mild tapering of fingers, ventricular septal defect, developmental delay, hearing loss	Jackson et al. [2007] patient 1
 21,799,573–24,550,573 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5	hemifacial microsomia, bilateral preauricular skin tags, epibulbar dermoid cyst and a right lop ear with an over-folded superior helix	Lafay-Cousin et al. [2009]
 21,798,705–22,916,612 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5	bilateral cleft lip and palate, left macrostomia, multiple bilateral preauricular tags, small external auditory canals and multiple ventricular septal defects	Xu et al. [2008]
 21,452,237–24,602,640 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5	hemifacial microsomia and an epibulbar dermoid, bilateral ear tags and hearing loss	Tan et al. [2011] patient 2
 21,798,774–23,404,594 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5	right-sided external auditory canal atresia and bilateral conductive hearing loss, mandibular asymmetry, mild lumbar lordosis	Torti et al. [2013]
 18,896,772–21,440,655 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5	mild right hemifacial microsomia, left ptosis, tubular nose, dysmorphic right ear, high palate, right hypoplasia of the depressor anguli oris, mild retrognathia, ligament laxity, hyperextensible fingers, and right deafness, feeding difficulty, hearing loss, speech difficulties, anterior mitral leaflet prolapse without valvular dysfunction	dos Santos et al. [2014]
 20,716,923–21,297,749 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5 22q11.21 11p15.5	hemifacial microsomia, retrognathia, agenesis of external auditory canal and ossicular chain with moderate hearing loss on the right, and abnormal right glenoid cavity to X-ray, cleft of soft palate, and incomplete closure of the vertebral body in the thoracic portion	Present patient

Fig. 2. Deleted 22q11 regions (red rectangles) and clinical features in patients with OAVS from the literature and in our patient. Genomic coordinates are shown above the chromosome diagrams, except for the first case, in which the deletion size was determined by MLPA.

Cytogenomic Results

The patient's G-banding karyotype at 550 band resolution was normal. Genomic array analysis (Genome-Wide Human SNP Array 6.0, Affymetrix), however, revealed a 581-kb deletion in region 22q11.21, as follows: arr[hg19] 22q11.21(20,716,923–21,297,749)×1.

MLPA using the SALSA P250 kit (MRC-Holland) revealed a deletion of the region encompassing LCRs B and D in 22q11.2, including the genes *ZNF74*, *KLHL22*, *MED15*, *SNAP29*, and *LZTR1*, but not the 1.5-Mb Di-George critical region (LCR A to LCR B). The biological parents were unavailable for cytogenomic evaluation.

Discussion

In most patients, the etiology of OAVS is poorly understood, and no particular gene has been specifically associated with this disorder. Some studies have detected

candidate loci for OAVS by analysis of genetic linkage [Kelberman et al., 2001] and epigenetic inheritance [Fischer et al., 2006]. Chromosomal aberrations have been reported in several cases, but no recurrent regions were observed in these patients [Rooryck et al., 2010; Brun et al., 2012; Ballesta-Martinez et al., 2013].

However, several chromosomal rearrangements involving the 22q11.21 region have been found in patients with OAVS [Herman et al., 1988; Pridjian et al., 1995; Hathout et al., 1998; Derbent et al., 2003; Jackson et al., 2007; Xu et al., 2008; Digilio et al., 2009; Lafay-Cousin et al., 2009; Rosa et al., 2010; Tan et al., 2011; Quintero-Rivera and Martinez-Agosto, 2013; Torti et al., 2013; dos Santos et al., 2014; Beleza-Meireles et al., 2015], pointing to this region as a genomic candidate locus for the syndrome.

Our patient presented an OAVS phenotype with a 581-kb 22q11.21 deletion between LCRs B and D, encompassing 21 genes. Figure 2 shows the deletion of the 22q11 genomic region in our patient and in the 6 patients from the literature with variable features of OAVS associated with a

distal 22q11.2 deletion. All these cases were studied by molecular cytogenetics that provided the genomic location, the size and the genes involved in the deletion. The patient described by Lafay-Cousin et al. [2009], who had a 2.7-Mb distal deletion including the tumor suppressor gene *IN11/SMARCB1*, developed an atypical rhabdoid tumor.

