

FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE
DISCIPLINA DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

SÍNDROME DE DIGEORGE: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Camila Furtado de Souza*

Cláudio Borba Canabarro*

Erica Marquardt Lämmerhirt*

Juliana Pereira Passaglia*

André**

*Acadêmicos da 4^a série da FFFCMPA

**Acadêmico da 5^a série da FFFCMPA (monitor)

Porto Alegre, 11 de Outubro de 2001

Resumo

A síndrome de DiGeorge é clinicamente caracterizada por ausência ou hipoplasia do timo e das paratireoides, malformações cardíacas e características faciais dismórficas. 90% dos pacientes apresentam microdeleção no cromossomo 22 - del22q11. A maioria dos casos são resultados de uma mutação nova, mas há casos herdados com padrão autossômico dominante. A del22q11.2 causa um distúrbio desenvolvimental alterando a migração das células da crista neural durante a embriogênese. Trata-se de uma síndrome de genes contíguos, na qual o papel de cada gene deletado não está definido. O diagnóstico pode ser confirmado por FISH ou PCR.

Palavras-chaves: Del22q11, microdeleção, mutação nova, alterações cardíacas, hipoparatiroidismo, hipoplasia do timo.

Introdução

A Síndrome de DiGeorge (DGS) caracteriza-se por uma série de mal-formações congênitas, classicamente incluindo defeitos cardíacos e dos grandes vasos, hipoplasia ou aplasia de timo e paratireóides e dismorfismos faciais.¹ Os órgãos afetados derivam da terceira ou quarta bolsas faríngeas embrionárias e as manifestações fenotípicas presumivelmente resultam de distúrbios durante o desenvolvimento destas estruturas.²

A deleção de um gene ou de um grupo de genes adjacentes no cromossomo 22q11(del22q11) é, provavelmente, a causa desta síndrome. Tal fato apóia-se na detecção, em crianças portadoras, de translocações cromossômicas não-equilibradas ou microdeleções quase sempre envolvendo a região cromossômica 22q11,^{3,4} embora alterações em outras seqüências específicas do DNA também tenham sido descritas.⁵ Há evidências, ainda, de que agentes teratogênicos, como o álcool, e o diabetes materno sejam causas potenciais de DGS.²

Em aproximadamente 90% dos casos ocorre uma mutação nova no portador da síndrome⁷ e em 8% dos casos há um padrão de herança familiar^{1,7}, a partir de um dos progenitores comprometido. A maioria dos pais afetados apresenta sintomas mínimos ou graus leves de distúrbios de aprendizagem ou retardo mental¹.

Síndromes de microdeleções, também conhecidas por síndromes dos genes contíguos, são distúrbios genéticos raros, nos quais a deleção de múltiplos genes em loci estreitamente ligados resulta em efeitos fenotípicos diversos.⁸ A DGS corresponde a apenas um dos espectros de manifestações clínicas decorrentes da monossomia parcial de regiões do cromossomo 22q11,^{8,9} sendo que várias outras síndromes também se originam de mutações na nessa região.

Essas síndromes, agrupadas sob a designação geral de Síndromes de Deleção 22q11, incluem, entre outras, a Síndrome Velocardiofacial (VCFS) ou de Shprintzen, a Síndrome Cardiofacial de Caylor, a Síndrome de Opitz G/BBB e a Síndrome CATCH-22⁷. Como por diversas vezes as regiões das microdeleções se sobrepõem², e baseados em estudos clínicos que mostram crianças com DGS, filhas de pais portadores de VCFS, muitos autores acreditam que estas desordens são, na verdade, manifestações distintas do mesmo defeito genético.^{2,10}

Desde o advento de testes diagnósticos de rotina para estas microdeleções, o número de casos diagnosticados tem aumentado dramaticamente. Com o método de FISH (hibridização com fluorescência *in situ*), disponível a partir dos primeiros anos da década de 90, passaram a ser incluídos muitos pacientes com manifestações leves ou inespecíficas, que antes passavam despercebidos.¹¹ Com as técnicas de análise citogenética, apenas cerca de 20% dos casos eram diagnosticados, mesmo em bandeamento de alta resolução.²

Hoje, sabe-se que a del22q11 ocorre com freqüência superior à previamente estimada, mas dados precisos sobre a incidência são desconhecidos. Wilson et al.¹² encontraram a deleção em aproximadamente 5% das crianças com defeitos cardíacos congênitos e, por conseguinte, foi estimada uma incidência de pelo menos 1/4000 nascidos vivos.

A DGS está relacionada à significativa morbimortalidade neonatal, em consequência dos distúrbios provocados pelos defeitos cardíacos, imunodeficiência e hipocalcemia.² O manejo adequado das crianças síndrômicas envolve a atuação em conjunto das mais variadas especialidades médicas.

Para o diagnóstico pré-natal de síndromes associadas a microdeleções, como a DGS, a técnica de FISH parece ser um método rápido e confiável. Entretanto, o aconselhamento genético pode ser dificultado, em tais situações, pelo grau variado de severidade das manifestações clínicas.¹³ Este exame é recomendado nos casos de risco aumentado de del22q11 por história familiar positiva ou naqueles fetos em que foram detectados distúrbios cardíacos e/ou presença de fissuras labiopalatinas através da ultrassonografia.⁷

Fundamentos Genéticos

Padrão de Herança:

A Síndrome de DiGeorge (DGS) ocorre como uma condição esporádica, sendo a grande maioria dos pacientes afetados, aproximadamente 90-94%, portadores de uma mutação nova.^{1,14} Entretanto, devido a grande variabilidade fenotípica da DGS, pais com poucas manifestações e portanto com adaptabilidade próxima a da população em geral, podem transmitir a del22q11.2 para a sua prole. Entre 6 a 25% dos pacientes afetados herdaram a del22q11.2 de seus pais, em padrão autossômico dominante.^{14,15}

Pais portadores da del22q11.2 ou portadores de translocações balanceadas envolvendo o braço longo do cromossomo 22 podem transmitir del22q11.2 para sua prole¹⁶, assim para um estudo adequado de recorrência deve-se realizar investigação dos pais. Se estes não são afetados e não possuem translocações, o risco de recorrência é o mesmo para a população em geral, exceto pela possibilidade de mosaicismos germinativos.¹⁴ No caso de evidência de pais afetados o risco de recorrência é de 50%. Alguns autores recomendam o estudo citogenético e molecular (FISH) de casais com filho portador de del22q11.2¹⁵.

Etiologia:

A DGS é causada, na grande maioria das vezes, por uma deleção intersticial no braço longo do cromossomo 22. Este cromossomo pertence ao grupo G, é acrocêntrico e a região deletada na DGS está próxima ao centrômero - del22q11.2.

Mais de 90% dos pacientes apresentam deleções sobreponíveis de uma região de 2-3 Mb (17,18,19,20), chamada de região tipicamente deletada (TDR). Outros possuem deleções menores ou não sobreponíveis na TDR.

Deleção é a perda de um segmento cromossômico, causada por 1 ou 2 quebras na estrutura do cromossomo. A deleção pode ser terminal, quando envolve apenas 1 quebra e perda de segmento terminal ou pode ser intersticial, quando 2 quebras geram a perda do segmento limitado por estas⁸. A DGS é um exemplo de deleção intersticial, na qual os pacientes portadores são hemizigóticos para os genes deletados, podendo ocorrer efeito de haploinsuficiência - metade da dosagem dos produtos gênicos codificados pelos genes deletados é insuficiente para manter o fenótipo normal.

As principais causas de deleções intersticiais são o pareamento desalinhado entre cromossomos homólogos na meiose I e segregação anormal a partir de uma translocação ou inversão. Dentre as causas de pareamento desalinhado, com conseqüente crossing-over desigual, a principal é a presença de seqüências repetidas, como as da família Alu, nos limites da deleção²¹.

No caso da DGS repetições de baixas cópias (LCRs) estão sendo associadas aos rearranjos no 22q11.2. Os LCRs são repetições ricas em A -T²² e predispõem a rearranjos intra e intercromossômico²³. Sugere-se que assim como as seqüências Alu, os LCRs possam causar deleção por pareamento desigual entre cromossomos homólogos na meiose I.

Os LCRs estão envolvidos na formação de translocações²⁴. Algumas translocações podem causar DGS por romper a seqüência de genes importantes no

22q11.2, outras o ponto de quebra está muito próximo da região, mas não resultam em manifestações clínicas²⁵. O estudo desses pontos de quebra das translocações com e sem resultante fenotípica, assim como o estudo das deleções não sobreponíveis à TDR promovem o mapeamento da região crítica do cromossomo 22q11.2 envolvida na DGS.

A DGS é atualmente classificada como síndrome de genes contíguos ou síndrome de microdeleção. As síndromes de genes contíguos foram caracterizadas por Schimikel²⁶ pelo envolvimento de genes não relacionados, fisicamente próximos em um cromossomo particular. Estas síndromes geralmente apresentam fenótipo complexo, pois as regiões deletadas/mutadas envolvem vários genes. No caso de DGS a origem da complexidade e variabilidade fenotípica ainda é desconhecida (15).

Alguns autores estimam que entre 25 a 40 genes^{19,20} estejam potencialmente envolvidos na DGS, contribuindo independente ou conjuntamente em uma via comum do desenvolvimento¹⁸ para a formação do fenótipo. O argumento principal destes autores se baseia na ocorrência de fenótipos compatíveis com DGS e deleções não sobreponíveis na região 22q11.2, não sendo identificado nenhum segmento específico deletado comumente em todos os casos²⁷, justificando o envolvimento de vários genes e portanto de um síndrome de genes contíguos. Para este mesmo grupo de autores, a ausência de um mapa fenotípico baseado no tamanho da deleção, isto é, não há relação entre tamanho da deleção e complexidade do fenótipo^{17,15,18}, deleções pequenas podem resultar em quadro completo de DGS e deleções extensas em fenótipos brandos; sugere que um mecanismo molecular complexo possa ser uma explicação coerente para DGS.

Idéias divergentes consideram essa dissociação fenótipo - deleção como consequência de defeito em único gene de expressividade e penetrância variável^{15,10}. Dados que sustentam essa hipótese são: 1) indivíduos da mesma família (presume-se que possuam deleção idêntica) com manifestações diferentes da DGS, inclusive gêmeos monozigóticos com discordância na gravidade das apresentações clínicas foram descritos²⁸; 2) identificação de uma translocação balanceada em 3 membros da mesma família com expressão fenotípica variável; 3) falta de evidências que deleções em uma região resultem em um fenótipo e deleções em outra região em fenótipo distinto, não sendo caracterizado o efeito aditivo esperado em síndromes de

genes contíguos²⁹.

Patogênese:

A DGS é causada por um distúrbio desenvolvimental na embriogênese. A patogênese das anomalias fenotípicas na del22q11.2 está relacionada com a migração das células da crista neural para as bolsas faríngeas a partir da 4ª semana de desenvolvimento embrionário. As células da crista neural contribuem para a morfogênese dos grandes vasos do coração, timo, paratireóide, tireóide, estruturas craniofaciais (mandíbula e maxila), envolvendo as seis primeiras bolsas faríngeas. Com relação aos defeitos cardíacos conotrunciais associados a DGS, que é a principal alteração estudada, foi convincentemente demonstrado em embriões de aves que células da crista neural da porção cefálica migram para região de desenvolvimento conotruncal e participam no processo de septação aortopulmonar¹⁵.

Na DGS, o efeito de haploinsuficiência causado pela del22q11.2 resulta em uma contribuição deficiente das células da crista neural na formação dos órgãos derivados das bolsas faríngeas¹⁷. Provavelmente o número crítico de células da crista neural necessário para o desenvolvimento destes órgãos não é atingido, seja por não formação precoce destas células, falta de migração apropriada, morte celular excessiva ou diferenciação celular alterada¹⁸.

Muitos genes da TDR foram caracterizados e selecionados como candidatos na contribuição do fenótipo da DGS. Para a definição destes genes é necessário que preencham certos critérios: 1) sejam expressos durante a embriogênese, especificamente nos tecidos afetados na del22q11.2; 2) participem no desenvolvimento das células da crista neural durante a embriogênese; 3) estejam deletados nos indivíduos com del22q11.2; 4) Um ou mais indivíduos com fenótipo de DGS, mas sem deleção ampla, devem ter uma deleção menor ou mutação puntiforme para o gene(s) candidato(s)³⁰.

O primeiro gene com função conhecida mapeado na região crítica da DGS foi o gene codificante da cateco-O-metiltransferase (a COMT)³¹. Esta enzima é responsável pelo metabolismo das catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina), é encontrada no citoplasma e existem alelos de alta e baixa atividade enzimática. Scambler et al sugerem que hemizigotos para COMT como pacientes com del22q11.2 e portadores do alelo de baixa atividade no cromossomo não deletado pode predispor ao desenvolvimento de características psicóticas encontradas em alguns pacientes com DGS^{17,32}.

Aubry et al isolaram, em 1993, 4 genes codificantes de proteínas com motivos em “zinc finger” ligantes do DNA, esses 4 genes estão mapeados na região crítica da DGS³³. Estas proteínas devido a sua estrutura em “zinc finger” são capazes de se ligar ao DNA, sendo os aminoácidos ao redor do do “zinc finger” responsáveis pela especificidade de ligação ao DNA³⁴. Muitas proteínas funcionantes como fatores de transcrição apresentam “zinc fingers”, mas estas estruturas também são capazes de se ligar ao RNA, não agindo sempre como fatores de transcrição³⁴. Um dos genes isolados, o ZNF74, está deletado, apresentando-se em hemizigose em 23 de 24 pacientes com DGS. O RNAm do ZNF74 é detectado em tecidos embrionários humanos e de camundongos, mas não é detectado em tecidos adultos. Este achado sugere que mudanças na dosagem desse possível fator de transcrição, devido a hemizigose de ZNF74 pode ser crítica nas anomalias desenvolvimentais da DGS^{33, 35}.

TUPLE-1 é um gene localizado na TDR. Seu produto é análogo a um regulador transcricional de leveduras e da *Drosophila melanogaster*. Sugere-se que seja que tenha a mesma função em humanos devido a localização nuclear do produto protéico e seqüência típica de aminoácidos. O TUPLE-1 pode participar na montagem dos complexos de multisubunidades transcricionais e em hemizigose causa um desequilíbrio estequiométrico na montagem destes complexos. Observou-se que em pacientes com a del22q11.2 todos os pacientes eram hemizigotos para TUPLE-1, mas pacientes com translocações balanceadas^{2;22} não apresentavam quebra deste gene. Este fato pode descartar a participação do TUPLE-1 na patogênese da DGS. No entanto há a possibilidade que a quebra de um gene próximo ao TUPLE-1 seja capaz de produzir o fenótipo ou que ocorra uma regulação negativa

sobre o TUPLE-1 realizada por seqüências presentes no cromossomo 2 nos pacientes com a translocação^{2;22}. É necessário maiores estudos experimentais para a comprovação destas hipóteses¹⁸.

O gene candidato mais estudado atualmente é o UFD1L, encontra-se deletado em mais de 85% dos pacientes³⁶. Este gene parece ter um papel central na patogênese da DGS²⁷. O UFD1L codifica uma proteína ubiquitina de fusão-degradação, homóloga a das leveduras, que está ativa na via de degradação proteolítica dependente de ubiquitina³⁶. A deficiência dessa proteína também pode afetar a atividade de poliadenilação, resultando em processamento defeituoso do RNAm. Atualmente não há evidências de que estas funções estejam ativas células de mamíferos^{37,38}. Sabe-se que a via proteolítica mediada pela ubiquitina está envolvida em múltiplos processos, como crescimento e diferenciação celular, transdução de sinal, reparo do DNA, resposta ao estresse (inclusive ao estresse imunológico) e tráfego transmembrana³⁶.

Recentemente foi descrito a capacidade da proteína ubiquitina de fusão-degradação de se associar a uma proteína componente do complexo de poros nucleares, codificada pelo gene NPL4³⁹. A relação da UFD1L com o transporte nuclear permanece desconhecida, mas trata-se da primeira informação funcional do UFD1L descrita em células de mamíferos³⁹.

Alguns autores sugerem, baseados na função proteolítica da Ufd11 em leveduras, que a haploinsuficiência causada pela del22q11.2 afetando a UFD1L possa resultar em acúmulo de algumas proteínas levando a célula a uma apoptose prematura e perda das células que posteriormente contribuiriam para a formação do arco aórtico transversal, palato e tecidos craniofaciais⁴⁰.

Sabe-se que o gene UFD1L está expresso, em camundongos, durante o desenvolvimento da maioria dos tecidos envolvidos nas anomalias da DGS, incluindo a via de saída cardíaca, cérebro, e em outros tecidos menos relacionados como pulmão e vesícula ótica³⁶. Em humanos o RNAm do UFD1L é muito difundido e normalmente é expresso durante a vida fetal e pós-natal¹⁹.

Em modelos animais com camundongos, a deleção somente do UFD1L foi insuficiente para gerar anomalias cardíacas²⁷. Modelos com deleções semelhantes às

encontradas nos pacientes com DGS produziram um fenótipo mais brando nos animais e apenas 25% apresentaram anomalias cardíacas, indicando a defasagem do estudo desta síndrome em modelos animais. Contudo, por técnicas de complementação genética, usando um cromossomo duplicado para o segmento antes deletado, com exceção do gene UFD1L que não se encontrava duplicado, este cromossomo foi capaz de corrigir os defeitos cardíacos⁴¹. Associado a esta evidência, não foi identificado nenhum caso de DGS com deleção ou mutação puntiforme isolada no gene UFD1L, o que descarta a possibilidade do UFD1L ser base de doença monogênica associada ao fenótipo de DGS²⁷.

Existe a possibilidade de que células com apenas uma cópia do UFD1L sejam mais suscetíveis a outros insultos genéticos, como a mutação de outro gene crítico na TDR. Isto pode ser especialmente verdadeiro para células das bolsas faríngeas, que normalmente expressam altos níveis de UFD1L^{40, 42}.

Dois genes localizados na região tipicamente deletada (TDR) da DGS foram recentemente considerados como candidatos :PCAQ e Tbx1. Ambos estão relacionados aos processos regulatórios transcricionais.

O PCQAP codifica uma proteína identificada como uma subunidade do complexo multiproteico PC2. Este complexo pertence a família dos complexos Mediadores e tem função coativadora na transcrição dos genes de classe II. A transcrição dessa classe de genes é realizada pela RNA polimerase II. É um processo altamente regulado que requer a formação de complexos multiproteicos, os transcriptossomas, na região promotora dos genes classe II⁴³. Existe pelo menos 3 classes de entidades multiproteicas relacionados à formação dos transcriptossomas: 1) fatores de transcrição basais ou também conhecidos como GTFs, estes fatores juntamente com a RNA polimerase II formam a maquinaria basal de transcrição; 2) ativadores, que são elementos cis-regulatórios dos genes de classe II, criam uma superfície regulatória que é crucial, mas não suficiente para o início da transcrição; 3) Cofatores ou coativadores, são fatores acessórios que medeiam a resposta da maquinaria basal (GTFs + RNAPol II) aos elementos ativadores. Esses agem alterando a estrutura gênica na cromatina⁴⁴, criando redes regulatórias e facilitando a formação dos complexos de iniciação⁴⁵.

A PC2 é conhecida como um destes cofatores ou coativadores²⁶. O gene PCQAP que codifica uma das suas subunidades¹⁸, foi mapeado e se encontra na região crítica da DGS. Este gene é altamente expresso durante a embriogênese, principalmente na massa frontonasal, bolsas faríngeas e brotos dos membros. A expressão elevada do gene PCQAP nestas estruturas é sugestivo de um potencial envolvimento deste gene na morfogênese dos órgãos derivados¹⁸, que estão envolvidos na DGS.

Já o gene *Tbx1*, pertence a família dos fatores transcricionais T-box. Membros desta família são essenciais para o desenvolvimento de vertebrados e invertebrados. Modelos animais de camundongos hemizigóticos para *Tbx1* apresentaram alta incidência de anomalias cardíacas do arco aórtico. A mutação em homozigose foi letal. A análise mais detalhada dos camundongos *Tbx1* *-/-* mostrou uma grande variação de anomalias desenvolvimentais como hipoplasia de timo e paratireóides, anormalidades da via de saída cardíaca, estruturas faciais alteradas, vértebras e palato anormais^{20,47}.

Permanece não esclarecido o fato de pacientes com fenótipo de DGS apresentarem deleções que não incluem *Tbx1* ou outros genes antes mencionados. Novelli et al sugerem a existência de elementos cis-regulatórios de longa extensão na TDR como possível explicação para o fato de pacientes com o mesmo fenótipo apresentarem deleções não sobreponíveis. No entanto não há comprovação desta hipótese.

O detalhamento dos efeitos do *Tbx1*, PCQAP e UFD1L na embriogênese e como deleções que não afetam essas estruturas podem causar as manifestações clínicas da DGS são as novas perspectivas moleculares no entendimento da variabilidade genótipo-fenótipo na DGS.

Aspectos Clínicos

As características fenotípicas dos indivíduos portadores da Síndrome de DiGeorge, vão depender do grau de dismorfogênese das bolsas faríngeas. Mais comumente, encontra-se afetada a formação da terceira e quarta bolsas, muito embora o distúrbio possa também envolver a primeira, a segunda e a sexta bolsa faríngea. Dessa maneira, o acometimento da terceira e da quarta bolsas afetam o desenvolvimento do timo e da aorta; distúrbios na terceira bolsa afetam também o desenvolvimento das glândulas paratireóides; enquanto os distúrbios no desenvolvimento da artéria pulmonar são influenciados pela sexta bolsa faríngea malformada.⁴⁹

De acordo com a sua apresentação clínica, a Síndrome de DiGeorge foi classificada em três formas: completa, parcial e transitória.⁴⁹ Um grau variável de hipoplasia tímica e paratireoidéia, por exemplo, é mais freqüente do que a aplasia total desses tecidos. Assim, algumas crianças com esta síndrome não apresentam anormalidades tão severas, e por isso são referidas como portadoras da Síndrome de DiGeorge parcial. Contudo, independente da sua forma ou da severidade da doença, alguns indivíduos são reconhecidos clinicamente por características fenotípicas específicas.⁵⁰

A apresentação clínica da doença deve-se a um conjunto de anormalidades que

envolvem defeitos cardíacos, fácies atípica, hipoplasia tímica, fenda palatina e hipocalcemia, que resultaram, do inglês, na acrossemia CATCH22.^{42,48,51} Entretanto, o fenótipo pode ser mais complexo incluindo déficit de crescimento, dificuldade de aprendizado, desordens psiquiátricas, fala anasalada, defeitos oculares e outros diversos sintomas adicionais.¹⁹

Devido à hipoplasia ou à aplasia tímica, os indivíduos com Síndrome de DiGeorge apresentam-se com graus variáveis de perda de imunidade mediada por células T. A ausência de imunidade celular reflete-se nos baixos níveis de linfócitos T e numa pobre defesa imunológica contra certas infecções por patógenos de baixa virulência ou oportunistas (fungos, vírus, *Pneumocystis carinii*), e para a doença do enxerto-versus-hospedeiro a partir de transfusões de sangue não irradiado.⁵⁰ Em geral, os folículos linfóides parecem normais, mas as áreas paracorticais dos linfonodos e as regiões timo-dependentes do baço mostram diferentes graus de depleção, dependendo da hipoplasia tímica, o que resulta em uma grande variabilidade na gravidade da imunodeficiência.⁵²

O desenvolvimento anormal das paratireóides é responsável pela hipocalcemia e pela hiperfosfatemia, decorrentes da falta de hormônio paratireoideo. Da hipocalcemia resultam a tetania e as convulsões que, no período neonatal, são altamente sugestivas do diagnóstico da síndrome.²¹ A hipocalcemia devida ao hipoparatireoidismo primário pode, no entanto, apresentar-se mais tardiamente, na infância ou na idade adulta.⁵¹

As dismorfias craniofaciais podem incluir hipertelorismo, orelhas com baixa implantação e protuberantes, fissuras palpebrais pequenas, inclinação anti-mongólica dos olhos, boca pequena, micrognatia, úvula bífida e depressão infranasal curta.^{8,21,49,50} Além disso, anormalidades do trato urinário, esôfago, tireóide e grandes vasos também podem estar presentes. Alguns casos de perda auditiva e atrofia cerebelar também já foram relatados.²⁰

Em bora as doenças cardíacas congênicas estejam presentes na maioria dos indivíduos com a síndrome, alguns, ocasionalmente, não apresentam nenhuma evidência de problemas cardíacos.⁴⁹ As anormalidades cardíacas que mais comumente englobam a Síndrome DiGeorge são implantação à direita do arco aórtico; tronco

arterioso; artéria subclávia esquerda anormal; estenose ventricular direita; defeitos no septo interventricular ou interatrial; Tetralogia de Fallot; atresia, estenose ou hipoplasia das artérias pulmonares; distrofia do músculo cardíaco; e valvas semilunares bicúspides, displásicas, insuficientes ou estenóticas.¹⁵

As malformações da Síndrome de DiGeorge podem também envolver as vias aéreas. Embora sejam menos comuns, esses defeitos são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade nesses indivíduos. As anormalidades mais freqüentemente descritas são as fístulas traqueoesofágicas, a traquéia com número reduzido de anéis (e, por isso, mais curta), cartilagem tireoidéia anormal, laringomalácia, traqueomalácia e broncomalácia.

As manifestações iniciais da síndrome são crises convulsivas hipocalcêmicas neonatais, ou a cianose e outros sinais de insuficiência cardíaca. A imunodeficiência é uma manifestação mais tardia e a gravidade depende do grau de hipoplasia tímica. A maioria dos indivíduos afetados tem um pequeno timo ectópico, mas com função normal, que pode semear células T na periferia em números que podem ou não ser suficientes para a defesa imunológica. Muitas vezes o timo está presente, apenas não desce até o mediastino. Em casos raros, os lactentes afetados não têm timo detectável ou células T periféricas, e o transplante de timo deve ser considerado nestes casos.⁵⁰

Quando as crianças com a forma severa da Síndrome de DiGeorge sobrevivem ao período neonatal, geralmente apresentam maior suscetibilidade a infecções que outrora nenhum mal causariam. Os indivíduos com essa forma da doença são enfraquecidos, não se desenvolvem de maneira adequada, e são mais suscetíveis à morte súbita.⁴⁹ Por outro lado, aquelas crianças com a síndrome em sua forma parcial, que possuem um timo pequeno, mas histologicamente normal, apresentam um aperfeiçoamento da função de suas células T com o passar dos anos, até que, aos cinco anos de idade, muitas não mais possuem deficiência dessas células.⁴⁹

Diagnóstico

Diagnóstico Clínico:

A síndrome de DiGeorge(DGS) era antigamente diagnosticada apenas com bases clínicas, o que reflete a gama de alterações morfológicas vistas nesta síndrome, e que possibilitavam o diagnóstico mesmo sem o advento de técnicas de visualização cromossômica. Até então a única prova laboratorial utilizada para auxílio diagnóstico era a avaliação da função celular imunológica.¹⁵No começo da década de 70 a análise cromossômica começou a ser efetuada para demonstrar a relação entre aplasia tímica e anormalidades no cromossomo 22.⁵⁵Estudos cromossômicos mostrando a relação entre DGS e deleções no cromossomo 22 só começaram a ser realizados cerca de dez anos mais tarde⁵⁶.

A DGS pode ser caracterizada pela ausência ou severa aplasia do timo e paratireóides, acompanhados de malformações cardíacas, palatinas e características faciais dismórficas.⁵⁷ A presença de hipocalcemia prolongada, não responsiva ao tratamento aliada à hipoparatireoidismo congênito com valores detectáveis de cálcio menores que 7mg/Dl e valores séricos aumentados de fósforo, juntamente com doença cardíaca congênita são altamente sugestivos de DGS.¹⁷

O quadro imunológico do paciente pode se encontrar muito comprometido, principalmente devido à imunidade celular, que varia muito de um caso para outro, podendo estar ausente ou mesmo normal em alguns pacientes, assim como a imunidade humoral que em alguns casos encontra-se alterada.¹⁷

Manifestações da hipocalcemia podem ser do tipo tetanismo, um espasmo tônico intermitente envolvendo geralmente as extremidades do corpo, que costuma aparecer nas primeiras 24-48hs de vida.⁵⁸

As doenças cardíacas congênitas são também bem comuns nos pacientes com DGS, sendo, por vezes, o primeiro indício da síndrome, visto em exames ecocardiográficos fetais. As manifestações cardíacas geralmente acometem o complexo tronco-conal, entre elas podemos distinguir a interrupção do arco aórtico, tetralogia de fallot, truncus arteriosus, arco aórtico desviado para a direita, defeito no septo interventricular, além de outras alterações na emergência dos vasos.^{15,58}

Os pacientes portadores de DGS podem apresentar características faciais atípicas, algumas delas são: hipertelorismo ou aumento anormal da distância inter-orbitária; baixa implantação auricular, com presença de uma angulação proeminente; arcada palatina elevada ou fissura palatina; deformidade labial (boca de peixe); micrognatia; e uma possível, mas não comum, diminuição da mandíbula.^{17,58}

Há também trabalhos acerca do atraso do desenvolvimento de crianças portadoras da síndrome, assim como de sua possível dificuldade de aprendizagem. Em uma análise de 112 crianças afetadas submetidas a testes para avaliação do desenvolvimento neurológico, 54% apresentaram atraso significativo, 24% um atraso desenvolvimental leve e 22% um atraso mediano. Foi descrito ainda que 80% delas estavam abaixo da média normal de desenvolvimento da linguagem. Os atrasos não foram explicados pelas desordens cardíacas ou palatinas.²

Diagnóstico Citogenético:

Com base nas suspeitas clínicas, torna-se mandatório a utilização de algum método citogenético para confirmação da síndrome em pacientes com achados condizentes com a deleção.

Uma técnica sensível para detecção de microdeleções é a hibridização in situ fluorescente (fluorescent in situ hybridization- FISH). Nesta técnica um segmento especificamente marcado de DNA (sonda) é hibridizado a cromossomos metafásicos ou interfásicos e então observado no microscópio de fluorescência. Alguns estudos tentam comprovar a maior qualidade ou menor tempo e recursos gastos utilizando-se células mitóticas em intérfase ou metáfase; porém, ainda não há resultados que comprovem a supremacia de uma técnica a outra⁵⁷.

Para detecção da microdeleção responsável pela DGS utiliza-se um probe de DNA complementar à região cromossômica de diGeorge (22q11.2), onde a maioria dos pacientes apresentam a deleção, tendo aproximadamente de 2-3Mb. Os probes utilizados neste método são o TUPLE1 e o N25.⁶⁰

O resultado é tido como normal quando a sonda se hibridiza em dois locais (pontos fluorescentes), o que traduz-se como a presença de dois cromossomos homólogos em um núcleo de célula somática. Quando a sonda se hibridiza em apenas um dos cromossomos analisados por fluorescência, é sinal de que o outro cromossomo deve ter uma deleção, necessária para confirmação diagnóstica citogenética.⁶⁰

Outra técnica que pode ser realizada citogeneticamente para confirmação diagnóstica é o PCR (polymerase chain reaction), que consiste em amplificar uma região cromossômica para melhor análise, utilizando-se de um primer complementar às sequências requeridas do DNA alvo (analisado). As vantagens deste método são poder retirar células de outras fontes que não o sangue, sendo possível efetuar-lo a partir de quantidades de DNA tão pequenas quanto a de uma única célula. Deve-se sempre ter o cuidado para a não contaminação do material analisado, pois qualquer outra célula estranha ao organismo analisado pode ser amplificada, gerando confusão

no diagnóstico.⁵⁹

Na DGS o gene alvo a ser utilizado pode ser o UFD1L (gene de degradação da fusão da ubiquitina), este gene foi relatado recentemente como tendo um papel importante na síndrome. O primer utilizado é uma seqüência de DNA encontrada no exon 12 do UFD1L.⁶⁰

O FISH ainda é o teste mais utilizado para este tipo de confirmação diagnóstica, isto embasado na sua ótima capacidade de detecção de microdeleções na região 22q11.2 em pacientes com suspeita clínica de DGS, apesar desta técnica não detectar pequenas mutações de genes contíguos.

Diagnóstico Pré-Natal:

Cerca de 6-25% dos casos de DGS são herdados dos pais por herança autossômica dominante, logo se recomenda a realização de análise citogenética nos pais para avaliar se a mutação do 22q11.2 foi herdada ou é nova. Uma análise citogenética padrão também é recomendável para verificação de uma possível translocação balanceada originando a síndrome.^{17,59}

O FISH tem se demonstrado um bom teste para diagnóstico pré-natal, podendo ser realizado com cultura de amniócitos ou células da vilosidade coriônica.⁴⁹ Ainda que as deleções possam ser prontamente diagnosticadas pré-natalmente, não é possível prever o fenótipo com base na detecção da deleção. O que este tipo de teste permite é a oportunidade do médico encaminhar a mãe para a realização de uma ecocardiografia fetal para determinar se há algum tipo de doença cardíaca congênita associada. O contrário também é recomendável, ou seja, após detectada alguma anomalia cardíaca congênita pode-se encaminhar a mãe para a realização de um teste citogenético pré-natal para possível verificação diagnóstica.¹⁵

Podemos separar a gravidez em alto risco e baixo risco de acordo com o

perfil cromossômico dos pais. Se um dos pais tiver a microdeleção 22q11.2 então seus filhos terão 50% de chances isoladamente de ter a mesma deleção, sendo esta então uma gravidez de alto risco, neste caso o FISH é recomendável utilizando-se de preparações cromossômicas obtidas de células fetais por amniocentese com 14-16 semanas de gestação, ou células das vilosidades coriônicas com 10-12 semanas de gestação. Além disso, fetos de alto risco devem ser avaliados entre 18-22 semanas por exame ultrassonográfico de alta resolução para tentar detectar possíveis anomalias palatais e ecocardiografia para checar se existe algum dano cardíaco.⁷

Alguns fetos sem história familiar, mas com indícios de doença cardíaca e/ou com fenda palatina detectados por exames ultrassonográficos de rotina podem sugerir o diagnóstico, em particular aqueles pacientes com anomalias cardíacas semelhantes às encontradas na DGS. Preparações cromossômicas obtidas de células fetais podem então ser analisadas por FISH, lembrando sempre que o diagnóstico, mesmo em uma gravidez avançada, pode ser muito útil para o suporte perinatal.¹¹

Diagnóstico Diferencial:

O diagnóstico diferencial deve ser sempre lembrado, principalmente quando nos deparamos com anomalias cardíacas ou palatinas congênitas, que são relativamente frequentes na população em geral. Casos de hipocalcemia inexplicadas devem ser investigadas quanto à DGS, assim como casos de crianças com dificuldades de aprendizagem não verbal. Algumas síndromes assemelham-se em alguns aspectos à SDG, como a Síndrome de Smith-LemliOpitz, na qual encontramos fissura palatina, ou a síndrome de Alagille, síndrome de Vater e síndrome ósteo-auricular vertebral de Goldehar.

Manejo da Criança Portadora de DGS

A fim de proporcionar o melhor atendimento possível às crianças sindrômicas, faz-se necessário uma equipe multidisciplinar que atue de forma conjunta e simultânea.⁷ Geralmente fazem parte desta equipe geneticistas, pediatras, cardiologistas, cirurgiões plásticos, foniatras, psicólogos, endocrinologistas e neurologistas, embora, dependendo da idade e dos problemas manifestados por cada criança, várias outras especialidades médicas também devam participar.

O tratamento deve ser individualizado para cada paciente, em vista das diversas apresentações fenotípicas. Em termos gerais, visa, inicialmente, à restauração da competência imune e dos níveis séricos de cálcio, pois estas alterações podem ter conseqüências potencialmente fatais.^{61,62} Posteriormente, avaliam-se os demais distúrbios presentes e planeja-se a seqüência de intervenções cirúrgicas, quando necessárias, de modo que sejam realizadas na época mais propícia.^{7,61} Alterações menores têm tratamento sintomático.

No período neonatal deve-se realizar a dosagem sérica de cálcio e a contagem absoluta dos linfócitos. Concentrações baixas de cálcio requerem suplementação.^{7,63} A tetania tende a ocorrer nas primeiras 24-48 horas de vida, devido à deficiência de paratormônio.⁶³ Na constatação de linfopenia, a criança deve ser encaminhada a um

imunologista, e é necessária a avaliação dos subtipos de linfócitos T e B⁶². Além disso, recém-nascidos com alterações linfocitárias não devem ser imunizados com vacinas vivas atenuadas.⁷

Estas crianças, pelo deficiente desenvolvimento do sistema imune, possuem susceptibilidade aumentada a uma variedade de infecções.⁶⁴ Quando não tratadas, apresentam história de infecções severas de repetição, necessitando de múltiplas hospitalizações.⁶⁴ Estudos demonstraram que, em casos de severa imunodeficiência, o transplante de tecido tímico pode restaurar a função imune normal, principalmente se realizado precocemente, antes do desenvolvimento de complicações infecciosas.⁵⁸ O transplante de células totipotentes da medula óssea, até o momento, não tem sido bem sucedido.⁶²

Ainda durante o período neonatal é recomendado o exame ultrassonográfico renal, devido à incidência de anormalidades renais em cerca de 30% destas crianças.⁷ A avaliação cardiológica torna-se imperiosa a partir do momento do diagnóstico em todas as crianças com DGS, por todas as mal-formações envolvendo as câmaras cardíacas e os grandes vasos já mencionadas.⁷

Sabe-se que distúrbios hormonais são freqüentes nesta síndrome. Além do hipoparatiroidismo, aqueles indivíduos que apresentarem déficit de crescimento necessitam de avaliação endocrinológica, pois o hormônio do crescimento pode estar deficiente. Casos de hipertireoidismo foram também documentados.⁶³

Portadores de DGS podem apresentar dificuldades para alimentação. Nestes casos, os responsáveis devem ser alertados sobre o posicionamento adequado da criança e sobre as técnicas especiais de administração de alimentos, através de contagotas ou outros instrumentos.⁵⁹ Pacientes que apresentem refluxo gastroesofágico podem ser tratados com terapia postural ou agentes pró-cinéticos. Fármacos que favoreçam a motilidade gastrointestinal e facilitem a evacuação também podem ser indicados.⁶⁵

Com o intuito de evitar atrasos na fala e déficits de fonação, é sugerido um acompanhamento fonoaudiológico precoce, iniciando já na idade de um ano. Esse

acompanhamento é igualmente importante para a detecção de anormalidades do palato e insuficiências velofaríngeas que, se presentes, devem receber reparação cirúrgica ainda em tempo hábil.^{7,59}

O prognóstico desta doença é extremamente variável, estando na dependência da severidade dos sintomas apresentados. Muitos pacientes com manifestações leves recuperam espontaneamente, ainda que de forma parcial, a atividade do sistema imune.⁶¹ Outros, praticamente assintomáticos não carecem de maiores cuidados médicos. O suporte psicológico, todavia é recomendado na maioria dos casos, a fim de facilitar a aceitação, por parte do paciente, de suas limitações.

Bibliografia

- 1) Van Hemel JO, Schaap C, Van Opstal D, Mulder MP, Niermeijer MF, Meijers JHC. Recurrence of DiGeorge syndrome: prenatal detection by FISH of a molecular 22q11 deletion. *J Med Genet* 32(8):657-8, 1995.
- 2) Jones KL (ed). *Recognizable Patterns of Human Malformation*, 5ª edição. Philadelphia, WB Saunders Company.
- 3) Greenberg F. DiGeorge syndrome: an historical review of clinical and cytogenetic features. *J Med Genet* 30:803-6, 1993.
- 4) Wilson DI, Cross IE, Goodship JA, *et al.* A prospective cytogenetic study of 36 cases of DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 51:957-63, 1992.
- 5) Carey AH, Kelly D, Halford S, *et al.* Molecular genetic study of the frequency of monosomy 22q11 in DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet* 51:964-70, 1992.
- 6) Driscoll DA, Salvin J, Sellinger B, *et al.* Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet* 30:813-17, 1993.
- 7) Mc-Donald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. *22q11 Deletion Syndrome*. The Children's Hospital of Philadelphia, 1999.
- 8) Thompson MW, McInnes RR, Willard HF (eds). *Thompson & Thompson: Genética Médica*, 5ª edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1993.
- 9) Du Montcel ST, Mendizabal H, Ayme S, Levy A, Philip N. Prevalence of 22q11 microdeletion. *J Med Genet* 33(8):719, 1996.
- 10) De Decker HP, Lawrenson JB. The 22q11.2 deletion: From diversity to a

single gene theory. *Genetics in Medicine* 3(1):2-5, 2001.

- 11) Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, Van Thienen MN, Keymolen K. The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet* 35(9):789-790, 1998.
- 12) Wilson DI, Cross IE, Wren C, *et al.* Minimum prevalence of chromosome 22q11 deletions. *Am J Hum Genet* 55:A169, 1994.
- 13) Desmaze C, Scambler P, Prieur M, Sidi D, Le Deist F, Aurias A. Routine diagnosis of DiGeorge syndrome by fluorescent in situ hybridization. *Hum Genet* 90:663-5, 1993.
- 14) McDonald-McGinn D, *et al.* 22q11 Deletion Syndrome. www.geneclinics.org/1999
- 15) Lewin MB, Lindsay EA, Baldini A. 22q11 deletions and cardiac disease. *Progress in pediatric cardiology* 6, 19-28, 1996.
- 16) Murnoz S, Garay F, Flores I. Clinical heterogeneity of the chromosome 22q11 microdeletion syndrome. *Rev Med Child*, 129(5):515-521, 2001.
- 17) Scambler JP. DiGeorge syndrome and related birth defects. *Development Biology* 5:303-310, 1994.
- 18) Berti L, Mittler G, Przemek GKM. Isolation and characterization of a novel gene from the DiGeorge chromosomal region that encodes for mediator subunit. *Genomics* 74,320-332, 2001.
- 19) Novelli G, Amati F, Dallapiccola B. UFD1L and CDC45L a role in DiGeorge syndrome and related phenotypes? *Trends in Genetics* 15(7);251-252,1999.
- 20) Botta A, Amati F, Novelli G. Causes of the phenotype-genotype dissociation in DiGeorge syndrome: clues from mouse models. *Trends in Genetics*, 17(10):551-554, 2001.
- 21) Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Publisher-Wiley-Liss.
- 22) Edelmann L, Spiteri E, Koren K, Pulijaal V. AT rich palindromes mediate the constitutional t(11;22) translocation. *Am J Hum Genet*, 68(1):1-13, 2001.
- 23) Edelmann L *et al.* A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 8, 1157-1167, 1999.
- 24) Shaikh TH, Kurahashi H, Emanuel BS. Evolutionary conserved low copy repeats in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med*, 3(1):6-13, 2001.

- 25) Lindsay EA, Halford S, Wadey R, Scambler PS, Baldini A. Molecular cytogenetic characterization of DGS region using FISH. *Genomics*, 17:403-407, 1993.
- 26) Dallapiccola B, Mingarelli R, Novelli L. The link between cytogenetics and Mendelism. *Biomed and Pharmacother*, 49: 83-93, 1995.
- 27) Novelli G, Amati F, Dallapiccola B. Individual haploinsufficient loci and the complex phenotype of DiGeorge syndrome. *Mol Med Today*, 6:10-11, 2001.
- 28) Clarck EB, Gibson W. Congenital cardiovascular malformations: an intersection of human genetics and developmental biology. *Progress in Pediatric Cardiology*, 9:199-202, 1999.
- 29) Augusseau S, Jouk S, Jalbert P, Prieur M. DiGeorge syndrome and 22q11 rearrangements. *Hum Genet*, 74:423-427, 1998.
- 30) Srivastava D, Yamagishi M. The role of d-Hand-UFD1L pathway. *Trends in Genetics*, 15(7):253.
- 31) Dunham I, Collins J, Wadey R, Scambler PJ. Possible role for COMT in psychosis associated with velocardio syndrome. *Lancet* 340:1361-1362, 1992.
- 32) Scambler PJ. The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet*, 9(16):2421-2426, 2000.
- 35) Aubry M, Marineau C,. Clonning of six new genes with zinc-finger motifs mapping to short and long arms of human acrocentric chromossome 22. *Genomics*, 13:641-648, 1992.
- 34) Lewin B. *Genes VII*, 1ª edição, Oxford Press, NY, 2000.
- 33) Aubry M, Demczuks, Desmaze C, Aikem M. Isolation of zinc finger gene consistently deleted in DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet*, 2:1583-1587, 1993.
- 36) Novelli et al. Structure and expression of the human ubiquitin fusion degradation gene (UFD1L). *Biochimice et Biophysica Acta*, 1396:158-162, 1998.
- 37) Johnson, ES et al. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, 270:17442-17456, 1995.
- 38) Del Olmo, M et al. The Uba2 and UFD1 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* interact with poly(A) polymerase and affect the polyadenylation activity of cell extracts. *Mol Gen Genet*, 255:209-218, 1997.
- 39) Botta A, Tandoi C, Fini G, Calabrese G, Dallapiccola B, Novelli G. Clonning

- and characterization of the gene encoding human NPL4, a protein interaction with the ubiquitin fusion-degradation protein (UFD1L). *Gene*, 275(1):39-46, 2001.
- 40) Fricker J. Ubiquitination gene defect found in DiGeorge syndrome. *Mol Med Today*, 5:233, 2001.
 - 41) Lindsay, EA et al. Congenital heart disease in mice deficient for DiGeorge syndrome region. *Nature* 401:379-383, 1999.
 - 42) Baldini A., DiGeorge syndrome: complex pathogenesis? Maybe, maybe not. *Mol Med Today*, 6:12, 2000.
 - 43) Halle JP, Meisterernst M. Gene expression increasing evidence for transcriptosome. *Trends Genet*, 12:161-163, 1996.
 - 44) Orphanides G, Reinberg D. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature*, 407:471-475, 1994.
 - 45) Malik S, Roeder RG. The USA-derived transcriptional coactivator PC2 is a submodule of TRAP/SMCC and acts synergistically with others PCs. *Mol Cell*, 5:753-760, 2000.
 - 46) Meisterernst M, et al. Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell*, 66:981-993, 1991.
 - 47) Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet*, 27(3):286-291, 2001
 - 48) DiGeorge Syndrome: an enigma in mice and men. *Molecular Medicine Today*, January 2000 vol.6
 - 49) Mueller FR, Young ID. *Elements of Medical Genetics*, 10^a edição. Churchill Livingstone.
 - 50) Bennet J.C., Plum F. *Cecil: Tratado de Medicina Interna* 20^a edição Vol 2 1997, Rio de Janeiro, editora Guanabara
 - 51) Buchanan L.M., Hargreaves A., Warwick M.M. Velocardiofacial syndrome or DiGeorge's anomaly. *The Lancet* 358, August 4 2001.
 - 52) Cotran R.S., Kumar V., Collins T. *Pathologic Basis of Disease*, Sixth edition 1999 Philadelphia, Pennsylvania
 - 53) Marino B, Digilio MC, Toscano A, Anaclerio S, Giannotti A, Feltri C. Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med*, 3(1):45-48, 2001.
 - 54) Huang RY, Shapiro NL. Structural airway anomalies in patients with DiGeorge

- syndrome: a current review. *Am J Otolaryngol*, 21(5):326-30, 2000
- 55) Rosenthal M, Bocian M. Multiple anomaly including thymic aplasia associated with monosomy 22. *Pediatric Res* 6:358, 1972.
- 56) Kelley RI, Zuckai EA. The association of the DiGeorge anomaly with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr* 101:197-200, 1982.
- 57) Novelli A, Sabani M. Diagnosis of DiGeorge and Williams syndromes using FISH analysis of blood smears. *Molecular and cellular probes* 303-307, 1999.
- 58) Markert M, Boeck A, Hale A. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 1180-1189, 1999.
- 59) Gerdes M, Solot C, Wang P. Taking advantage of early diagnosis: Preschool children with the 22q11.2 deletion. *Genetics in Medicine*. 3(1):40-44, January/February 2001.
- 60) H kariyazono, T Ohno, K Ihara. Rapid detection of the 22q11.2 deletion with quantitative real time PCR. *Molecular and cellular probes*. 15,71-73, 2001.
- 61) Thomas JA, Graham JM. Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)* 36:253-66, 1997.
- 62) Markert ML, Hummell DS, Rosenblatt HM, *et al.* Complete DiGeorge syndrome: persistence of profound immunodeficiency. *J Pediatr* 132:15-21, 1998.
- 63) Weinzimer SA. Endocrine aspects of the 22q11.2 deletion syndrome. *Genetics in Medicine* 3(1):19-22, 2001.
- 64) Gupta S, Aggarwal S, Nguyen T. Increased spontaneous apoptosis in T lymphocytes in DiGeorge anomaly. *Clin Exp Immunol* 113(1):65-71, 1998.
- 65) Dinulos MB, Graf WD. DiGeorge Syndrome and Velocardiofacial Syndrome. In.: Gilman S, Goldstein GW, Waxman SG (eds). *Neurobase*, volume 1.3, Nova Iorque, Arbor Press, 1998.