Tan et al. [2011] described 5 patients with different phenotypes and CNVs affecting distal chromosome 22q11.2, among which one with Goldenhar syndrome and a de novo 3.2-Mb distal deletion of 22q11.2, encompassing the *YPEL1*, *ERK2*, *PRAME*, *TOP3B*, *BRC*, and *IN11* genes.

Torti et al. [2013] reported on a patient with a 1.11-Mb proximal duplication and a 1.7-Mb distal deletion in 22q11.2, in the same chromosome, flanking the DiGeorge syndrome region. This double genomic rearrangement suggested the existence of 2 syndromes: cat-eye and 22q11.2 deletion, associated with the OAVS phenotype.

Among 8 patients with Goldenhar syndrome investigated by array-CGH, dos Santos et al. [2014] found one with a 2.5-Mb 22q11.21 deletion.

The 581-kb microdeletion found in our patient is the smallest described in OAVS, and only partially overlaps with just one of the 6 patients of the literature.

Although phenotypic alterations due to deletions are usually attributed to CNVs of dosage-sensitive genes [Stankiewicz and Lupski, 2010], none of the 21 genes encompassed by the deletion in our patient could be specifically related to the OAVS phenotype. However, this 22q11.2 deletion occurred in a region close to genes involved in branchial arch development, suggesting a possible position effect. Two important candidate genes (*YPEL1* and *MAPK1*) are located less than 1 Mb from the distal deletion breakpoint, in a region also deleted in

5 other patients, as shown in figure 2. Inactivation of *YPEL1*, expressed in pharyngeal arch, resulted in major craniofacial cartilage defects in zebrafish [Aerts et al., 2006]. The *MAPK1* gene was found to cause craniofacial and cardiac defects when conditionally inactivated in the developing neural crest [Newbern et al., 2008].

The environmental effect of hepatitis A infection or cocaine and abortive substances used during the mother's pregnancy could not be ruled out, since non-genetic causes have been associated with the OAVS phenotype [Rooryck et al., 2010].

This study supports the previous reports indicating that the 22q11.2 region is a candidate locus for OAVS and may be important for the regulation of body plan symmetry and facial development. However, the impact of an abnormal genomic 22q11 DNA structure on candidate genes and the genotype-phenotype correlation need to be better studied.

Acknowledgements

This study was supported by Grant 2013/04623-2 of the São Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil.

Statement of Ethics

The Research Ethics Committee of UNIFESP approved this study. Written informed consent was given by the foster mother.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Aerts S, Lambrechts D, Maity S, Van Loo P, Coessens B, et al: Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol* 24:537–544 (2006).
- Balci S, Engiz O, Yilaltacmaz Z, Bi V: Partial trisomy (11;22) syndrome with manifestations of Goldenhar sequence due to maternal balanced t(11;22). *Genet Couns* 17:281–289 (2006).
- Ballesta-Martinez MJ, Lopez-Gonzalez V, Dulcet LA, Rodriguez-Santiago B, Garcia-Minaur S, Guillen-Navarro E: Autosomal dominant oculoauriculovertbral spectrum and 14q23.1 microduplication. *Am J Med Genet A* 161A:2030–2035 (2013).
- Beleza-Meireles A, Clayton-Smith J, Saraiva JM, Tassabehji M: Oculo-auriculo-vertebral spectrum: a review of the literature and genetic update. *J Med Genet* 51:635–645 (2014).
- Beleza-Meireles A, Hart R, Clayton-Smith J, Oliveira R, Reis CF, et al: Oculo-auriculo-vertebral spectrum: clinical and molecular analysis of 51 patients. *Eur J Med Genet* 58:455–465 (2015).
- Brun A, Cailley D, Toutain J, Bouron J, Arveiler B, et al: 1.5 Mb microdeletion in 15q24 in a patient with mild OAVS phenotype. *Eur J Med Genet* 55:135–139 (2012).
- Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygili A, Varan B, Tokel K: Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A* 116A:129–135 (2003).
- Digilio MC, McDonald-McGinn DM, Heike C, Catania C, Dallapiccola B, et al: Three patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum and microdeletion 22q11.2. *Am J Med Genet A* 149A:2860–2864 (2009).
- dos Santos PA, de Oliveira SF, Freitas EL, Safatle HP, Rosenberg C, et al: Non-overlapping 22q11.2 microdeletions in patients with oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Am J Med Genet A* 164A:551–553 (2014).

- Fischer S, Ludecke HJ, Wiczorek D, Bohringer S, Gillesen-Kaesbach G, Horsthemke B: Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of *BAPX1* in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Mol Genet* 15:581–587 (2006).
- Gorlin RJ, Jue KL, Jacobsen U, Goldschmidt E: Oculoauriculo-vertebral dysplasia. *J Pediatr* 63:991–999 (1963).
- Hathout EH, Elmendorf E, Bartley J: Hemifacial microsomia and abnormal chromosome 22. *Am J Med Genet* 76:71–73 (1998).
- Herman GE, Greenberg F, Ledbetter DH: Multiple congenital anomaly/mental retardation (MCA/MR) syndrome with Goldenhar complex due to a terminal del(22q). *Am J Med Genet* 29:909–915 (1988).
- Jackson EM, Shaikh TH, Gururangan S, Jones MC, Malkin D, et al: High-density single nucleotide polymorphism array analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Hum Genet* 122:117–127 (2007).
- Kelberman D, Tyson J, Chandler DC, McInerney AM, Slee J, et al: Hemifacial microsomia: progress in understanding the genetic basis of a complex malformation syndrome. *Hum Genet* 109:638–645 (2001).
- Kobrynski L, Chitayat D, Zahed L, McGregor D, Rochon L, et al: Trisomy 22 and facioauriculo-vertebral (Goldenhar) sequence. *Am J Med Genet* 46:68–71 (1993).
- Lafay-Cousin L, Payne E, Strother D, Chernos J, Chan M, Bernier FP: Goldenhar phenotype in a child with distal 22q11.2 deletion and intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor. *Am J Med Genet A* 149A:2855–2859 (2009).
- Newbern J, Zhong J, Wickramasinghe RS, Li X, Wu Y, et al: Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17115–17120 (2008).
- Pridjian G, Gill WL, Shapira E: Goldenhar sequence and mosaic trisomy 22. *Am J Med Genet* 59:411–413 (1995).
- Quintero-Rivera F, Martinez-Agosto JA: Hemifacial microsomia in cat-eye syndrome: 22q11.1-q11.21 as candidate loci for facial symmetry. *Am J Med Genet A* 161A:1985–1991 (2013).
- Rooryck C, Souakri N, Cailley D, Bouron J, Goizet C, et al: Array-CGH analysis of a cohort of 86 patients with oculoauriculo-vertebral spectrum. *Am J Med Genet A* 152A:1984–1989 (2010).
- Rosa RF, Mombach R, Zen PR, Graziadio C, Paskulin GA: Clinical characteristics of a sample of patients with cat eye syndrome. *Rev Assoc Med Bras* 56:462–465 (2010).
- Sharma N, Passi S: Goldenhar syndrome. *Indian J Dent Res* 24:149 (2013).
- Stankiewicz P, Lupski JR: Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* 61:437–455 (2010).
- Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z, et al: Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *Am J Med Genet A* 155A:1623–1633 (2011).
- Torti EE, Braddock SR, Bernreuter K, Batanian JR: Oculo-auriculo-vertebral spectrum, cat eye, and distal 22q11 microdeletion syndromes: a unique double rearrangement. *Am J Med Genet A* 161A:1992–1998 (2013).
- Xu J, Fan YS, Siu VM: A child with features of Goldenhar syndrome and a novel 1.12 Mb deletion in 22q11.2 by cytogenetics and oligonucleotide array CGH: is this a candidate region for the syndrome? *Am J Med Genet A* 146A:1886–1889 (2008).

FONTES CONSULTADAS

ISCN 2016 - *INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENOMIC NOMENCLATURE*

NORMAS E TESES E DISSERTAÇÕES - BIBLIOTECA ANTONIO RUBINO DE AZEVEDO DA UNIFESP – 2º edição revisada e corrigida – São Paulo – 2015

PLATAFORMA BRASIL - www.saude.gov.br/plataformabrasil

REGIMENTO INTERNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

RESOLUÇÃO Nº 196 DE 10 DE OUTUBRO DE 1996 - CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE – Define diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos