

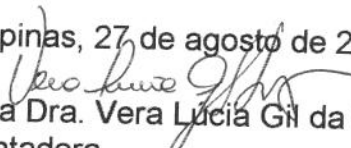
200207087

SANDRA REGINA DANTAS NASCIMENTO

**ESTUDO CLÍNICO E SEQÜENCIAMENTO
DIRETO DO GENE *TWIST* EM INDIVÍDUOS
COM SINAIS SUGESTIVOS DA
SÍNDROME DE SAETHRE-CHOTZEN**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Genética Médica da aluna **Sandra Regina Dantas Nascimento**.

Campinas, 27 de agosto de 2001.


Prof.ª Dra. Vera Lúcia Gil da S. Lopes
Orientadora

2001

SANDRA REGINA DANTAS NASCIMENTO

**ESTUDO CLÍNICO E SEQÜENCIAMENTO
DIRETO DO GENE *TWIST* EM INDIVÍDUOS
COM SINAIS SUGESTIVOS DA SÍNDROME
DE SAETHRE-CHOTZEN**

Dissertação de Mestrado, apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Genética Médica.

ORIENTADORA: *Prof^a. Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes*

CO-ORIENTADORA: *Prof^a. Dra. Maricilda Palandi de Mello*

CAMPINAS
2001

iii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	N17e
V	
T	47726
P	837/02
C	
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08-02-02
N.º CPD	

CM00163509-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

N17e

Nascimento, Sandra Regina Dantas

Estudo clínico e seqüenciamento direto do gene *Twist* em indivíduos com sinais sugestivos da síndrome de Saethre-Chotzen / Sandra Regina Dantas Nascimento. Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadores: Vera Lucia Gil da Silva Lopes, Maricilda Palandi de Mello

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Suturas cranianas. 2. Genética Humana. 3. Crânio-anomalias e deformidades. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Vera Lucia Gil da Silva Lopes. II. Maricilda Palandi de Mello. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

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

Membros:

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

2. Profa. Dra. Marly A. Spadotto Balarin

3. Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/08/2001

À minha MÃE, que tanto me ensinou com seu amor, dedicação, força e coragem.

Ao meu marido *Alexandre*, que compartilhou todos os momentos comigo, tornando tudo tão melhor...

À minha filha *Giovanna*, que compreendeu meus momentos de ausências, tornando tudo mais leve...

Agradecimentos

À *Profa. Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes*, pela amizade, confiança e oportunidade de aprender cada dia algo novo e pela boa convivência durante a elaboração desta tese.

À *Profa. Dra Maricilda Palandi de Mello*, que soube unir com perfeição o rigor científico do pesquisador com o dom de ensinar do verdadeiro mestre, sem abandonar a atenção e o apoio que só os amigos sinceros podem proporcionar.

À querida *Maria Madalena Vasconcelos Rosa (Madá)*, que muito me ensinou no laboratório do CBMEG.

À *Profa. Dra Edi Lúcia Sartorato e Profa. Dra Christine Hackel*, pela amizade e por enriquecerem minha formação durante estes anos de convivência.

À *Prof. Dra Marly A. Spadotto Balarin*, pelo atendimento a uma das famílias deste estudo e realização do exame de cariótipo, como também pela leitura criteriosa e sugestões valiosas para a elaboração final da tese.

Ao acadêmico *Juliano Cândido Batista*, pela coleta de dados desta mesma família no Ambulatório de Genética da FMTM.

À *Prof. Dra Nilma Lúcia Viguetti Campos*, Laboratório de Citogenética do DGM/Unicamp, por sua atenção e presteza na realização do exame de cariótipo das outras famílias deste estudo.

Aos colegas da pós-graduação do CBMEG e do Departamento de Genética Médica, pela amizade e agradável convívio durante a realização deste estudo.

Aos pacientes e familiares que participaram do estudo.

***"Aprendi com a primavera a me deixar cortar.
E a voltar sempre inteira".***

Cecília Meireles

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE GRÁFICOS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xx
RESUMO	xxi
SUMMARY	xxv
1. INTRODUÇÃO	29
1.1 Considerações gerais	31
1.2 Acrocefalossindactilia	32
1.2.1 Síndrome de Apert	32
1.2.2 Síndrome de Pfeiffer	33
1.2.3 Síndrome de Saethre-Chotzen	34
1.3 Aspectos Embriológicos do Desenvolvimento Normal do Crânio e dos Membros	36
1.3.1 Embriologia do Crânio	36
1.3.1.1 Neurocrânio Cartilaginoso	37
1.3.1.2 Neurocrânio Membranoso	37
1.3.1.3 Viscerocrânio	38
1.3.2 Desenvolvimento do Esqueleto Apendicular	39
1.4 Mecanismo de Regulação de Formação das Suturas Cranianas	41
1.5 Mecanismo de Regulação da Formação dos Membros	49
1.6 Gene <i>Twist</i>	52
2. OBJETIVOS	61
3. CASUÍSTICA	65

4. METODOLOGIA	69
5. RESULTADOS	81
6. DISCUSSÃO	127
7. CONCLUSÕES	137
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
9. ANEXOS	155
Anexo 1	157
Anexo 2	159
Anexo 3	165
Anexo 4	189

LISTA DE QUADROS

<u>QUADRO 1</u>	<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SÍNDROME DE APERT.</u>	32
<u>QUADRO 2</u>	<u>TIPOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SÍNDROME DE PFEIFFER.</u>	33
<u>QUADRO 3</u>	<u>LOCAIS DE AÇÃO E PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE OSSIFICAÇÃO DOS OSSOS DA CALVÁRIA.</u>	44
<u>QUADRO 4</u>	<u>MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO EXON 1 DO GENE <i>Twist</i>.</u>	58
<u>QUADRO 5</u>	<u>CONDIÇÕES PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS <i>Twist</i> 1, 2 E 4.</u>	75
<u>QUADRO 6</u>	<u>COMPONENTES E VOLUMES PARA A PCR.</u>	76
<u>QUADRO 7</u>	<u>SOLUÇÃO DE ESTOQUE TBE 10X.</u>	76
<u>QUADRO 8</u>	<u>COMPONENTES E CONDIÇÕES PARA VERIFICAÇÃO DA CORRETA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA PCR EM GEL DE AGAROSE 1,5 %.</u>	77
<u>QUADRO 9</u>	<u>COMPONENTES E VOLUMES PARA PRÉ-TRATAMENTO DO PRODUTO DE PCR.</u>	77
<u>QUADRO 10</u>	<u>TEMPERATURA E TEMPO PARA PRÉ-TRATAMENTO DO PRODUTO DE PCR.</u>	78
<u>QUADRO 11</u>	<u>COMPONENTES E VOLUMES PARA O SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO DE PCR COM <i>PRIMER SENSE</i> OU <i>ANTISENSE</i>.</u>	78
<u>QUADRO 12</u>	<u>CICLAGEM DA REAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO.</u>	78
<u>QUADRO 13</u>	<u>COMPONENTES E VOLUME PARA PREPARAÇÃO DO GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA 7%.</u>	79
<u>QUADRO 14</u>	<u>DADOS ANTROPOMÉTRICOS E PERCENTIS DOS INDIVÍDUOS AFETADOS DA FAMÍLIA 1.</u>	90
<u>QUADRO 15</u>	<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA FAMÍLIA 1.</u>	90
<u>QUADRO 16</u>	<u>RESULTADOS DOS EXAMES COMPLEMENTARES DOS INDIVÍDUOS</u>	92
<u>QUADRO 17</u>	<u>DADOS ANTROPOMÉTRICOS E PERCENTIS DOS INDIVÍDUOS AFETADOS DA FAMÍLIA 2.</u>	98
<u>QUADRO 18</u>	<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA FAMÍLIA 2.</u>	99
<u>QUADRO 19</u>	<u>RESULTADOS DOS EXAMES COMPLEMENTARES DOS INDIVÍDUOS</u>	100
<u>QUADRO 20</u>	<u>DADOS ANTROPOMÉTRICOS E PERCENTIS DOS INDIVÍDUOS AFETADOS DA FAMÍLIA 3.</u>	104

<u>QUADRO 21</u>	<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA FAMÍLIA 3.</u>	105
<u>QUADRO 22</u>	<u>RESULTADOS DOS EXAMES COMPLEMENTARES DO INDIVÍDUO III-2</u>	106
<u>QUADRO 23</u>	<u>DADOS ANTROPOMÉTRICOS E PERCENTIS DOS INDIVÍDUOS AFETADOS DA FAMÍLIA 4.</u>	110
<u>QUADRO 24</u>	<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA FAMÍLIA 4.</u>	111
<u>QUADRO 25</u>	<u>RESULTADOS DOS EXAMES COMPLEMENTARES DO INDIVÍDUO III-1</u>	112
<u>QUADRO 26</u>	<u>FREQÜÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS NOS INDIVÍDUOS DAS 4 FAMÍLIAS ESTUDADAS.</u>	113
<u>QUADRO 27</u>	<u>INDIVÍDUOS QUE REALIZARAM OS EXAMES COMPLEMENTARES E AS ALTERAÇÕES RADIOLÓGICAS.</u>	115
<u>QUADRO 28</u>	<u>RESULTADO DO EXAME DE CARIÓTIPO COM BANDAMENTO G.</u>	116
<u>QUADRO 29</u>	<u>COMPONENTES PARA A REAÇÃO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO HAE II.</u>	121

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<u>REPRESENTAÇÃO DA PRÉ-SUTURA, FORMAÇÃO E FUSÃO DA SUTURA.</u>	43
FIGURA 2	<u>REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ASSOCIAÇÕES CONHECIDAS, E POUCO CONHECIDAS ENTRE FATORES LIGADOS A CRANIOSSINOSTOSES.</u>	46
FIGURA 3	<u>ESTRUTURA PRIMÁRIA DO FGFR.</u>	47
FIGURA 4	<u>MODELO DE DIMERIZAÇÃO INDUZIDA PELA HEPARINA E ATIVAÇÃO DO FGFR.</u>	49
FIGURA 5	<u>VIAS DE TRANSDUÇÃO DO SINAL, ATIVADAS PELA LIGAÇÃO DE DUAS FGFS AOS SEUS RECEPTORES.</u>	49
FIGURA 6	<u>DIAGRAMA ESQUEMÁTICO ILUSTRANDO O MODELO PROPOSTO DO DESENVOLVIMENTO DIGITAL EM AVES.</u>	51
FIGURA 7	<u>ESQUEMA REPRESENTATIVO DO GENE <i>Twist</i>.</u>	54
FIGURA 8	<u>MODELO DA PROTEÍNA TWIST, MOSTRANDO A ESTRUTURA BÁSICA HELIX-LOOP-HELIX (B-HLH).</u>	56
FIGURA 9	<u>HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 1.</u>	84
FIGURA 10	<u>HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 2.</u>	94
FIGURA 11	<u>HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 3.</u>	102
FIGURA 12	<u>HEREDOGRAMA DA FAMÍLIA 4.</u>	108
FIGURA 13	<u>DEMONSTRATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO TWIST 1.</u>	117
FIGURA 14	<u>DEMONSTRATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO TWIST 2.</u>	119
FIGURA 15	<u>DEMONSTRATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO TWIST 4.</u>	119
FIGURA 16	<u>PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO COM <i>PRIMER SENSE</i> DO FRAGMENTO</u>	120
	<u>.....</u>	
FIGURA 17	<u>DEMONSTRATIVO DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO TWIST 1 APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>Hae II</i>.</u>	123
FIGURA 18	<u>PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO COM O <i>PRIMER SENSE</i> DO FRAGMENTO TWIST 1</u>	123
	<u>.....</u>	
FIGURA 19	<u>PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO COM <i>PRIMER ANTISENSE</i> DO FRAGMENTO TWIST 2</u>	124
	<u>.....</u>	
FIGURA 20	<u>PARTE DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO COM <i>PRIMER ANTISENSE</i> DO FRAGMENTO TWIST 4</u>	125
	<u>.....</u>	

<u>FIGURA 21 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO II-2 DA FAMÍLIA 1.</u>	167
<u>FIGURA 22 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-1 DA FAMÍLIA 1.</u>	168
<u>FIGURA 23 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-2 DA FAMÍLIA 1.</u>	169
<u>FIGURA 24 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-3 DA FAMÍLIA 1.</u>	170
<u>FIGURA 25 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-5 DA FAMÍLIA 1.</u>	171
<u>FIGURA 26 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-8 DA FAMÍLIA 1.</u>	172
<u>FIGURA 27 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-1 DA FAMÍLIA 1.</u>	173
<u>FIGURA 28 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-2 DA FAMÍLIA 1.</u>	174
<u>FIGURA 29 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-3 DA FAMÍLIA 1.</u>	175
<u>FIGURA 30 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-4 DA FAMÍLIA 1.</u>	176
<u>FIGURA 31 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-5 DA FAMÍLIA 1.</u>	177
<u>FIGURA 32 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-7 DA FAMÍLIA 1.</u>	178
<u>FIGURA 33 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-8 DA FAMÍLIA 1.</u>	179
<u>FIGURA 34 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-9 DA FAMÍLIA 1.</u>	180
<u>FIGURA 35 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO II-1 DA FAMÍLIA 2.</u>	181
<u>FIGURA 36 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-8 DA FAMÍLIA 2.</u>	182
<u>FIGURA 37 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-5 DA FAMÍLIA 2.</u>	183
<u>FIGURA 38 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-6 DA FAMÍLIA 2.</u>	184
<u>FIGURA 39 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-7 DA FAMÍLIA 2.</u>	185
<u>FIGURA 40 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO IV-8 DA FAMÍLIA 2.</u>	186
<u>FIGURA 41 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-2 DA FAMÍLIA 3.</u>	187
<u>FIGURA 42 FOTOGRAFIAS DO INDIVÍDUO III-1 DA FAMÍLIA 4.</u>	188

LISTA DE GRÁFICOS

<u>GRÁFICO 1</u>	<u>GRÁFICO DE DESENVOLVIMENTO PÔNDERO-ESTATURAL PARA SEXO FEMININO</u>	189
<u>GRÁFICO 2</u>	<u>GRÁFICO DE DESENVOLVIMENTO PÔNDERO-ESTATURAL PARA SEXO</u>	
	<u>MASCULINO</u>	190
<u>GRÁFICO 3</u>	<u>GRÁFICOS DE DESENVOLVIMENTO DO PERÍMETRO CEFÁLICO PARA SEXO</u>	
	<u>FEMININO E MASCULINO</u>	191
<u>GRÁFICO 4</u>	<u>GRÁFICOS DA DISTÂNCIA INTERCANTAL EXTERNA DOS OLHOS -DICE,</u>	
	<u>DISTÂNCIA INTERCANTAL INTERNA DOS OLHOS -DICI E DISTÂNCIA INTERPUPILAR –</u>	
	<u>DIP (PARA AMBOS OS SEXOS)</u>	192
<u>GRÁFICO 5</u>	<u>GRÁFICOS DE COMPRIMENTO DA MÃO (PALMA), DEDO MÉDIO E RELAÇÃO</u>	
	<u>DEDO MÉDIO/MÃO TOTAL (PARA AMBOS OS SEXOS)</u>	193
<u>GRÁFICO 6</u>	<u>GRÁFICOS DE COMPRIMENTO DA ORELHA (PARA AMBOS OS SEXOS)</u>	194
<u>GRÁFICO 7</u>	<u>GRÁFICO DE MEDIDAS DO COMPRIMENTO DO PÉ</u>	194

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	Acrocefalossindactilia
AER	Apical Ectodermal Ridge
AP	Alcaline Phosphatase
b-HLH	basic Helix-loop-helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BPS	Binding Sialoprotein
CBFA1	Core-Binding Factor, Runt Domain, Alpha Subunit 1
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
ID	Inhibitor of DNA binding
IGF-I	Insulin-like Growth Factor I
MSX	Muscle Segment Homeo Box
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim
ON	Osteonectin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTC	Patched, Drosophila, Homolog of
RNA	Ribose Nucleic Acid
SHH	Sonic hedgehog
SCS	Saethre-Chotzen Syndrome
SSC	Síndrome de Saethre-Chotzen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta

RESUMO

A Síndrome de Saethre-Chotzen (SSC, Acrocefalossindactilia tipo III) é uma heredopatia autossômica dominante, com alta penetrância e expressividade variável, sendo craniossinostose um de seus principais sinais clínicos. Mutações nos genes *FGFR1-FGFR3* e *Twist* são causas conhecidas de craniossinostoses, a primeira por aumento da expressão e a última por haploinsuficiência. O gene *Twist* foi mapeado na região 7p21 e algumas deleções e translocações balanceadas, bem como mutações no *exon 1* deste gene, têm sido descritas nas formas de craniossinostose associadas a SSC. Quatro famílias brasileiras com ACS III foram avaliadas do ponto de vista dismorfológico e rastreadas para mutações no gene *Twist*. O protocolo de investigação incluiu exame dismorfológico dirigido, estudo de imagem (radiografia de crânio, tórax, coluna vertebral, tomografia computadorizada de crânio e ultrassonografia abdominal), estudo citogenético com bandamento G e seqüenciamento direto de DNA dos produtos de PCR amplificados para o *exon 1* do gene *Twist*, nos indivíduos que apresentavam ao menos um sinal clínico desta condição. Ao exame, observou-se importante variabilidade de características faciais, incluindo assimetria facial (20/24), braquicefalia (16/24), orelhas com acentuação do ramo da hélice (15/24) e implantação baixa (13/24), hipoplasia malar (13/24), ponte nasal proeminente (13/24), implantação baixa dos cabelos na fronte (12/24), ptose palpebral (12/24). Achados adicionais incluíram sindactilia cutânea parcial dos artelhos (18/24), clinodactilia do 5º dedo (13/24), háluces alargados (13/24). Somente em uma família observou-se sindactilia cutânea total, entre o 2º e 3º artelhos. Sete indivíduos apresentaram radiografia de crânio com craniossinostose bicoronal, um, craniossinostose unicoronal e dois com forame parietal bilateral. O sinal da prata batida apareceu nos oito casos. A radiografia de tórax em dois indivíduos mostrou fusão parcial dos 1º e 2º arcos costais à esquerda e na radiografia de coluna lombo-sacra dois casos apresentaram espinha bífida lombar. O exame de cariótipo dos propósitos de cada família foi normal e o estudo molecular não detectou alterações no *exon 1* do gene *Twist*.

Esse estudo reforça a importância da avaliação dismorfológica em SSC e sugere que o emprego de outras técnicas de biologia molecular poderia contribuir para elucidar o papel do gene *Twist* nos achados clínicos desta casuística.

Além disso, os distúrbios detectados poderiam, ainda, ser decorrentes de outros genes envolvidos na regulação do desenvolvimento craniofacial e de membros.

SUMMARY

Saethre-Chotzen syndrome (acrocephalosyndactyly type III) is an autosomal dominant craniosynostosis condition, with high penetrance and variable expressivity. Mutations in the *Fgfr1-Fgfr3* and *Twist* genes are known to cause craniosynostosis, the former by constitutive activation and the latter by haploinsufficiency. The *Twist* gene maps to 7p21 and mutations in the gene have been reported in the SCS form of craniosynostosis.

The aims of this study were characterize the dysmorphological variability and mutations in exon 1 of *Twist* gene using direct sequencing in four Brazilian families presenting SCS. Twenty-four patients were included in our study, diagnosed as having features of Saethre-Chotzen syndrome. The phenotypic characteristics of all patients were inventoried. Also, a DNA test had been performed and their genotype was noted. Facial features, present were facial asymmetry (20/24), brachycephaly (16/24), small ear with prominent crura (15/24), maxillary hypoplasia (13/24), lowset ears (13/24), and ptosis of the eyelids (12/24), lowset frontal hairline (12/24), ocular hypertelorism (11/24). Additional findings included partial hands and feet cutaneous syndactyly (18/24), clinodactyly (13/24), and broad great toes (13/24); in one family was observed total cutaneous syndactyly in feet. Skull X-rays were abnormal in 8 patients in which it was performed; partial fusion of 1st and 2nd ribs was detected in 2 individuals and 2 had lumbar spina bifida. Chromosomal analysis on GTG-banding were normal.

The analysis was carried out by direct DNA sequencing of PCR amplified products for exon 1 in the proband of each family. No *Twist* mutations were found.

In conclusion, this four SCS families may have mutations in other genes of the same developmental pathway. This study reinforces the importance of the dysmorphological evaluation in patients with craniosynostosis, as well as all their families, especially ACS III, in which inter and intrafamilial variability make the diagnosis more difficult.

1.INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As Acrocefalossindactilias (Do grego *akros* = ponta, *kefalos* = crânio, *syn* = reunião, *dáctilo* = dedo) constituem um grupo de defeitos congênitos com similaridade fenotípica, evidenciada por craniossinostose, hipertelorismo ocular, proeminência nasal, ponta nasal caída, hipodesenvolvimento de face média e anomalias variáveis de mãos e pés. Inclui-se neste grupo, a Síndrome de Apert (ACS Tipo I, OMIM 101200), Síndrome de Saethre-Chotzen (ACS Tipo III, OMIM 101400) e Síndrome de Pfeiffer (ACS Tipo V, OMIM 101600).

A craniossinostose foi mencionada pela primeira vez por Homero na pessoa de Tércites, *"cujá cabeça terminava em ponta... conquanto orador de palavra fluente... o homem mais feio de quantos no cerco de Tróia se achavam"*. ILÍADA II, v. 212-246 (Menkes, 1984). Este sinal clínico tem incidência de 1:2500 nascidos vivos e pode ser definido como a fusão prematura de uma ou mais suturas dos ossos chatos do crânio, acarretando em conformação craniana anormal, com conseqüente hipertensão intracraniana, diminuição de fluxo sangüíneo cerebral, obstrução de vias aéreas, diminuição da acuidade visual e auditiva, déficit de aprendizado e efeitos psicológicos adversos (Cohen, 1986).

Tanto fatores genéticos como não genéticos contribuem para causar a falha do tecido da sutura na execução de suas funções proliferativas e anti-diferenciativas (Wilkie *et al.*, 1997). As craniossinostoses isoladas podem ocorrer devido à interferência de fatores ambientais (mecânicos) e genéticos (multifatoriais, isoladas com transmissão entre gerações, ou ainda como parte de quadros de anomalias congênitas múltiplas) (Cohen, 1986).

Atualmente, considera-se que a formação e o desenvolvimento do crânio estão relacionados a um complexo mecanismo de regulação gênica, do qual faz parte o gene *Twist*.

Neste estudo, será abordado o papel deste gene em indivíduos com sinais clínicos sugestivos de Síndrome de Saethre-Chotzen.

1.2 ACROCEFALOSSINDACTILIAS (ACS)

1.2.1 SÍNDROME DE APERT (ACS I, OMIM 101200)

A Síndrome de Apert é uma heredopatia autossômica dominante, relacionada a mutações no gene *FGFR2*, localizado na região 10q26, com incidência de 1:100.000 nascidos vivos. No Quadro 1 estão as principais características clínicas da Síndrome de Apert (Cohen & Kreiborg, 1993).

Quadro 1 Características clínicas da Síndrome de Apert (Cohen & Kreiborg, 1993).

	Síndrome de Apert
Intelecto	Atraso do desenvolvimento motor Deficiência mental
Craniofacial	Craniossinostose Turribráquicefalia Hipoplasia de linha média da face de moderada a severa
Membros	Sindactilia de tecidos moles e ósseos dos dedos e artelhos, envolvendo número variável de dedos. Anquilose de cotovelos
Outras	Fusão de vértebras cervicais Hidrocefalia é incomum, mas ocasionalmente associada a anormalidades de órgãos internos.

1.2.2 SÍNDROME DE PFEIFFER (ACS V, OMIM 101600)

A Síndrome de Pfeiffer é uma heredopatia autossômica dominante, com incidência de 1:100.000 nascidos vivos, muito heterogênea tanto nos aspectos clínicos quanto moleculares, relacionados a mutações nos genes *FGFR1* (OMIM 136350), localizado na região 8p11.2-p11.1 e *FGFR2* (OMIM 176943), localizado na região 10q26. Cohen (1993) propôs a divisão da síndrome em três tipos, obedecendo a aspectos clínicos (Quadro 2).

Quadro 2 Tipos e características clínicas da Síndrome de Pfeiffer (Cohen,1993).

	Síndrome de Pfeiffer Tipo 1	Síndrome de Pfeiffer Tipo 2	Síndrome de Pfeiffer Tipo 3
Intelecto	Normal	Atraso do desenvolvimento motor Deficiência mental	
Craniofacial	Craniossinostose Hipoplasia de linha média da face de moderada à severa	Craniossinostose com crânio em forma de trevo Proptose extrema	Craniossinostose com crânio de conformação turribraquicefálica Proptose extrema
Membros	Polegares e háluces alargados, desviados medialmente Sindactilia de tecidos moles Braquidactilia	Polegares e háluces alargados, desviados medialmente Sindactilia de tecidos moles Anquilose dos cotovelos e joelhos Braquidactilia	
Outras alterações	Deficiência auditiva Hidrocefalia	Atresia e estenose de coanas Anormalidades laringotraqueais Hidrocefalia, convulsões e aumento do risco para morte precoce.	

1.2.3 SÍNDROME DE SAETHRE-CHOTZEN (ACS III; OMIM 101400)

Descrita pelos médicos Haakon Saethre (1931) e F. Chotzen em (1932), esta síndrome tem vários graus de anomalias do crânio, causando acrocefalia, braquicefalia, plagiocefalia ou trigonocefalia. As características faciais incluem implantação baixa dos cabelos na fronte, assimetria facial, hipoplasia maxilar, prognatismo mandibular, além de orelhas pequenas, dismórficas e com implantação baixa. Anomalias oculares como blefaroptose, estrabismo, epicanto, estenoses do ducto lacrimais estão descritas e, em raros casos, pode haver a perda da visão devido à atrofia do nervo óptico por compressão óssea (Howard *et al.*, 1997).

O nariz pode apresentar desvio do septo, ponte baixa ou proeminente e, na região oral, tem sido relatados palato ogival e anomalias dentárias (dentes ausentes, supranumerários ou anômalos), levando a má oclusão (Reardon *et al.*, 1994).

Dentre as anomalias digitais características da Síndrome de Saethre-Chotzen destacam-se sindactilia cutânea parcial ou total, preferencialmente entre 2º e 3º dedos; prega única nas palmas, braquidactilia, polegares alargados ou digitiformes, clinodactilia, háluces alargados e (ou) valgos, também estão descritos (Gorlin *et al.*, 1990; Reardon *et al.*, 1994; Wilkie *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1997; El Ghouzzi *et al.*, 1999).

Alguns indivíduos afetados podem apresentar, ainda, baixa estatura e anormalidades músculo-esqueléticas como fusão de vértebras cervicais, sinostose radio-ulnar, limitação da mobilidade articular, principalmente incapacidade para a extensão completa de cotovelos. Também foram descritos defeitos cardíacos, criptorquidia e anomalias renais (Kopysc *et al.*, 1980; Gorlin *et al.*, 1990; Reardon *et al.*, 1994).

O indivíduo afetado, de modo geral, tem inteligência normal, entretanto, deficiência mental moderada e convulsão já foram relatadas (Kopysc *et al.*, 1980; Wilkie *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1997; El Ghouzzi *et al.*, 1999).

O mecanismo de transmissão é autossômico dominante com alta penetrância e expressividade variável, o que pode dificultar o diagnóstico de formas mais brandas. Assim, a prevalência estimada de nascimento é 1/25.000 - 1/50.000 (Paznekas *et al.*, 1998).

A história da Síndrome de Saethre-Chotzen seguiu uma rota comum em genética molecular, através de estudos de ligação e identificação de translocações em indivíduos com o fenótipo desta síndrome, levou a clonagem de posição, identificação de um gene candidato e suas mutações (Zackai & Stolle, 1998).

O *locus* da SSC foi mapeado na região cromossômica 7p21-p22 por análise de ligação (Brueton *et al.*, 1992; Lewanda *et al.*, 1994; van Herwerden *et al.*, 1994).

Estudos posteriores descreveram mutações no gene *Twist* (OMIM 601622), localizado na região 7p21, em indivíduos com fenótipo de SSC. Este gene codifica um fator de transcrição envolvido na morfogênese craniofacial e de membros (Wilkie *et al.*, 1995; Bougeois *et al.*, 1996; El Ghouzzi *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1997; Paznekas *et al.*, 1998; El Ghouzzi *et al.*, 1999).

Entretanto, a utilização do rastreamento destas mutações para o diagnóstico da SSC tem encontrado controvérsia entre diferentes autores (Paznekas *et al.*, 1998; El Ghouzzi *et al.*, 1999; El Ghouzzi *et al.*, 2000). A frequência observada de mutações no gene *Twist* é inferior à esperada, tornando difícil à correlação genótipo-fenótipo (Paznekas *et al.*, 1998).

Em estudos com pacientes portadores de SSC, sem mutação no gene *Twist*, foram encontradas alterações no gene *FGFR2* (OMIM 176943) e no gene *FGFR3* (OMIM 134934), sugerindo a existência de uma via mais complexa na regulação do desenvolvimento craniofacial e de membros, envolvendo a interação entre várias proteínas (Reardon *et al.*, 1997; Paznekas *et al.*, 1998; Passos-Bueno *et al.*, 1999).

1.3 ASPECTOS EMBRIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO NORMAL DO CRÂNIO E DOS MEMBROS

Para melhor compreensão dos mecanismos embriogênicos envolvidos nas ACS, optou-se descrevê-los em separado.

1.3.1 EMBRIOLOGIA DO CRÂNIO

A morfogênese dos ossos da abóbada craniana e do complexo facial é um longo processo, iniciado precocemente na embriogênese e completado durante a idade adulta.

O sistema esquelético origina-se de células do mesoderma e da crista neural. Ao final do período de gastrulação, três camadas de tecidos primários, ectoderme, mesoderme e endoderme, estão presentes no embrião. A quarta camada torna-se identificável com a migração da crista neural, que ocorre entre os 19-38 dias no embrião humano (Opperman, 2000). A crista neural desenvolve-se próxima a terceira e quarta semana de idade gestacional, e contém uma população de células migratórias, que inicialmente dispõe-se como uma camada celular idêntica ao longo de todo o embrião, mas rapidamente diferencia-se em crista neural cefálica e crista neural truncal.

O segmento cefálico origina a maior parte do mesênquima da cabeça, derivando dela seu esqueleto, tecido conjuntivo, musculatura e as células que formam a bainha do sistema nervoso periférico. As células mesenquimais possuem a capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares, como fibroblastos, condroblastos ou osteoblastos (Moore, 2000).

O crânio desenvolve-se a partir do mesênquima em torno do encéfalo em desenvolvimento. É constituído pelo neurocrânio cartilaginoso, membranoso e viscerocrânio (esqueleto da face).

1.3.1.1 Neurocrânio Cartilaginoso

Inicialmente, o neurocrânio cartilaginoso ou condrocrânio é constituído pela base cartilaginosa do crânio em desenvolvimento, que se forma pela fusão da cartilagem paracordal ou placa basal que originará a base do osso occipital bem como os limites do forâmen magno, e cartilagem hipofisária que formará o corpo do osso esfenóide. Mais tarde ocorrerá a ossificação endocondral, formando os ossos da base do crânio, começando com os ossos occipitais, basiesfenóides (corpo esfenóide), etmóides e temporais (partes petrosa e mastóidea) (Moore, 2000).

1.3.1.2 Neurocrânio Membranoso

A ossificação intramembranosa ocorre no mesênquima lateral e na porção superior ao encéfalo, formando a calvária. O desenvolvimento da calvária difere bastante daquele apresentado pela base do crânio, caracteristicamente mais complexo, lento e harmônico quanto ao crescimento e fusão do tecido cartilaginoso. Durante a vida fetal, os ossos chatos da calvária estão separados por membranas de tecido conjuntivo denso, que formam articulações fibrosas, denominadas *Suturas*, que dependendo de sua posição em relação aos ossos do crânio, podem ser denominadas de frontal ou metópica, sagital, coronária, lambdóide e temporal. As suturas contêm células osteogênicas imaturas com rápida capacidade divisória. Uma proporção destas se diferencia em osteoblastos e produz novo osso (Wilkie, 1997; Opperman, 2000). Seis grandes áreas fibrosas denominadas *Fontanelas* estão presentes onde várias suturas se unem.

Da mesma forma que as suturas, as fontanelas podem ser classificadas de acordo com sua localização em relação aos ossos do crânio, em anterior ou bregmática, ântero-laterais (esfenóides), pósterio-laterais (mastóides) e posterior ou lambdóide. Com 18 semanas os ossos mineralizados e as suturas são induzidos ao longo das linhas de aproximação, conseqüentemente, o crânio se alarga devido ao crescimento oposicional das suturas, com deposição de matriz

óssea pré-mineralizada (osteóide) ao longo das suturas marginais (Wilkie *et al.*, 1997; Moore, 2000).

Normalmente a fontanela posterior, fecha-se aos três meses e a anterior aos oito meses de idade extra-uterina. O crânio tem um período de máximo crescimento nos primeiros 12 meses de vida extra-uterina e continua crescendo até os 12 anos de idade. A ossificação completa se dá em torno dos 50 anos. (Moore, 2000).

1.3.1.3 Viscerocrânio

O viscerocrânio forma o esqueleto da face. A cartilagem do primeiro arco faríngeo forma os ossos bigorna e martelo, e o segundo arco dá origem ao estribo e ao processo estilóide do osso temporal. As cartilagens do segundo e terceiro arcos faríngeos formam o osso hióide.

A proeminência maxilar do primeiro arco faríngeo sofre ossificação intramembranosa, formando a porção escamosa do osso temporal, maxilar e zigomático. O mesênquima da saliência mandibular se condensa em torno da cartilagem e sofre ossificação intramembranosa para formar a mandíbula (Moore, 2000).

O crânio pode assumir algumas formas características dependendo da sutura específica envolvida na desordem de progressão da ossificação, sendo classificadas, morfologicamente, em:

Acrocefalia (Do grego *akros* = ponta e *kefalos* = crânio): também conhecida como turricefalia, trata-se de um fechamento de múltiplas suturas precocemente. Caracteriza-se por um excesso de altura do crânio com estiramento vertical da frente.

Braquicefalia (Do grego *braqui* = plano e *kefalos* = crânio): fusão bilateral das suturas coronais produzindo aumento da distância bitemporal e diminuição antero-posterior da abóbada craniana.

Trigonocefalia (Do grego *trigonos* = triangular e *kefalos* = crânio): corresponde ao fechamento precoce da sutura metópica. Clinicamente manifesta-se com proeminência da região frontal acompanhada de hipoteleorbitismo associado à rotação látero-posterior das órbitas.

Plagiocefalia (Do grego *plagios* = oblíquo e *kefalos* = crânio): decorre da fusão precoce unilateral da sutura coronal produzindo uma assimetria craniana. Observa-se uma deformidade em três dimensões. A órbita afetada encontra-se para fora, para cima e para trás do plano da face.

Escafocefalia (Do grego *skafh* = barco e *kefalos* = crânio): decorre de uma fusão prematura da sutura sagital, caracterizando-se por uma diminuição na dimensão bitemporal, e alongamento antero-posterior do crânio.

Oxicefalia (Do grego *oxis* = agudo e *kefalos* = crânio): fusão prematura de múltiplas suturas, (sagital e coronal). O crânio apresenta freqüentemente uma diminuição em sua dimensão horizontal.

1.3.2 DESENVOLVIMENTO DO ESQUELETO APENDICULAR

O esqueleto apendicular é constituído pelas cinturas escapular e pélvica e pelos ossos dos membros.

Os ossos mesenquimais formam-se durante a 5ª semana do desenvolvimento embrionário, quando condensações do mesênquima aparecem nos brotos dos membros. Durante a 6ª semana, os moldes de ossos mesenquimais dos membros tornam-se cartilaginosos, formando os moldes de cartilagem hialina para os ossos. A clavícula se desenvolve, inicialmente, por ossificação intramembranosa e, mais tarde, forma cartilagens de crescimento em ambas as extremidades. Os moldes da cintura escapular e dos ossos dos membros superiores aparecem ligeiramente antes dos da cintura pélvica e dos membros inferiores.

Os moldes aparecem em seqüência próximo-distal.

Nos ossos longos, a ossificação começa durante a oitava semana nas diáfises dos ossos nos **centros primários de ossificação**. Com 12 semanas, aparecem em quase todos os ossos dos membros. As clavículas começam a ossificar-se antes de qualquer outro osso do corpo. Os fêmures são os próximos a mostrar traços de ossificação. Centros primários de ossificação aparecem em momentos diferentes nos ossos; porém na maioria deles aparece entre a 7^a e a 12^a semana do desenvolvimento. A parte de um osso que é ossificada a partir de um centro primário é a diáfise (Moore, 2000).

Os **centros secundários de ossificação** do joelho são os primeiros a aparecer.

Os centros da extremidade proximal da tíbia usualmente aparecem durante o último mês de vida intra-uterina, conseqüentemente, estão presentes ao nascimento, no entanto a maioria desses centros aparece no período pós-natal.

A parte ossificada a partir de um centro secundário é a epífise.

O osso formado por um centro primário da diáfise só se funde com o formado pelos centros secundários das epífises depois do osso atingir seu tamanho adulto.

Durante o crescimento do osso, uma placa de cartilagem (disco cartilaginosa epifisário) situa-se entre a diáfise e a epífise. O disco é finalmente substituído por osso que se forma de ambos os lados, diafisário e epifisário cessando o crescimento ósseo.

As articulações originam-se do mesênquima interzonal entre os primórdios dos ossos. Em uma articulação fibrosa, o mesênquima interposto diferencia-se em tecido conjuntivo fibroso denso. Na articulação cartilaginosa o mesênquima interposto diferencia-se em cartilagem. Na articulação sinovial, dentro do mesênquima interposto forma-se uma cavidade sinovial por degeneração das células. O mesênquima também dá origem à membrana sinovial e ao ligamento capsular e a outros ligamentos da articulação (Moore, 2000).

1.4 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA FORMAÇÃO DAS SUTURAS CRANIANAS

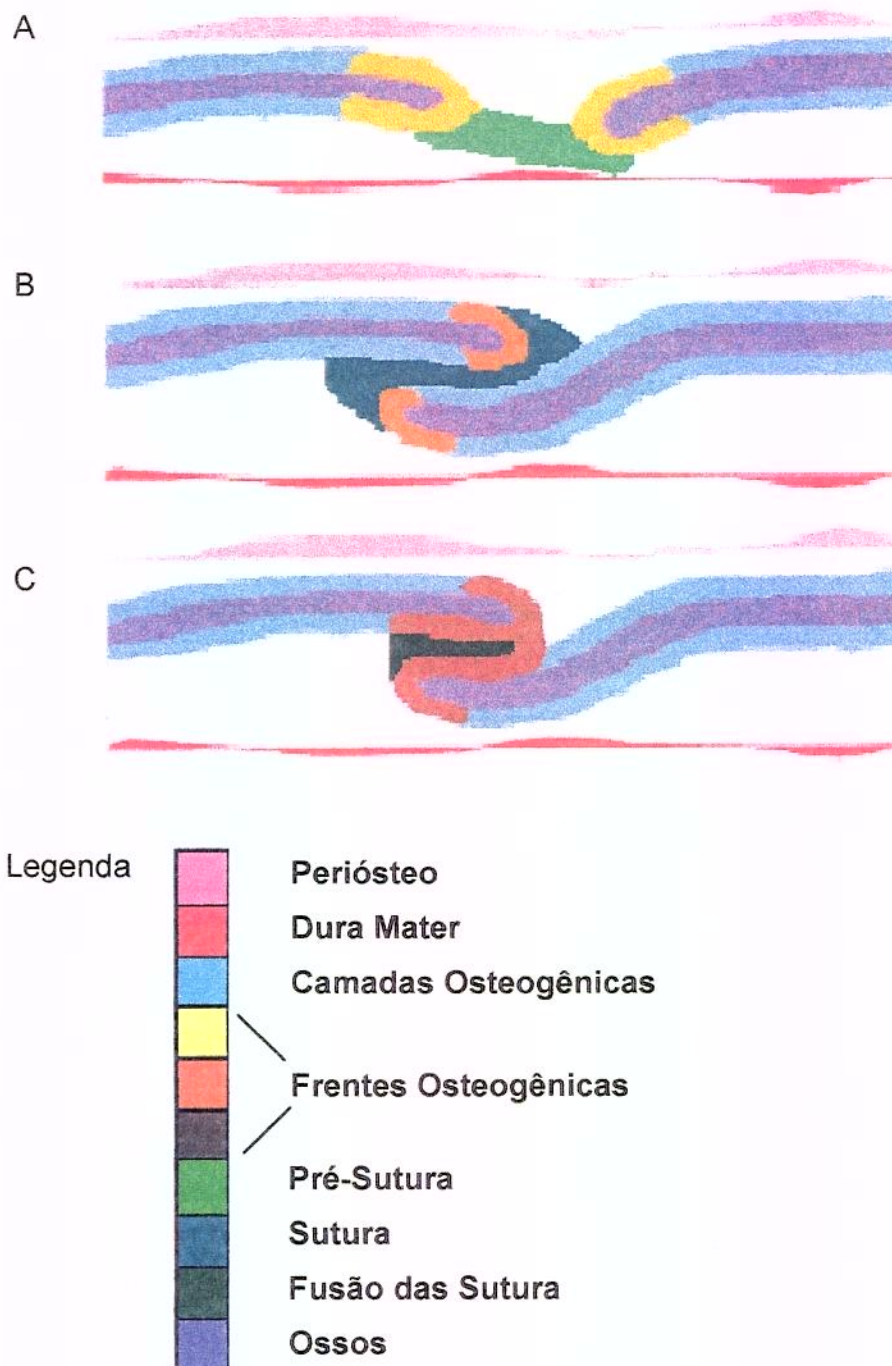
A craniossinostose ocorre como resultado da perturbação do equilíbrio entre os fatores envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose das células da sutura craniana.

Para compreender os eventos que levam a craniossinostoses, vários pesquisadores utilizaram modelos animais, principalmente o murino, para estudar o mecanismo biomolecular que ocorre antes, durante e após a fusão da sutura craniana (Wilkie *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Fragale *et al.*, 1999; Opperman, 2000; Rice *et al.*, 2000; Greenwald *et al.*, 2001).

É importante observar a distribuição e localização das proteínas envolvidas na morfogênese da sutura, para entender o mecanismo e regulação durante a fusão precoce.

O mecanismo de formação da sutura é um processo equilibrado por proteínas estimuladoras e inibitórias do processo de crescimento. É através da modulação de expressão entre estas proteínas que temos o desenvolvimento harmônico dos ossos da calvária (Figura 1). As proteínas envolvidas neste processo e sua localização estão indicadas no Quadro 3.

Figura 1 Representação da pré-sutura (A), formação da sutura (B) e fusão da sutura (C) (Opperman, 2000).



Quadro 3 Locais de ação e proteínas envolvidas no processo de ossificação dos ossos da calvária (Opperman, 2000).

LOCALIZAÇÃO	PROTEÍNAS
Dura Mater	TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, FGFR3c, MSX1, MSX2, FGF-2, FGFR1, FGF-9, BMP-4, BMP-7
Camadas Osteogênicas	FGFR1c, FGFR2, FGFR3c, Colágeno tipo I, BMP-4, BMP-7, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3
Frentes Osteogênicas	MSX2, TGF- β 1, TGF- β 3, FGFR1c, FGFR3c, FGFR2b& c, ID, Colágeno tipo I & III, AP, BMP-2, BMP-7 FGFR1, FGFR2c, FGFR3c, ID, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Colágeno tipo I & III, SHH, PTC, BMP-4, MSX2, AP, CBFA1 TGF- β 1, TGF- β 2, Colágeno tipo I & III, FGF-2, IGF-I, BSP-I, OC, CBFA1
Pré-Sutura	TWIST, Colágeno tipo III, MSX1, MSX2, BMP-4, BMP-7, FGF-4, FGF-9
Sutura	MSX1, Colágeno III, FGFR1, FGF-9
Fusão da Sutura	Colágeno tipo I, TGF- β 1, TGF- β 2, FGFR1, FGFR2, MSX2, OC, BSP-I
Ossos	BSP-I, BSP-II, Colágeno tipo I, FGF-2, ON, AP

Antes da formação da sutura, as proteínas Twist, BMP-4 e 7, FGF-9 e MSX1 e 2 estão envolvidas na sinalização epitélio-mesenquimal no mesênquima sutural, na dura mater e nas frentes osteogênicas de aproximação. Também estão presentes nestas áreas as proteínas FGFR 1, 2 e 3. A FGFR2 não está presente na sutura e dura, ao contrário de sua grande expressão nas frentes osteogênicas de aproximação. As proteínas TGF- β 1, 2 e 3 estão presentes na dura mater e nas frentes osteogênicas de aproximação, mas ausentes no mesênquima sutural (Opperman, 2000). Rice *et al.* (2000) em estudos realizados *in vivo*, utilizando modelo murino, demonstraram a expressão dos genes *Twist* e *FGFRs*.

A proteína Twist foi intensamente expressa no mesênquima através do primeiro e segundo arcos branquiais, no mesênquima circundante ao olho em desenvolvimento e abaixo ao epitélio. A expressão tornou-se mais restrita, bordejando áreas de mesênquima condensado da calvária. Essas condensações consistem em osteoprogenitores que se diferenciam em osteoblastos funcionantes dos ossos parietal, temporal e frontal. Continuou a ser expresso no mesênquima da calvária, porém não em osteoblastos maduros. No período pós-natal a intensidade decresceu.

Durante o processo de aproximação e sobreposição das frentes osteogênicas, fatores envolvidos na estrutura de formação, como SHH, PTC e ID estão presentes enquanto que o Twist e MSX2 estão regulados negativamente. Após algum tempo, pode-se observar distribuição diferencial dos componentes da matriz extracelular, com CBFA1, BSP-I, BSP-II, Colágeno tipo I, ON e AP encontrados no osso e Colágeno tipo I e tipo III expressos nas frentes osteogênicas, junto com FGFR1 a 3 e TGF- β 1, 2 e 3. A matriz da sutura mostra principalmente expressão do colágeno tipo III e FGF-9, MSX1 e início da expressão do FGFR1.

Os fatores que regulam positivamente a matriz da sutura são o colágeno tipo I, TGF- β 1 e β 2, FGFR1, FGFR2 e BSP-I, enquanto CBFA1, FGF-2 e IGF-1 tornam-se expressos na frente osteogênicas. Os fatores MSX1, ID, SHH, PTH e

FGF-9 estão regulados negativamente (Opperman, 2000).

Rice et al. (2000) e Opperman (2000) propuseram que as FGF inibem o Twist, que tem função de regular negativamente o FGFR, modulando sua atividade. Com as mutações no gene *Twist*, ocorreria aumento de expressão dos FGFR, levando à maturação precoce das células mesenquimais em osteoblastos maduros, com conseqüente fusão das suturas.

As craniossinostoses associadas a mutações nestes fatores podem ocorrer por falta de expressão de um dos alelos (haploinsuficiência) ou pelo excesso de expressão (superexpressão).

A figura 2 mostra a representação esquemática de associações conhecidas entre fatores ligados a craniossinostoses.

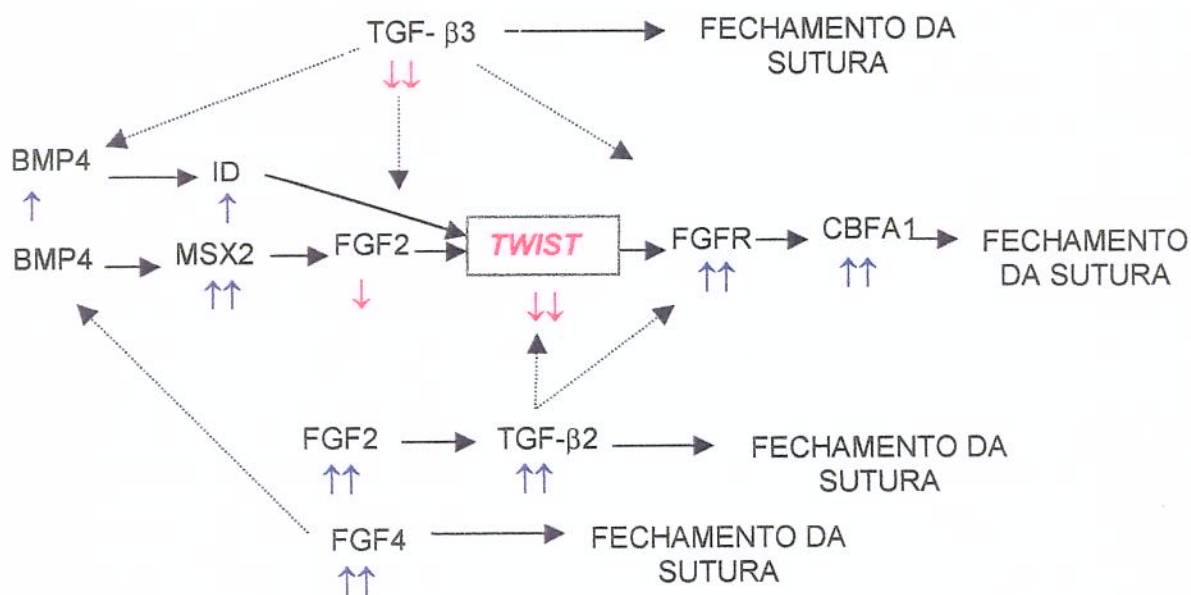


Figura 2 Representação esquemática de associações conhecidas (setas contínuas), e pouco conhecidas (setas descontínuas) entre fatores ligados a craniossinostoses. O número de setas curtas mostram o grau de regulação positiva (↑) ou regulação negativa (↓) de cada fator resultando em craniossinostose (Opperman, 2000).

Os FGFRs formam uma família com quatro receptores tirosina-quinase (FGFR 1 a 4), codificados por quatro genes distintos (Naski & Ornitz, 1998).

Estas proteínas consistem de um domínio extramembranoso que se acopla ao ligante, um domínio transmembranoso e um domínio intracelular tirosina-quinase. A região extracelular contém três domínios imunoglobulina-like (Ig-like), um domínio de acoplamento à heparina e uma sequência de sete aminoácidos ácidos. As regiões implicadas no acoplamento ao ligante são o domínio Ig-like II, a região *interloop* entre os domínios II e III e a porção N-terminal da Ig-like III.

A sequência C-terminal da Ig-like III parece ser importante para a especificidade ao seu ligante, uma proteoglicana denominada sulfato heparan ou heparina. Não há interação direta da sequência C-terminal da Ig-like III com a molécula de FGF (Muenke, 1995; Naski & Ornitz, 1998). A figura 3 mostra a estrutura primária do FGFR.

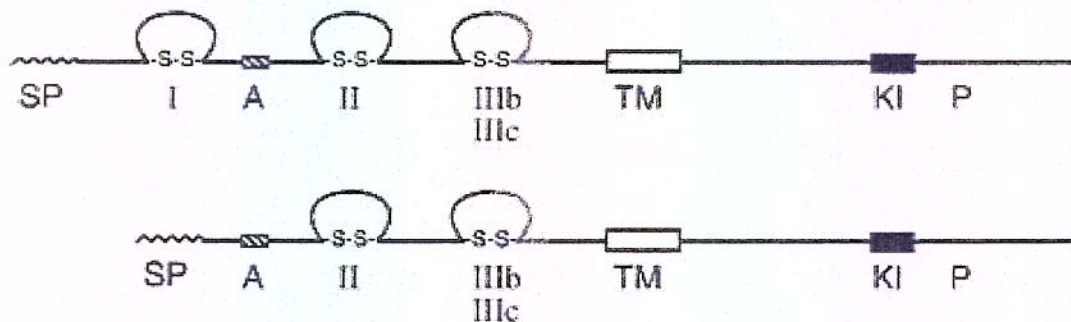


Figura 3 Acima, FGFR completo com três domínios Ig-like. Abaixo, forma curta do FGFR com dois domínios Ig-like. SP, peptídeo sinalizador; A, região ácida; I, II, III, domínios Ig-like; TM, domínio transmembranoso; KI, domínio tirosina-quinase; P, região putativa de alta fosforilação; s-s, ponte de sulfeto (Naski & Ornitz, 1998).

Esses domínios de ligação apresentam variantes por "splicing" alternativo, de particular interesse por possuírem diferentes especificidades de ligação, além de expressão temporo-espacial única, sugerindo funções específicas em cada fase da maturação.

Em estudos conduzidos por Rice *et al.* (2000), a FGFR1b mostrou expressão fraca quando comparada a outras FGFRs. Seus transcritos não são vistos nem nos ossos da calvária nem nas suturas.

A FGFR1c foi detectada nos ossos da calvária, mais notavelmente nas frentes osteogênicas, sítios de grande condensação e diferenciação de osteoblastos. É também expressa em muitas cartilagens da cabeça em desenvolvimento. A FGFR2b foi expressa nas frentes osteogênicas dos ossos parietais, no epitélio em desenvolvimento e na pele, incluindo os folículos capilares. A FGFR2c foi encontrada em regiões similares ao FGFR2b, mas geralmente com intensidade mais forte. A FGFR3b foi fracamente e FGFR3c fortemente expressas em muitas cartilagens da cabeça. A maioria dessas cartilagens não contribui para os ossos da calvária, a qual se forma diretamente do mesênquima. A FGFR3c também foi detectada com baixa intensidade no perióstio da cabeça e frente osteogênica frontal. A FGFR4 foi intensamente detectada no desenvolvimento muscular, porém estão ausentes nos ossos da calvária ou mesênquima.

Cada receptor mostra alta afinidade com um subtipo de FGF. Até o momento foram identificadas nove proteínas estruturalmente relacionadas à família de Fatores de Crescimento de Fibroblasto (FGF) de mamíferos, denominadas FGF1 a FGF9 (Muenke, 1995).

Essas proteínas regulam a proliferação, diferenciação, migração celular, angiogênese, cicatrização, desenvolvimento embrionário e estão implicados na transformação maligna de alguns tecidos.

A FGF liga-se a glicosaminoglicanas e a heparina, que estão localizadas na superfície celular e no interior da matriz extracelular, servindo como sítios de ligação para as FGF. A heparina liga-se diretamente ao FGFs e FGFRs, modulando a ativação do FGFR (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994; Naski *et al.*, 1998).

A figura 4 mostra o modelo de dimerização (Spivak-Kroizman *et al.*, 1994).

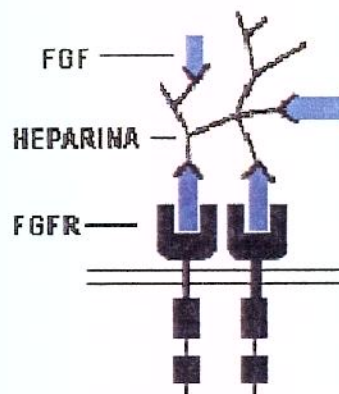


Figura 4 Modelo de dimerização induzida pela heparina e ativação do FGFR.

A ligação de duas FGF aos seus receptores causa sua dimerização, e ativação de seus sítios tirosina-quinase intracelulares. A fosforilação destes receptores inicia ao menos dois tipos de sinais (figura 5). O primeiro através da proteína G-Ras, com sinalização para síntese de novo mRNA, o segundo sinal é mediado pela fosfolipase C, que modifica a condição iônica do citoplasma (Park *et al.*, 1995).

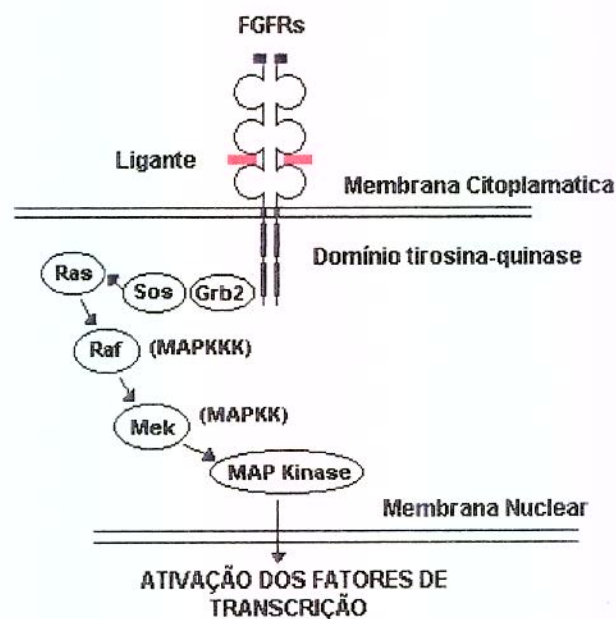


Figura 5 Vias de transdução do sinal, ativadas pela ligação de duas FGFs aos seus receptores.

1.5 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS MEMBROS

Os ossos dos membros são formados a partir de um precursor de cartilagem que provém do mesoderma condensado. Essas condensações representam o estágio mais precoce da formação dos membros e são considerados os precursores dos ossos maduros dos membros (Moore, 2000).

Após a condensação, as células mesodérmicas do interior de cada condensação diferenciam-se em condrócitos. Essa diferenciação ocorre em sincronia com o crescimento do membro. A regulação temporo-espacial da diferenciação do mesênquima em condrócitos é um passo crucial na formação óssea endocrondral, que desenvolve e provê uma matriz para a ossificação subsequente (Weston *et al.*, 2000).

Os dígitos dos membros são resultado de um processo complexo, em que sinais de morte e sobrevivência celulares são mediados por diferentes fatores de crescimento.

As BMPs constituem uma grande família de fatores de crescimento pertencentes à superfamília TGF- β .

A descoberta destas proteínas foi feita a partir da propriedade de extratos purificados de ossos que promovem a formação de cartilagem e ossos sob a pele ou no interior de músculos de camundongos adultos (Macias *et al.*, 1997).

Como outros membros desta família, interagem com a superfície celular através de receptores com a transdução do sinal através de domínios intracelulares serina-treonina. Muitos membros da família BMP atuam no desenvolvimento dos membros.

Assim, a BMP-2, BMP-4 e BMP-7 são expressas no mesoderma indiferenciado dos membros, ectoderma apical e mesênquima interdigital. Entre as funções atribuídas a essas BMPs estão o controle da proliferação celular, a regulação do crescimento e regressão de AER, diferenciação condrogênica, controle da formação dos músculos, indução de apoptose e, possivelmente, regulação do eixo anteroposterior do membro primitivo (Macias *et al.*, 1997, Merino *et al.*, 1999).

Estudando modelos animais (aves), observou-se que a região de desenvolvimento dos dígitos é controlada pela região de polarização, uma pequena área que contém células mesenquimais, na margem posterior do broto do membro. Nestes modelos, foi proposto que uma proteína morfogênica produzida neste local seria responsável pelo início e expressão sustentada das BMPs. A proteína candidata a esta função é a SHH, que determina a região do membro competente para formação dos dígitos, estabelecendo a inicialização de células da região, determinando também o controle do seu número e identidade de cada um dos dígitos, através da modulação das BMPs. Assim, Drossopoulou *et al.* (2000) propuseram que as BMPs atuam como morfogênicos polarizando e progressivamente difundindo-se para o mesênquima adjacente, estabelecendo um gradiente de concentração, de tal forma que as células mais próximas formarão nas aves os dígitos anteriores e as mais distais os dígitos posteriores.

O diagrama esquemático da figura 6 mostra a interrelação entre o SHH e as BMPs na formação dos dígitos em aves.

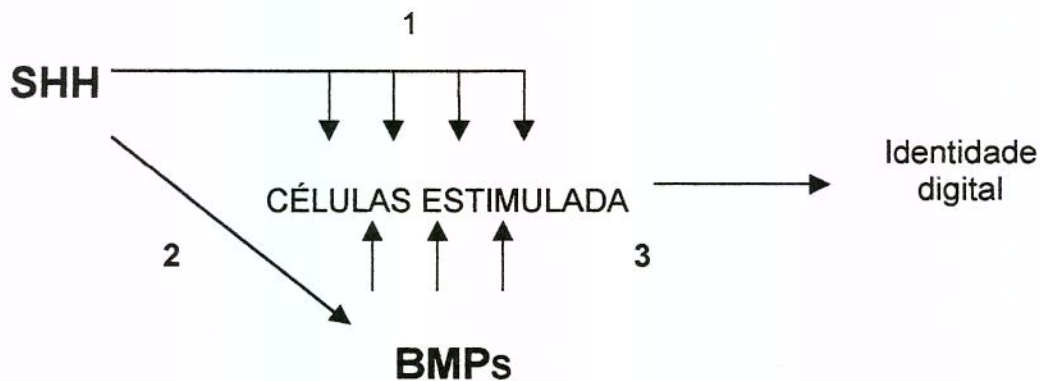


Figura 6 Diagrama esquemático ilustrando o modelo proposto do desenvolvimento digital em aves. Ocorre sinalização sequencial SHH e BMP. A função da SHH na fase de promoção (1) é definir a região do broto competente para formar dígitos. Durante a fase de Promoção (2) SHH induz e mantém a expressão de BMP-2, que atua sobre um conjunto de células inicializadas com o objetivo de especificar uma estrutura digital (3). Baseado em Drossopoulou *et al.*, 2000.

Gañan *et al.* (2001), observaram que a BMP-4 induz à morte por apoptose no mesodema indiferenciado dos membros e ocorre particularmente na região interdigital, onde há co-expressão entre genes BMP e MSX, mas somente em áreas com baixa expressão de FGF, que aparentemente protege as outras áreas da apoptose.

A sinalização dos FGFs nos membros em crescimento são mediadas pelos FGFRs com alta afinidade. O significado desta sinalização é acentuado pelos achados de desordens esqueléticas humanas com anormalidades digitais resultarem de mutações nos FGFRs.

Estas alterações podem ser resultado de mutações do receptor, que resultam no aumento da sua afinidade ao FGF, levando à sua superativação. Estes eventos causam migração anormal das células embrionárias mesenquimais, com formação de condensações mesenquimais aberrantes e levando ao desenvolvimento de dedos anormais (Naski *et al.*, 2000).

Assim, a interação entre estas diferentes proteínas leva à formação dos dedos a partir do desenvolvimento de áreas específicas e apoptose da região interdigital, “esculpindo” a formação dos dedos.

1.6 GENE *TWIST*

O gene *Twist* foi primeiramente identificado em *Drosophila melanogaster* (Thisse *et al.*, 1988), como um gene envolvido precocemente na formação do mesoderma. Estudos neste modelo, realizados por Shishido *et al.* (1993), indicaram que a proteína Twist afetaria a transcrição dos FGFRs. Wolf *et al.* (1991) demonstraram que o gene *Twist* está envolvido na morfogênese cranial do tubo neural em camundongos. Bougeois *et al.* (1996) notaram que este gene codifica uma proteína contendo um domínio básico hélice-alça-hélice (b-HLH) partilhada por muitas proteínas de ligação ao DNA e muito provavelmente funciona como fator de transcrição. Estes autores observaram que embriões murinos homozigotos *Twist-null* exibiam falha no fechamento do tubo neural, enquanto os heterozigotos resultam em fenótipos mais brandos consistentes com aquelas encontradas na Síndrome de Saethre-Chotzen.

Em humanos, o primeiro *locus* para SSC foi sugerido por meio de estudo de polimorfismos de fragmento de restrição (Brueton *et al.*, 1992), seguido de polimorfismo com microssatélites (van Herwerden *et al.*, 1994). A detecção de translocações cromossômicas envolvendo a região 7p21 e 7p22 (Reid *et al.*, 1993), em famílias portadoras dessa entidade pôde dirigir os estudos para o uso de citogenética com hibridização fluorescente *in situ* (FISH) utilizando os marcadores D7S493, D7S516 (Malcolm *et al.*, 1993); D7S513, D7S516, D7S507, D7S664 (Lewanda *et al.*, 1994) e D7S488, D7S493 (Rose *et al.*, 1994, Ma *et al.*, 1996). Bougeois *et al.* (1996) e Howard *et al.* (1997), mapearam o gene *Twist* humano na região 7p21-p22 por análise de ligação.

Estudos moleculares em pacientes com SSC demonstraram mutações no gene *Twist*, nos domínios hélice I, alça (*loop*) e básico de ligação ao DNA, resultando em substituições de aminoácidos ou terminação prematura da proteína (Howard *et al.*, 1997 e El Ghouzzi *et al.*, 1997).

Krebs *et al.* (1997) descobriram que o ponto de quebra de uma translocação aparentemente balanceada t(6;7)(q16.2;p15.3), associada a uma forma branda de SSC (Tsuji *et al.*, 1995), ocorreu aproximadamente a 5 kb 3' do

locus do *Twist*, acarretando a perda de 518 bp do cromossomo 7. Sequências potencialmente exônicas flanqueando o cromossomo 7 no ponto de translocação, não correspondiam a genes conhecidos nos bancos de dados pesquisados. Eles estabeleceram que o rearranjo à jusante do *Twist* implicou na perda de função de um alelo por efeito posicional causando a síndrome, o que seria compatível com a hipótese do *Twist* ser o gene da SSC.

Rose *et al.* (1997) reportaram que os pontos de quebra em 4 pacientes com SCS não interrompiam a sequência codificante do gene *Twist* e assim, mais provavelmente, estava agindo através de um efeito posicional. Mutações no gene *Twist* foram encontradas em 12 casos de SSC. Quatro destas famílias estavam presentes em estudos de ligação para o locus da SSC. Foram detectados mutações *missense* e *nonsense* e 3 casos de duplicação de 21 pb; três famílias, entretanto, foram identificadas como portadoras de uma mutação P250R no gene *FGRF3* (Golla *et al.*, 1997). Além de translocações balanceadas (Wilkie *et al.*, 1995; Krebs *et al.*, 1997), outros estudos detectaram, no gene *Twist*, microdeleções e ausência de translocações nas regiões codificadoras (Zackai *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1998).

O gene *Twist* contém 2 exons de 772 bp e 645 bp, separados por um único íntron de 538 bp.

O exon 1 é traduzido formando uma proteína com estrutura básica b-HLH. O exon 2 não é traduzido (Howard *et al.*, 1997; Robin, 1999). A figura 7 mostra o esquema representativo do gene *Twist* (Yousfi *et al.*, 2001).

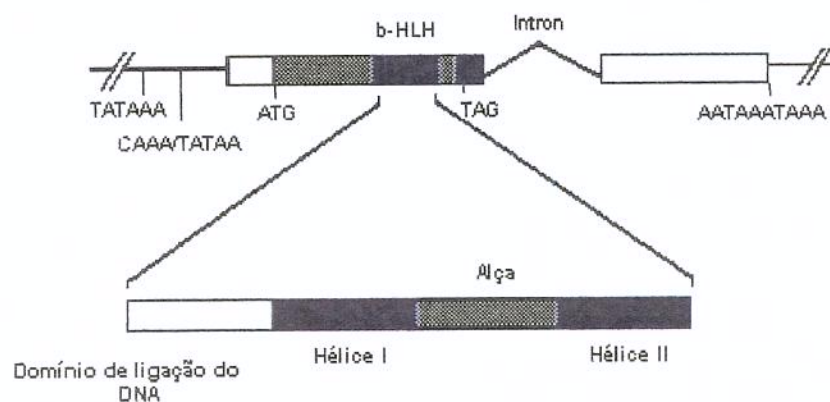


Figura 7 Esquema representativo do gene *Twist*.

As proteínas do tipo Hélice-Alça-Hélice ou *Helix-Loop-Helix* (HLH) (figura 8) compartilham um tipo comum de motivo de sequência: um segmento de 40-50 aminoácidos que contém duas hélices anfipáticas (possuem duas superfícies, uma hidrofílica e uma hidrofóbica), separadas por uma região de ligação (*loop* ou alça) de comprimento variado. Estas proteínas apresentam duas características, a presença de regiões helicoidais que se ligam ao DNA e a capacidade de formarem tanto homodímeros como heterodímeros, por meio de interações entre resíduos hidrofóbicos das faces correspondentes das duas hélices. São denominadas proteínas b-HLH por conterem uma região adjacente ao motivo HLH que é altamente básica, necessária para a ligação no DNA, enquanto as proteínas HLH não básicas impedem a ligação. Portanto, tanto a formação de dímeros quanto o modo de ligação no DNA podem representar importantes pontos de regulação da transcrição (Lewin, 2000). El Ghouzzi *et al.* (1997) demonstraram que a H-Twist forma heterodímeros estáveis com outras b-HLH, entre elas a E12bHLH, uma provável parceira *in vivo* para a atividade transcricional do H-Twist. É provável que o heterodímero Twist-E12 seja um regulador negativo da transcrição em células osteoblásticas em humanos. As histona-acetiltransferases (HATs) têm papel crítico no controle transcricional por atenuar efeitos repressivos da cromatina (Struhl, 1998). Hamamori *et al.* (1999) mostraram que a proteína Twist liga-se diretamente a duas acetiltransferases com domínios HAT independentes, a p300 e a p300/fator CBP-associado (PCAF), regulando diretamente suas atividades HAT. O N terminal do Twist é um domínio primário que interage com ambas as acetiltransferases, e o mesmo domínio são necessários para inibir a transcrição p300 dependente. A proteína do adenovírus E1A mimetiza os efeitos do Twist por inibir a HAT da p300 e PCAF.



Figura 8 Modelo da proteína Twist, mostrando a estrutura básica Helix-Loop-Helix (b-HLH) (SWISS PROTEIN PROJECT, 2000).

Wilkie (1997) revisou os genes e mecanismos envolvidos nas craniossinostoses. Mutações em cinco genes deram nova compreensão da biogênese normal e anormal das suturas cranianas: *MSX2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* e *Twist*. Embora as mutações nos genes *MSX2* e *FGFR* envolvam ganho de função, as mutações do *Twist* envolvem perda de função (haploinsuficiência). Essa hipótese é suportada pela evidência de mutações *nonsense* freqüentes no gene *Twist*, o que não ocorre nos genes *MSX2* e *FGFR*. El Ghouzzi *et al.* (1999) encontraram mutações do *Twist* em 16 de 22 pacientes com SSC não aparentados. Todas essas mutações envolviam o domínio b-HLH da proteína. Os genótipos mutantes incluíram deleções, inserções e mutações *nonsense* e *missense*, truncando ou causando ruptura do motivo b-HLH da proteína. Em dois dos 22 casos estudados, havia a mutação P250R no gene *FGFR3*, apresentando manifestações clínicas brandas da SSC.

A hipótese da SCC também ser causada pela haploinsuficiência resultante de deleções em um alelo, sugere que o gene *Twist* tendo reduzido sua expressão, levaria ao aumento do crescimento celular e síntese de colágeno, bem como da capacidade osteogênica. Contudo, inibiria a expressão do gene da osteocalcina. Isso provê um mecanismo que pode contribuir para a ossificação cranial prematura induzida por deleção do domínio b-HLH do *Twist* na SSC (Yousfi *et al.*, 2001).

Estudos moleculares demonstraram que mutações *nonsense* no gene resultam em proteínas truncadas e instáveis mais rapidamente degradadas, levando à haploinsuficiência; as mutações *missense* envolvendo o domínio helicoidal, levam à completa perda da heterodimerização do H-*Twist* com a proteína E12 b-HLH, alterando dramaticamente a capacidade da proteína *Twist* localizar o núcleo de células COS-transfectadas; as inserções e mutações *missense* envolvendo a região do *loop* alteram a formação de dímeros, mantendo a localização nuclear da proteína. Assim, a perda da função da proteína *Twist* é atribuída a sua degradação e erro da localização subcelular (El Ghouzzi *et al.*, 2000; Gripp *et al.*, 2000).

No Quadro 4 estão as mutações encontradas no exon 1 do gene *Twist* até o momento.

Quadro 4 Mutações encontradas no exon 1 do gene *Twist*.

Substituição nucleotídica (missense/nonsense)				
Códon	Nucleotídeo	Amino-ácido	Fenótipo	Referência
28	gCAG-TAG	Gln-Term	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
61	cGGA-TGA	Gly-Term	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
65	cGAG-TAG	Glu-Term	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
78	gTCT-CCT	Ser-Pro	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
103	TACg-TAA	Tyr-Term	SSC	El Ghouzzi (1997) Nat Genet 15, 42
103	TACg-TAG	Tyr-Term	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
104	cGAG-TAG	Glu-Term	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
116	gCGG-TGG	Arg-Trp	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
118	CGC-CAC	Arg-His	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
119	CAG-CCG	Gln-Pro	SSC	Howard (1997) Nat Genet 15, 36
120	CGC-CCC	Arg-Pro	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
122	cCAG-TAG	Gln-Term	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
123	TCG-TAG	Ser-Term	SSC	El Ghouzzi (1997) Nat Genet 15, 42
123	TCG-TGG	Ser-Trp	SSC	Johnson (1998) Am J Hum Genet 63, 1282
126	cGAG-TAG	Glu-Term	SSC	El Ghouzzi (1997) Nat Genet 15, 42
127	GCG-GTG	Ala-Val	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
131	CTG-CCG	Leu-Pro	SSC	El Ghouzzi (1997) Nat Genet 15, 42
132	CGG-CCG	Arg-Pro	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
134	ATCa-ATG	Ile-Met	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
136	CCC-CTC	Pro-Leu	SSC	Johnson (1998) Am J Hum Genet 63, 1282
139	gCCC-TCC	Pro-Ser	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
141	GAC-GGC	Asp-Gly	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
141	gGAC-TAC	Asp-Tyr	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
144	gAGC-CGC	Ser-Arg	SSC	El Ghouzzi (1999) Eur J Hum Genet 7, 27
145	AAGa-AAC	Lys-Asn	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
145	cAAG-GAG	Lys-Glu	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
148	gACC-GCC	Thr-Ala	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
148	ACC-AAC	Thr-Asn	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
149	cCTC-TTC	Leu-Phe	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
152	GCG-GTG	Ala-Val	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
154	cAGG-GGG	Arg-Gly	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369

159	cCTC-TTC	Leu-Phe	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
160	TACc-TAG	Tyr-Term	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
161	cCAG-TAG	Gln-Term	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
164	cCAG-TAG	Gln-Term	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
181	cGAG-TAG	Glu-Term	S.Baller-Gerold	Gripp (1999) Am J Med Genet 82, 170

Inserções pequenas

Nucleotídeo	Códon	Inserção	Fenótipo	Referência
272	91	CGGCGGCGGC	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
308	103	A	SSC	Howard (1997) Nat Genet 15, 36
384	128	C	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
460	154	A	S.Robinow-Sorauf	Kunz (1999) J Med Genet 36, 650

Deleções pequenas

Códon	Deleção	Fenótipo	Referência
87	CGGCGGC^GCGgGCGGCGGCGG	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150
117	GTGCGG^GAGCgccagcgcACCCAGT CGC	SSC	El Ghouzzi (1999) Eur J Hum Genet 7,27
117	CGTGCGG^GAGcgcCAGCGCACCC	SSC	Paznekas (1998) Am J Hum Genet 62, 1370
154	CGGCC^AGGTAcacgACTTCCTCTA	SSC	El Ghouzzi (1999) Eur J Hum Genet 7,27
162	CTACCAG^GTCcTCCAGAGCGA	SSC	El Ghouzzi (1999) Eur J Hum Genet 7,27

Deleções grandes

Descrição	Fenótipo	Referência
23 bp nt. 433 cd. 145	SSC	Howard (1997) Nat Genet 15, 36
Incl. entre gene	SSC	Johnson (1998) Am J Hum Genet 63, 1282

Inserções e duplicações grandes

Inserção de 21 bp nt 276	SSC	Gripp (2000) Hum Mutat 15, 150.
Duplicação de 21 bp nt. 405	SSC	Howard (1997) Nat Genet 15, 36

Duplicação de 21 bp nt. 416	SSC	Howard (1997) Nat Genet 15, 36
Duplicação de 21 bp nt. 418	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
Duplicação de 21 bp nt. 419	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
Duplicação de 21 bp nt. 421	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
Inserção de 25 bp nt 423	SSC	El Ghouzzi (1999) Eur J Hum Genet 7, 27
Rearranjos complexos		
Del 2924 bp, ins GT nt 10962	SSC	Johnson (1998) Am J Hum Genet 63, 1282
Del A nt 230, T-C nt 232	SSC	Rose (1997) Hum Mol Genet 6, 1369
Translocação t(2;7)(p23;p22)	SSC	Lewanda (1994) Am J Hum Genet 55, 1195
Translocação t(6;7) (q16.2;p15.3)	SSC	Krebs (1997) Hum Mol Genet 6, 1079
Translocação t(7;8)(p21;q13)	SSC	Johnson (1998) Am J Hum Genet 63, 1282

Referência: Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/135694.html>).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

1. Avaliar clínica e radiologicamente indivíduos com sinais sugestivos de Síndrome de Saethre-Chotzen.
2. Pesquisar a presença de mutações no exon 1 do gene *Twist*, por meio de seqüenciamento direto, em indivíduos com sinais sugestivos de Síndrome de Saethre-Chotzen.

3. CASUÍSTICA

A casuística foi constituída de quatro famílias com diagnóstico prévio da SSC, somando, ao todo, 31 indivíduos examinados, 16 do sexo feminino e 15 do sexo masculino, com idades variando de 6 meses a 71 anos por ocasião da primeiro exame clínico-dismofológico.

A Família 1 foi atendida no período de setembro de 1995 a outubro de 1995 no Ambulatório de Genética da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (FMTM), Uberaba, Minas Gerais e as Famílias 2, 3 e 4 foram atendidas no Serviço de Genética Clínica (SGC) do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas /UNICAMP, Campinas, São Paulo, no período de abril de 1999 a junho de 1999 e janeiro de 2001.

A SSC é a mais branda das formas de acrocefalossindactilia e apresenta intensa variabilidade clínica. Tal fato, por vezes, torna difícil a identificação de um indivíduo afetado quando não apresenta um quadro dismórfico evidente. Assim, dentro de uma mesma família, existiram situações em que apenas discretos dismorfismos, que podem fazer parte da variação normal, foram valorizados pelo contexto.

3. *METODOLOGIA*

O presente projeto foi elaborado de acordo com as orientações da Declaração de Helsinki (1989), International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects (CIOMS/WHO, 1993) e Resolução Normativa do Conselho Nacional Saúde (CNS) 196/96, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Os indivíduos envolvidos e/ou seus responsáveis, receberam esclarecimentos sobre o projeto e, estando de acordo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de participação nesta pesquisa (Anexo 1). Todos foram identificados por números, para manutenção da privacidade.

Após a assinatura deste termo, os pacientes e seus familiares foram examinados clinicamente e fotografados, com ênfase aos achados dismorfológicos desta entidade clínica com preenchimento do formulário específico (Anexos 2).

Os heredogramas foram elaborados de acordo com as recomendações propostas por Bennet *et al.* (1995).

A documentação fotográfica foi realizada pelo Serviço de Fotografia da FMTM e pelo Serviço de Apoio Didático da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP (Anexo 3).

Os dados antropométricos foram comparados em curvas padrão (Anexo 4), a saber:

- Peso e estatura: TANNER & WHITEHOUSE, 1976.
- Perímetro cefálico (PC): NELLHAUS, 1968.
- Distância intercantal externa dos olhos (DICE), distância intercantal interna dos olhos (DICI), distância interpupilar (DIP): FEINGOLD & BOSSERT, 1974.
- Comprimento da mão (palma), dedo médio, relação entre o dedo médio e comprimento total da mão: FEINGOLD & BOSSERT, 1974.
- Comprimento da orelha: FEINGOLD & BOSSERT, 1974
- Comprimento do pé: BLAIS, 1956.

O índice cefálico (IC) foi determinado pela relação: Distância biauricular (DBA) ou biparietal (DBP) x 100 / Distância ântero-posterior (DAP) (Hall *et al.*, 1989).

O contato com as famílias foi realizado nos ambulatórios de genética do SGC/UNICAMP e da FMTM. O cariótipo do probando da família 1 foi realizado no Laboratório de Citogenética da FMTM e os cariótipos dos probandos das famílias 2, 3 e 4 foram realizados no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica/UNICAMP.

O estudo molecular foi executado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) - UNICAMP. Tomografia computadorizada de crânio (para pesquisa de anomalias de sistema nervoso central), inventário radiológico (em busca de anomalias esqueléticas) e ultra-sonografia abdominal (para determinação de anomalias renais), foram realizados em locais de preferência das famílias, que portavam solicitação detalhada para tal. Contudo, muitos indivíduos adultos examinados e que apresentavam formas leves, embora orientados, preferiram não realizá-los, respeitando-se sua decisão.

ESTUDO LABORATORIAL

- **Obtenção das amostras**

1. **CARIÓTIPO** - Foram coletados dos probandos de cada família, 5 ml de sangue periférico em seringa descartável com 0,4 ml de heparina e encaminhado ao Laboratório de Citogenética, para a cultura de linfócitos e realização do cariótipo com bandamento G (resolução de aproximadamente 500 bandas), para análise conforme a rotina do laboratório.
2. **ESTUDO MOLECULAR** - Utilizou-se amostras de DNA genômico extraídas a partir de sangue total dos probandos e de seus familiares. Foram coletados de 10 a 20 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico 2H₂O) a 10 % pH 8,0 como anticoagulante.

- **Extração de DNA genômico a partir de sangue total**

Adicionou-se Solução A ao sangue coletado até o volume de 50 ml e manteve-se o tubo a 4°C por 30 minutos, para lise das hemácias. Centrifugou-se a 2.000 rpm, 4°C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado ('pellet') em 20 ml de Solução A. Após a repetição da operação o 'pellet' foi ressuspenso em 1 ml de Solução B diluída para 1x. Acrescentaram-se 250 µl de Solução C, contendo Proteinase K (Araujo *et al.*, 1996).

Solução A	Solução B (estoque 2x):	Solução C (recém-preparada):
	[] final	[] final
MgCl ₂5 mM	Na ₂ EDTA.....20 mM	SoluçãoB.....0,5x
Sacarose..... .0,32 M	NaCl.....20 mM	SDS.....5 %
Tris-HCl pH 8,0 ...10 mM	Tris-HCl,pH8,0....20 mM	Proteinase K....1mg/ml
Triton-X 100.....1 %		

Incubou-se a mistura sob leve agitação a 37°C, durante um período de aproximadamente 18 horas, ou a 65°C, por 2 horas. Para a extração do DNA, adicionou-se 1,25 ml de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Applied Biosystems). Homogeneizou-se a mistura por inversão cuidadosa do tubo durante 5 minutos, após o qual centrifugou-se a 2.500 rpm por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação e recuperação da fase aquosa (superior). À fase aquosa, acrescentou-se novamente igual volume de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 seguido de centrifugação, repetindo-se o procedimento duas vezes com solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1;v:v:v) e por último com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v). Para a precipitação do DNA, acrescentou-se 1/10 do volume obtido de acetato de sódio 3 M e 2,5x o volume de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi recuperado com o auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70% antes de ser ressuspenso em volume que variou de 200-500 µl de TE 1x. A concentração de DNA obtida foi calculada através de leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro, sendo a integridade do DNA testada em eletroforese com gel de agarose 0,8%.

- **Amplificação do DNA genômico por Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (Polymerase Chain Reaction) e Inicializadores (*Primers*)**

Seqüências de oligonucleotídeos foram utilizadas como inicializadores (*Primers*) da PCR, desenhados por Howard *et al.* (1997) a partir da seqüência normal do gene *Twist* (El Ghouzzi *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1997). A síntese dos oligonucleotídeos foram realizados pela Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA.

O produto de PCR teve três fragmentos, **Twist 1** de 375 pb (1 → 375), **Twist 2** de 512 pb (225→736), e **Twist 4** de 223 pb (165 →375).

Twist 1*sense:* GAG GCG CCC CGC TCT TCT CC*antisense:* AGC TCC TCG TAA GAC TGC GGA C**Twist 2***sense:* CAA GAA GTC TGC GGG CTG TG*antisense:* AAT CGA GGT GGA CTG GGA ACC G**Twist 4***sense:* CGC TGC GGA AGA TCA TCC CC*antisense:* TGC TAG TGG GAC CGC GAC AT

A amplificação dos fragmentos de DNA foi obtida utilizando um aparato de ciclo térmico para o processamento da PCR (Perkin-Elmer, Gene Amp PCR System 2400, Norwalk, CT), as condições para a amplificação dos fragmentos estão no Quadro 5. Os componentes e volumes estão descritos no Quadro 6.

Quadro 5 Condições para a amplificação dos fragmentos Twist 1, 2 e 4.

Twist 1	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
Temperatura	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C
Tempo	12min	40s	40s	90s	10min
Ciclo		40x			
Twist 2 e 4					
Temperatura	94°C	94°C	65°C	72°C	72°C
Tempo	5min	40s	40s	40s	3min
Ciclo		35x			

Quadro 6 Componentes e volumes para a PCR.

Componentes	Volume
Tampão	5 µl
dNTP (2MM)	5 µl
Primer sense (25µM)	1 µl
Primer antisense (25µM)	1 µl
Taq	0,3 µl
DNA	1 µl
H2O mQ	31,7 µl

- **Eletroforese em Gel de Agarose**

A verificação da qualidade do DNA genômico extraído e amplificação de produto de PCR foi feita a partir da realização de eletroforese em gel de agarose 0,8% (DNA genômico) ou 1,5% (produto de PCR) em TBE 1x, preparado segundo protocolo descrito em Sambrook *et al.* (1989). A solução estoque de tampão utilizado na corrida eletroforética e preparação do gel está no Quadro 7.

Quadro 7 Solução de estoque TBE 10x.

TBE (Tris-Borato) 10x	
ácido bórico	55,0 g
trizma-base	108 g
EDTA 0,2 M, pH 8,0	100 ml
H ₂ O	q.s.p. 1.000 ml

Aplicou-se a amostra no gel juntamente com 1/10 do volume de tampão de corrida (0,25% de Azul de Bromofenol; 50% glicose). As condições de corrida variaram de 60 a 100 V. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA 'ladder' de 100 pb (Gibco BRL), utilizando-se 5 µl de solução estoque de 40 ng/µl (Quadro 8).

Corou-se o gel em solução diluída de Brometo de Etídeo (0,5 µg/ml) durante 10 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultra-violeta (UV transluminator, Fotodyne) e fotografado com câmera Polaroid.

Quadro 8 Componentes e condições para verificação da correta amplificação dos fragmentos da PCR em gel de agarose 1,5 %.

		Volume	[]
Gel de agarose			1,5%
Eletroforese	60 a 100 volts e 80µA		
Ladder	100pb	2µl	
Produto de PCR		5µl	
Azul de Bromofenol		2µl	

- Análise dos Fragmentos de DNA por Sequenciamento Direto**

Para o seqüenciamento direto do produto de PCR procedeu-se um pré-tratamento do mesmo com as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP – ‘Shrimp Alkaline Phosphatase’) no intuito de remover o DNA fita simples residual e os dNTPs remanescentes (PCR product pre-sequencing kit – Amersham/Pharmacia) (Quadros 9 e 10). Os componentes e volumes para o seqüenciamento do produto de PCR com *primer sense* ou *antisense* estão no Quadro 11.

Quadro 9 Componentes e volumes para pré-tratamento do produto de PCR.

Componentes	Volume
Produto de PCR (~20 ng/µl)	5 µl
Exonuclease I (10 U/µl)	1 µl
SAP (2 U/µl)	1 µl
Volume final	7 µl

Quadro 10 Temperatura e tempo para pré-tratamento do produto de PCR.

Temperatura	37°C	80°C
Tempo	15 minutos	15 minutos
Ciclo	1x	

Quadro 11 Componentes e volumes para o seqüenciamento do produto de PCR com *primer sense* ou *antisense*.

	Tampão de reação 10x	PCR Pré-tratado	<i>primer sense</i> ou <i>antisense</i> (20 pmoles/μl)	Thermo Sequenase polimerase (4 U/μl)	H₂O qsp
Volume	2 μ l	7 μ l	1 μ l	2 μ l	20 μ l
[] final	1 x	50-500 ng	2 pmoles	8 unidades	

Transferiu-se 4,5 μ l da reação para quatro tubos, cada um contendo 0,06 μ M de um dos ddNTP (α -³³P) e 6 μ M de mistura de dNTPs, num volume final de 7 μ l. Submeteu-se a reação à seguinte ciclagem (Quadro 12).

Quadro 12 Ciclagem da reação do seqüenciamento.

Temperatura	95°C	T_m do <i>primer</i>	72°C
Tempo	30 s	30 s	60 s
Ciclo	40x		

Ao final da reação acrescentou-se 4 μ l de Solução de Terminação contendo 95% de formamida, 0,05% de Azul de bromofenol e 20 mM de EDTA.

- **Gel de Seqüenciamento**

Separou-se a reação de seqüenciamento em Gel Desnaturante de Poliacrilamida 7% contendo Uréia 7 M, com variação de espessura de 0,1- 0,4 mm (Quadro 13).

Quadro 13 Componentes e volume para preparação do gel desnaturante de poliacrilamida 7%.

Reação	Volume	[] final
Acrilamida: Bisacrilamida 40%	17,5 ml	7%
TBE 10x	10 ml	1x
Uréia	106 g	7 M
Água q.s.p	100 ml	

Os parâmetros de corrida foram 2.000 V, 50 mA a 50 W, com duração de 3 horas (corridas curtas) e 6 horas (corridas longas) dependendo do tamanho e da região do fragmento em estudo. Posteriormente foi exposto a filme de raio-X sensíveis à emissão de radiação do nucleotídeo marcado (por exemplo, Kodak X-Omat AR), por tempo variável. A revelação do filme foi feita de acordo com as indicações do fabricante.

5. RESULTADOS

ESTUDO CLÍNICO

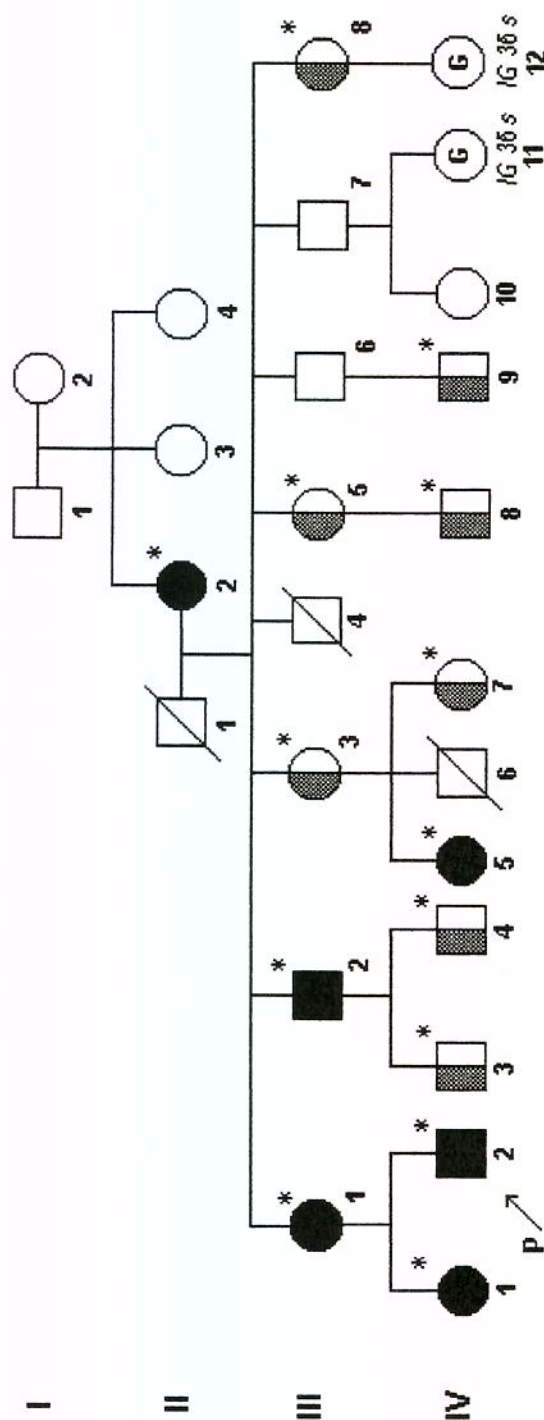
FAMILIA 1

Propósito: Indivíduo IV-2

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba -MG, 12 anos, DN: 15/09/1983.

Exame físico: braquicefalia, occipital plano, assimetria facial, hipoplasia malar, implantação baixa do cabelo na fronte, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, ponte nasal proeminente, desvio do septo nasal acentuação do ramo da hélice, implantação baixa das orelhas, palato ogival, clinodactilia bilateral do 5º dedo, sindactilia cutânea parcial dos 2º e 3º dedos, háluces alargados. Deficiência Mental moderada.

Heredograma



Legenda. P → Propósito; * Indivíduo examinado; Óbito; Gestação;

Indivíduo com sinais sugestivos de SSC; Indivíduo com sinais brandos (braquicefalia, assimetria facial, sindactilia cutanea parcial, clinodactilia)

Figura 9 Heredograma da Família 1.

Exame físico dos demais membros da família:

Indivíduo II-2

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba-MG, 58 anos.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial leve, ponta nasal levemente caída, lábios finos, orelhas com acentuação do ramo da hélice, sindactilia cutânea parcial dos 2º e 3º artelhos, háluces levemente alargados.

Indivíduo III-1

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba - MG, 36 anos, DN: 25/12/1959.

Exame físico: braquicefalia, occipital plano, assimetria facial, hipoplasia malar, implantação baixa do cabelo na fronte, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, ponta nasal caída, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, implantação baixa das orelhas, palato ogival, clinodactilia bilateral do 5º dedo, polegares alargados, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2º e 3º dedos, sindactilia cutânea total bilateral dos 2º e 3º artelhos, háluces alargados.

Indivíduo III-2

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba -MG, 34 anos.

Exame físico: braquicefalia, occipital plano, hipoplasia malar, ponta nasal caída, asa nasal proeminente, orelha com hélice mais curvada, antihélice plana, clinodactilia bilateral do 5º dedo, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2º e 3º artelhos, háluces levemente alargados.

Indivíduo III-3

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba - MG, 32 anos.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, desvio do septo nasal, implantação baixa e posterior rotação das orelhas, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 3º e 4º artelhos.

Indivíduo III-5

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba - MG, 27 anos.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial leve, ponta nasal caída, implantação baixa e posterior rotação das orelhas, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 3º e 4º artelhos.

Indivíduo III-6

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba -MG, 25 anos.

Exame físico: não realizado.

Indivíduo III-7

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba -MG, 23 anos.

Exame físico: não realizado.

Indivíduo III-8

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba - MG, 21 anos.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, desvio de septo nasal, ponta nasal caída, implantação baixa com posterior rotação das orelhas, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 3º e 4º artelhos.

Indivíduo IV-1

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba - MG, 13 anos, DN: 05/03/1982.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, hipoplasia malar, implantação baixa do cabelo na fronte, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, ponta nasal caída, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, anti-hélice plana, implantação baixa e posterior angulação das orelhas, palato ogival, clinodactilia bilateral do 5º dedo, polegares digitiformes, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2º e 3º artelhos, hálucos alargados.

Indivíduo IV-3

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba-MG, 7 anos.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, retrognatía, ponta nasal caída, desvio de septo nasal, acentuação do ramo da hélice, clinodactilia bilateral do 5º dedo, sindactilia cutânea parcial do 3º e 4º dedo esquerdo, sindactilia cutânea parcial do 3º e 4º artelhos esquerdos.

Indivíduo IV-4

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba -MG, 4 anos.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, acentuação do ramo da hélice, clinodactilia bilateral do 5º dedo, sindactilia cutânea parcial bilateral do 3º e 4º artelhos, hálucos alargados.

Indivíduo IV-5

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba - MG, 12 anos.

Exame físico: braquicefalia, ptose palpebral, assimetria facial, desvio do septo nasal, clinodactilia bilateral do 5º dedo, sindactilia cutânea parcial bilateral do 3º e 4º artelhos. Deficiência mental moderada.

Indivíduo IV-7

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Rio Paranaíba - MG, 7 anos.

Exame físico: braquicefalia, implantação baixa e posterior rotação das orelhas, sindactilia cutânea parcial bilateral do 3º e 4º artelhos, hálucos levemente alargados.

Indivíduo IV-8

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba -MG, 4 anos.

Exame físico: braquicefalia, clinodactilia bilateral do 5º dedo, hálucos levemente alargados.

Indivíduo IV-9

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Rio Paranaíba -MG, 2 anos.

Exame físico: braquicefalia, clinodactilia bilateral do 5º dedo.

Quadro 14. Dados Antropométricos e percentis dos indivíduos afetados da Família 1. **Legenda.** * Propósito.

	II-2	III-1	III-2	III-3	III-5	III-8	IV-1	IV-2*	IV-3	IV-4	IV-5	IV-7	IV-8	IV-9
Estatura (cm)	145 < p3	149,5 < p3	169,5 p10-25	155 p10	154 p3-10	155 p10	151 < p3	133 < p3	130 p97	111 > p97	155,5 p50-75	134 > p97	123 > p97	91 p97
Peso (kg)	55,7 p25-50	58 p50-75	98,2 > p97	55,6 p25-50	51,2 p10-25	50 p10-25	55,2 p75-90	30 p10-25	26,5 p90	19,2 p97	45,7 p75-90	29 p90-97	23 > p97	13 p75
PC (cm)	53 p2-50	51,5 < p2	55,5 p 50	53,4 p2-50	53,7 p2-50	52 < p2	55 p50-98	52 p2-50	50,5 p2-50	52,7 p50-98	53 p50-98	53 p50-98	52,5 p50-98	49 p50
IC	0,93	0,98	0,88	0,93	0,93	0,83	0,93	0,86	0,89	0,89	0,92	0,83	0,93	0,89
DIP (cm)	5,5 p50-75	7,0 > p97	5,5 p25-50	5,0 p25-50	5,5 p25-50	5,5 p50	6,0 p75-97	7,0 > p97	4,6 p3-25	5,5 p50-75	5,5 p50-75	5,0 p25-50	5,5 p50-75	5,0 p75
Orelha Esquerda (cm)	7,0 p75-97	6,7 p75	8,0 > p97	8,0 > p97	5,0 p3	6,0 p25-50	6,5 p75	6,0 p25-50	7,0 > p97	5,2 p50	6,0 p50	6,5 p50-75	5,0 p25	5,0 p50
Dedo médio/ Mão total	p3-25	> p97	p75	p97	> p97	> p97	> p97	> p97	> p97	> p97	> p97	> p97	p25	p97
Pé Esquerdo (cm)	20 < p3	19,5 < p3	23 p25	20 < p3	19 < p3	20 < p3	19 < p3	21,5 p3	18 p3-25	15 p3-25	20,5 p3	18 p25	16 p50	14 p50

Quadro 15. Características clínicas da Família 1, (+) presentes ou (-) ausentes, * Propósito.															
	II-2	III-1	III-	III-3	III-5	III-8	IV-1	IV-2*	IV-	IV-4	IV-5	IV-7	IV-8	IV-9	
Braquicefalia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14/14
Sindactilia cutânea parcial dos artelhos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	12/14
Assimetria facial	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	10/14
Clinodactilia do 5º dedo	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	9/14
Implantação baixa das orelhas	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	8/14
Háluces alargados	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	8/14
Acentuação do ramo da hélice	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	6/14
Desvio do septo nasal	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	6/14
Ponta nasal caída	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	6/14
Posterior rotação das orelhas	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	5/14
Hipoplasia malar	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	4/14
Ponte nasal proeminente	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	4/14
Ptose palpebral	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	4/14
Hipertelorismo ocular	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3/14
Implantação baixa do cabelo na fronte	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3/14
Palato ogival	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3/14
Sindactilia cutânea parcial dos dedos	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	3/14
Deficiência Mental	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	2/14
Polegares alargados	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/14
Polegares digitiformes	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1/14
Sindactilia cutânea total	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/14
Estrabismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Epicanto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Plagiocefalia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Prega palmar única bilateral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Braquidactilia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Hipotelorismo ocular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Má oclusão dentária	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Deficiência visual	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Atraso do desenvolvimento motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Convulsão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Criptorquidia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14
Peito escavado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/14

Quadro 16 Resultados dos exames complementares dos indivíduos da Família 1.

	III-1	IV-2
RX de crânio	Craniossinostose bicoronal Sinal da prata batida	Craniossinostose bicoronal Sinal da prata batida
RX da coluna torácica e lombo-sacra	Não realizado	Não realizado
RX de membros	Não realizado	Não realizado
T.C de crânio	Não realizado	Não realizado
U.S abdominal	Não realizado	Não realizado

FAMÍLIA 2

Propósito: Indivíduo IV-5

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 9 anos, DN: 15/03/1990.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, implantação baixa do cabelo na fronte, hipoplasia malar, fronte inclinada para trás, ptose palpebral, hipertelorismo ocular, estrabismo, epicanto bilateral, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, implantação baixa e posterior angulação das orelhas, palato alto e estreito, desvio da úvula à E, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2° e 3° dedos, prega palmar única bilateral, braquidactilia, polegares digitiformes, clinodactilia bilateral do 5° dedo, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2° e 3° artelhos, háluces valgos e alargados, peito escavado.

Heredograma

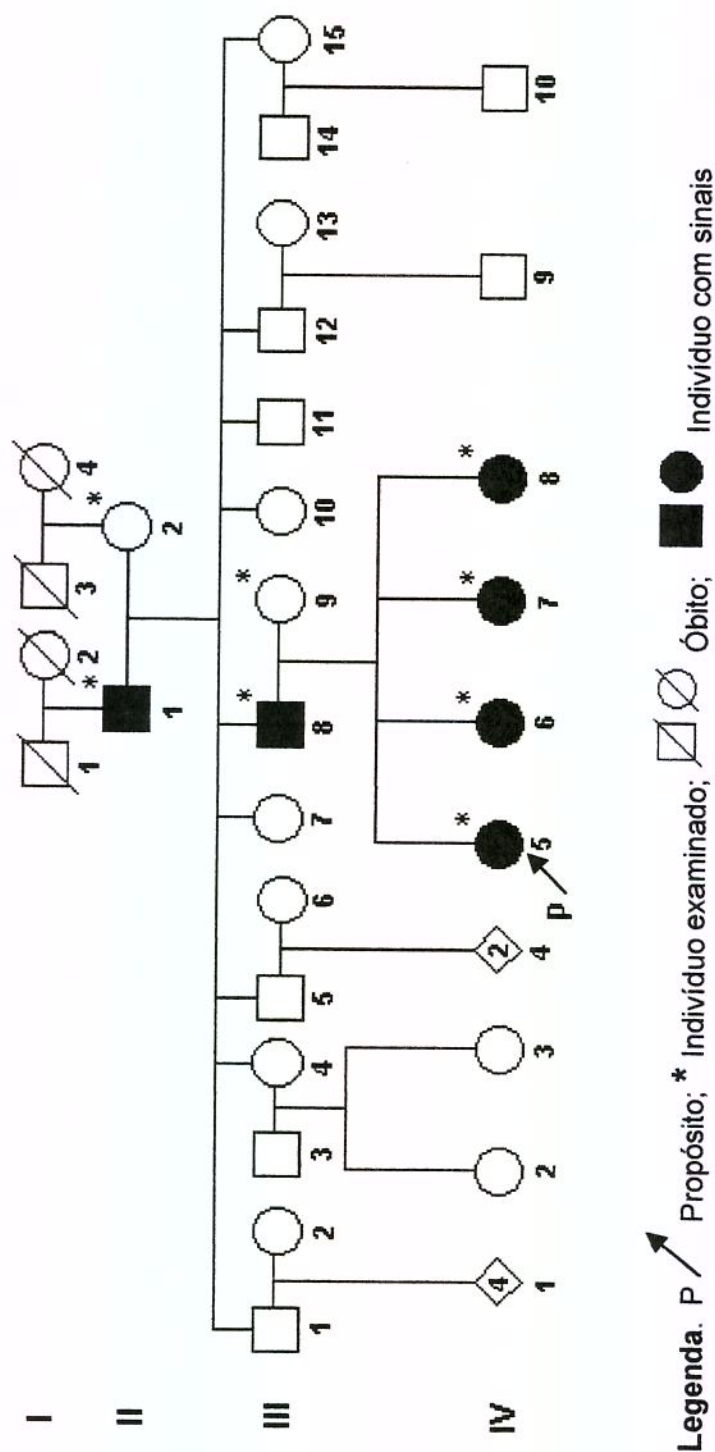


Figura 10 Heredograma da Família 2.

Exame físico dos demais membros da família:

Indivíduo II-1

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 71 anos, DN: 22/12/1928.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, ptose palpebral, hipertelorismo ocular, estrabismo convergente à direita, blefarofimose, ponte nasal proeminente, posterior angulação das orelhas, implantação baixa da orelha direita.

Indivíduo II-2

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 67 anos, DN:10/02/1932.

Exame físico: sem alterações.

Indivíduo III-8

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 39 anos, DN: 28/09/1960.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, implantação baixa do cabelo na fronte, hipoplasia malar, ptose palpebral, hipertelorismo ocular, desvio do septo nasal, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, má oclusão dentária, palato ogival, prega palmar única bilateral, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2º e 3º dedos, braquidactilia, polegares digitiformes, háluces alargados.

Indivíduo III-9

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 24 anos.

Exame físico: sem alterações

Indivíduo IV-6

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 8 anos, DN: 05/08/1991.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, implantação baixa do cabelo na fronte, hipoplasia malar, fronte abaulada, hipertelorismo ocular, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, implantação baixa das orelhas, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2° e 3° dedos, prega palmar única bilateral, braquidactilia, polegares digitiformes, clinodactilia bilateral do 5°dedo , háluces alargados.

Indivíduo IV-7

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 5 anos, DN: 08/03/1994.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, implantação baixa do cabelo na fronte, hipoplasia malar, fronte inclinada para trás, ptose palpebral, hipertelorismo ocular, epicanto bilateral, ponte nasal baixa, lábio superior arqueado (filtro curto), palato alto, acentuação do ramo da hélice, antitrigo escavado, implantação baixa e posterior angulação das orelhas, prega palmar única bilateral, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2°, 3° e 4°dedos, braquidactilia, polegares alargados, clinodactilia do 5° dedo da mão direita, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2° e 3° artelhos, háluces alargados, peito escavado, cintura escapular estreita.

Indivíduo IV-8

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Bueno Brandão-MG, 2 anos 7 meses, DN: 15/11/1996.

Exame físico: braquicefalia, plagiocefalia, assimetria facial, implantação baixa do cabelo na fronte, hipoplasia malar, fronte abaulada, hipertelorismo ocular, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, implantação baixa e posterior angulação das orelhas, prega palmar única bilateral, braquidactilia, polegares digitiformes, clinodactilia bilateral do 5º dedo, zigodactilia bilateral dos artelhos, háluces alargados.

Quadro 17 Dados Antropométricos e percentis dos indivíduos afetados da Família 2.

	II-1	III-8	IV-5*	IV-6	IV-7	IV-8
Estatura (cm)	161,5 < p3	154 < p3	117,5 < p3	124 p25-50	95 < p3	86 p25-50
Peso (kg)	66 p50-75	56 p10-25	20 < p3	26 p50-75	13 < p3	10 p10
PC (cm)	55,5 p50	54 p2	50 p50	54 p50-98	48 > p98	48 > p98
IC	0,87	0,91	1,06	0,94	1,08	0,96
DIP (cm)	7,0 > p97	7,0 > p97	6,5 > p97	6,0 > p97	7,0 > p97	5,7 > p97
Orelha Esquerda (cm)	6,0 p25-50	5,0 p3	5,5 p25	5,0 p3-25	5,0 p3-25	4,0 < p3
Dedo médio/ Mão total	< p3	< p3	< p3	< p3	< p3	< p3
Pé Esquerdo (cm)	23 p25	24 p50	15,5 < p3	18 p3-25	13 < p3	13 p3-25

Legenda. * Propósito.

Quadro 18 Características clínicas da Família 2, (+) presentes ou (-) ausentes,

* Propósito.

	II-1	III-8	IV-5*	IV-6	IV-7	IV-8	
Assimetria facial	+	+	+	+	+	+	6/6
Braquicefalia	+	+	+	+	+	+	6/6
Braquidactilia	+	+	+	+	+	+	6/6
Hipertelorismo ocular	+	+	+	+	+	+	6/6
Acentuação do ramo da hélice	-	+	+	+	+	+	5/6
Hipoplasia malar	-	+	+	+	+	+	5/6
Implantação baixa do cabelo na fronte	-	+	+	+	+	+	5/6
Palato ogival	+	+	+	+	+	-	5/6
Ponte nasal proeminente	+	+	+	+	-	+	5/6
Prega palmar única bilateral	-	+	+	+	+	+	5/6
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	+	+	+	+	4/6
Háluces alargados	-	+	+	+	-	+	4/6
Implantação baixa das orelhas	+	-	+	-	+	+	4/6
Polegares digitiformes	-	+	+	+	-	+	4/6
Posterior rotação das orelhas	+	-	+	-	+	+	4/6
Ptose palpebral	+	+	+	-	+	-	4/6
Epicanto	-	-	+	+	+	-	3/6
Desvio do septo nasal	+	+	-	-	-	-	2/6
Estrabismo	+	-	+	-	-	-	2/6
Peito escavado	-	-	+	-	+	-	2/6
Sindactilia cutânea parcial dos artelhos	-	-	+	-	-	+	2/6
Sindactilia cutânea parcial dos dedos	-	+	+	-	-	-	2/6
Má oclusão dentária	-	+	-	-	-	-	1/6
Plagiocefalia	-	-	-	-	-	+	1/6
Polegares alargados	-	-	-	-	+	-	1/6
Zigodactilia de artelhos	-	-	-	-	-	+	1/6
Atraso do desenvolvimento motor	-	-	-	-	-	-	0/6
Convulsão	-	-	-	-	-	-	0/6
Criptorquidia	-	-	-	-	-	-	0/6
Deficiência mental	-	-	-	-	-	-	0/6
Deficiência visual	-	-	-	-	-	-	0/6
Hipotelorismo ocular	-	-	-	-	-	-	0/6
Ponta nasal caída	-	-	-	-	-	-	0/6
Sindactilia cutânea total	-	-	-	-	-	-	0/6

Quadro 19 Resultados dos exames complementares dos indivíduos da Família 2.

	III-8	IV-5	IV-6	IV-7	IV-8
RX de crânio	Craniossinostose bicoronal Sinal da prata batida Forame parietal bilateral	Craniossinostose bicoronal Sinal da prata batida	Sem alterações	Craniossinostose bicoronal Sinal da prata batida	Craniossinostose unicoloral à direita Sinal da prata batida Forame parietal bilateral
RX da coluna torácica e lombo-sacra	Fusão parcial dos 1° e 2° arcos costais à esquerda	Fusão parcial dos 1° e 2° arcos costais à esquerda Spina bífida lombar	Spina bífida lombar	Sem alterações	Sem alterações
RX de membros	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
T.C de crânio	Não realizado	Craniossinostose Braquicefalia	Não realizado	Craniossinostose Braquicefalia	Não realizado
U.S abdominal	Sem alterações	Sem alterações	Não realizado	Sem alterações	Não realizado

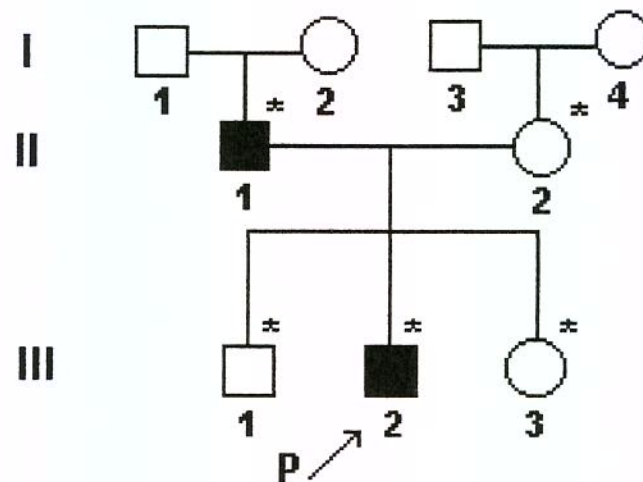
FAMILIA 3

Propósito: Indivíduo III-2

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Campinas-SP, 5 anos, DN: 14/04/1994.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, hipoplasia malar, ptose palpebral, implantação baixa do cabelo na fronte, ponte nasal proeminente, desvio do septo nasal, acentuação do ramo da hélice, palato ogival, má oclusão dentária, sindactilia cutânea parcial dos 3° e 4° dedos, háluces alargados, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 3° e 4° artelhos. Deficiência visual bilateral.

Heredograma



Legenda. P ↗ Propósito; * Indivíduo examinado; ■ ● Indivíduo com sinais sugestivos de SSC.

Figura 11 Heredograma da Família 3.

Exame físico dos demais membros da família:

Indivíduo II-1

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Campinas-SP, 31 anos, DN: 22/02/1968.

Exame físico: braquicefalia, ptose palpebral, implantação baixa do cabelo na fronte, hipoplasia malar, hipotelorismo ocular, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 3º e 4º dedos, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2º e 3º artelhos.

Indivíduo II-2

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Campinas-SP, 28 anos, DN: 27/06/1971.

Exame físico: sem alterações

Indivíduo III-1

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Campinas-SP, 8 anos, DN: 04/11/1991.

Exame físico: sem alterações.

Indivíduo III-3

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Campinas-SP, 6 meses, DN: 26/07/2000.

Exame físico: sem alterações.

Quadro 20 Dados Antropométricos e percentis dos indivíduos afetados da Família 3.

	II-1	III-2*
<i>Estatura (cm)</i>	174,5 <i>p50</i>	113 <i>p90-97</i>
<i>Peso (kg)</i>	64,5 <i>p50</i>	22,5 <i>>p97</i>
<i>PC (cm)</i>	56 <i>p50</i>	49 <i>p2-50</i>
<i>IC</i>	0,89	0,96
<i>DIP (cm)</i>	4,5 <i><p3</i>	5 <i>p50</i>
<i>Orelha Esquerda (cm)</i>	7,5 <i>>p97</i>	7,0 <i>>p97</i>
<i>Dedo médio/ Mão total</i>	<i>>p97</i>	<i>p50</i>
<i>Pé Esquerdo (cm)</i>	25,5 <i>p75</i>	19 <i>p50</i>

Legenda. * Propósito

Quadro 21 Características clínicas da Família 3, (+) presentes ou (-) ausentes,

* Propósito.

	II-1	III-2*	
Acentuação do ramo da hélice	+	+	2/2
Assimetria facial	+	+	2/2
Braquicefalia	+	+	2/2
Hipoplasia malar	+	+	2/2
Implantação baixa do cabelo na fronte	+	+	2/2
Ponte nasal proeminente	+	+	2/2
Ptose palpebral	+	+	2/2
Sindactilia cutânea parcial dos artelhos	+	+	2/2
Sindactilia cutânea parcial dos dedos	+	+	2/2
Deficiência visual	-	+	1/2
Desvio do septo nasal	-	+	1/2
Háluces alargados	-	+	1/2
Hipotelorismo ocular	+	-	1/2
Má oclusão dentária	-	+	1/2
Palato ogival	-	+	1/2
Ponta nasal caída	+	-	1/2
Atraso do desenvolvimento motor	-	-	0/2
Braquidactilia	-	-	0/2
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	0/2
Convulsão	-	-	0/2
Criptorquidia	-	-	0/2
Deficiência mental	-	-	0/2
Epicanto	-	-	0/2
Estrabismo	-	-	0/2
Hipertelorismo ocular	-	-	0/2
Implantação baixa das orelhas	-	-	0/2
Peito escavado	-	-	0/2
Plagiocefalia	-	-	0/2
Polegares alargados	-	-	0/2
Polegares digitiformes	-	-	0/2
Posterior rotação das orelhas	-	-	0/2
Prega palmar única bilateral	-	-	0/2
Sindactilia cutânea total	-	-	0/2
Zigodactilia de artelhos	-	-	0/2

Quadro 22 Resultados dos exames complementares do indivíduo III-2 da Família 3.

	III-2
RX de crânio	Craniossinostose bicoronal Sinal da prata batida
RX da coluna torácica e lombosacra	Não realizado
RX de membros	Sem alterações
T.C de crânio	Craniossinostose Braquicefalia
U.S abdominal	Sem alterações

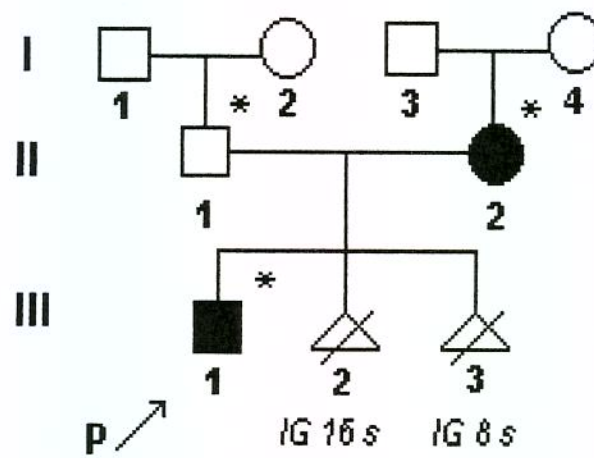
FAMILIA 4

Propósito: Indivíduo III-1

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Americana-SP, 2 anos, DN: 22/03/1997.

Exame físico: braquicefalia, occipital plano, fronte abaulada, assimetria facial, hipoplasia malar, implantação baixa do cabelo na fronte, hipertelorismo ocular, ptose palpebral, estrabismo convergente à direita, estenose do canal lacrimal à direita, crista supraorbitária rasa, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, implantação baixa das orelhas e posterior rotação, palato ogival, má oclusão dentária, prega palmar única bilateral, clinodactilia bilateral do 5º dedo, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2º, 3º e 4º dos artelhos, peito escavado, criptorquidia bilateral. Atraso DNPM, convulsão.

Heredograma



Legenda. P Propósito; * Indivíduo examinado; Aborto;
 Indivíduo com sinais sugestivos de SSC.

Figura 12 Heredograma da Família 4.

Exame físico dos demais membros da família:

Indivíduo II-1

Paciente do sexo masculino, branco, natural e procedente de Americana-SP, 21 anos.

Exame físico: sem alterações.

Indivíduo II-2

Paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente de Americana-SP, 18 anos.

Exame físico: braquicefalia, assimetria facial, implantação baixa do cabelo na fronte, ptose palpebral, hipertelorismo ocular, hipoplasia malar, ponte nasal proeminente, acentuação do ramo da hélice, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 3° e 4° dedos, sindactilia cutânea parcial bilateral dos 2° e 3° artelhos.

Quadro 23 Dados Antropométricos e percentis dos indivíduos afetados da Família 4.

	II-2	III-1*
<i>Estatura (cm)</i>	156	79
	<i>p</i> 10-25	< <i>p</i> 3-10
<i>Peso (kg)</i>	50	10
	<i>p</i> 10-25	<i>p</i> 10
<i>PC (cm)</i>	54	46
	<i>p</i> 2-50	< <i>p</i> 2
<i>IC</i>	0,89	1,03
<i>DIP (cm)</i>	6,5	6,0
	> <i>p</i> 97	> <i>p</i> 97
<i>Orelha Esquerda (cm)</i>	6,5	5,0
	<i>p</i> 75	<i>p</i> 50
<i>Dedo médio/ Mão total</i>	<i>p</i> 50	< <i>p</i> 3
<i>Pé Esquerdo (cm)</i>	21,5	10
	<i>p</i> 3	< <i>p</i> 3

Legenda. * Propósito

Quadro 24 Características clínicas da Família 4, (+) presentes ou (-) ausentes,
* Propósito.

	II-2	III-1*	
Acentuação do ramo da hélice	+	+	2/2
Assimetria facial	+	+	2/2
Braquicefalia	+	+	2/2
Hipertelorismo ocular	+	+	2/2
Hipoplasia malar	+	+	2/2
Implantação baixa do cabelo na fronte	+	+	2/2
Ponte nasal proeminente	+	+	2/2
Ptose palpebral	+	+	2/2
Sindactilia cutânea parcial dos artelhos	+	+	2/2
Atraso do desenvolvimento motor	-	+	1/2
Convulsão	-	+	1/2
Criptorquidia	-	+	1/2
Epicanto	-	+	1/2
Estrabismo	-	+	1/2
Implantação baixa das orelhas	-	+	1/2
Má oclusão dentária	-	+	1/2
Palato ogival	-	+	1/2
Peito escavado	-	+	1/2
Posterior rotação das orelhas	-	+	1/2
Prega palmar única bilateral	-	+	1/2
Sindactilia cutânea parcial dos dedos	+	-	1/2
Braquidactilia	-	-	0/2
Clinodactilia do 5º dedo	-	-	0/2
Deficiência mental	-	-	0/2
Deficiência visual	-	-	0/2
Desvio do septo nasal	-	-	0/2
Háluces alargados	-	-	0/2
Hipotelorismo ocular	-	-	0/2
Plagiocefalia	-	-	0/2
Polegares alargados	-	-	0/2
Polegares digitiformes	-	-	0/2
Ponta nasal caída	-	-	0/2
Sindactilia cutânea total	-	-	0/2
Zigodactilia de artelhos	-	-	0/2

Quadro 25 Resultados dos exames complementares do indivíduo III da Família 4.

	III-1
RX de crânio	Craniossinostose bicoronal Sinal da prata batida
RX da coluna torácica e lombo-sacra	Sem alterações
RX de membros	Sem alterações
T.C de crânio	Craniossinostose Braquicefalia
U.S abdominal	Sem alterações

Quadro 26 Frequência das características clínicas nos indivíduos afetados das 4 famílias estudadas.

Braquicefalia	24/24
Assimetria facial	20/24
Sindactilia cutânea parcial dos artelhos	18/24
Acentuação do ramo da hélice	15/24
Clinodactilia do 5º dedo	13/24
Háluces alargados	13/24
Hipoplasia malar	13/24
Implantação baixa das orelhas	13/24
Ponte nasal proeminente	13/24
Implantação baixa do cabelo na fronte	12/24
Ptose palpebral	12/24
Hipertelorismo ocular	11/24
Palato ogival	10/24
Posterior rotação das orelhas	10/24
Desvio do septo nasal	9/24
Ponta nasal caída	7/24
Sindactilia cutânea parcial dos dedos	7/24
Braquidactilia	6/24
Prega palmar única bilateral	6/24
Polegares digitiformes	5/24
Epicanto	4/24
Estrabismo	3/24
Má oclusão dentária	3/24
Peito escavado	3/24
Deficiência mental	2/24
Polegares alargados	2/24
Atraso do desenvolvimento motor	1/24
Convulsão	1/24
Criptorquidia	1/24
Deficiência visual	1/24
Hipotelorismo ocular	1/24
Plagiocefalia	1/24
Sindactilia cutânea total	1/24
Zigodactilia de artelhos	1/24

- **Análise dos exames complementares**

Os exames complementares foram requisitados a todos os probandos e parentes afetados das 4 famílias. Entretanto, nem todos quiseram submeter-se a investigação.

Quanto aos achados radiológicos, ao todo, sete indivíduos apresentaram radiografia de crânio com craniossinostose bicoronal e um apresentou craniossinostose unicoronal. Dois indivíduos da Família 2 apresentaram forame parietal bilateral. O sinal da prata batida apareceu nos oito casos.

Na Família 2, a radiografia de tórax em dois indivíduos apresentou fusão parcial dos 1º e 2º arcos costais à esquerda e, na radiografia de coluna lombosacra dois casos apresentaram spina bífida lombar.

A tomografia computadorizada de crânio demonstrou craniossinostose com braquicefalia, sem alteração do parênquima cerebral nos quatro indivíduos que se submeteram ao exame.

A ultra-sonografia abdominal e radiografia de membros não mostraram anormalidades (Quadro 27).

Quadro 27 Indivíduos que realizaram os exames complementares e as alterações radiológicas, (+) presentes, (-) ausentes, (x) exame não realizado.

	Família 1		Família 2					Família 3	Família 4
	III-2	IV-2	III-8	IV-5	IV-6	IV-7	IV-8	III-2	III-1
RX de crânio									
Craniossinostose Bicoronal	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Craniossinostose Unicoronal	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Sinal de prata batida	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Forame parietal bilateral	-	-	+	-	-	-	+	-	-
RX de torác									
Fusão parcial dos 1° e 2° arcos costais	x	x	+	+	-	-	-	-	-
RX da coluna lombo-sacra									
Spina bífida lombar	x	x	-	+	+	-	-	-	-
RX de membros									
	x	x	-	-	-	-	-	x	-
T.C de crânio									
Craniossinostose	x	x	x	+	x	+	x	+	+
US Abdominal									
	x	x	x	-	x	-	x	-	x

ESTUDO CITOGENÉTICO

Quadro 28 Resultado do exame de cariótipo com bandamento G.

Familia	Indivíduo	Cariótipo com resolução aproximadamente de 500 bandas (Banda G)
1	IV-2	46,XY
2	IV-5	46,XX
3	III-2	46,XY
4	III-1	46,XY

ESTUDO MOLECULAR

Amplificação do Exon 1 (fragmento Twist 1)

A amplificação do fragmento **Twist 1** mostrou-se trabalhosa na determinação das condições ideais, usando as condições descritas por Howard *et al.* (1997), pois apresentava bandas inespecíficas. Diminuindo a temperatura de anelamento para 62°C, aumentando os tempos de desnaturação inicial, de extensão e de extensão final obtivemos a amplificação adequada (Figura 13)

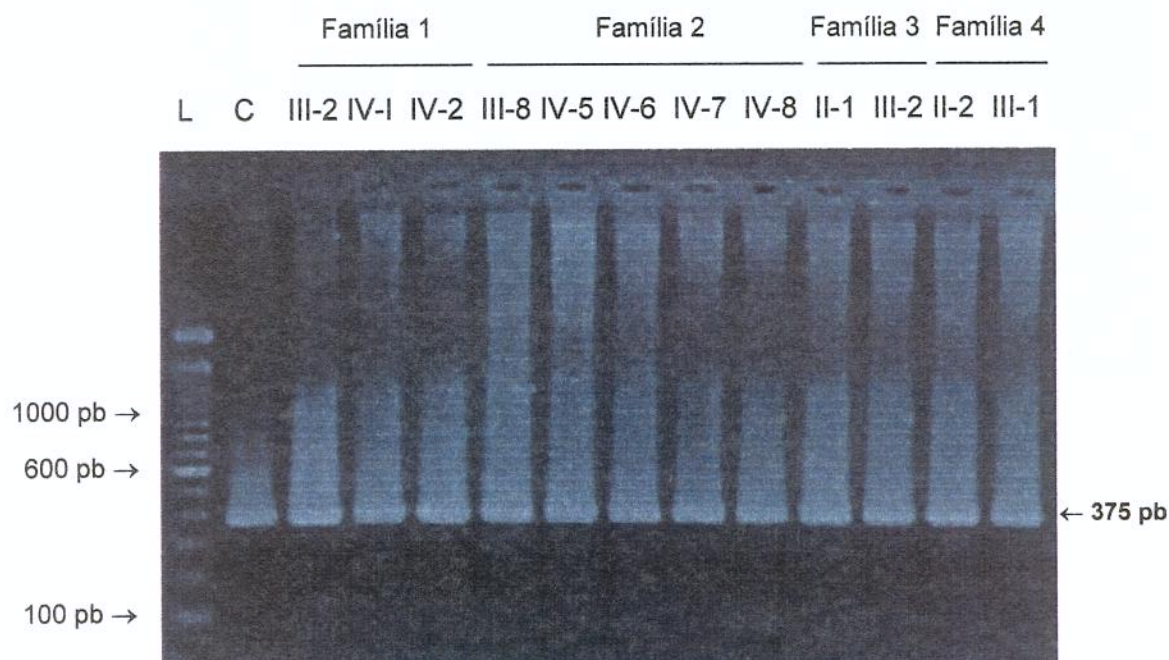


Figura 13 Fragmento **Twist 1**: Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Demonstrativo de amplificação dos indivíduos III-2, IV-1, IV-2, III-8, IV-5, IV-6, IV-7, IV-8, II-1, III-2, II-2, III-1 e um controle negativo (C). Ladder de 100 bp (L).

Amplificação do Exon 1 (fragmento Twist 2)

A amplificação do fragmento **Twist 2** não apresentou problemas usando as condições descritas por Howard *et al.* (1997) (Figura 14).

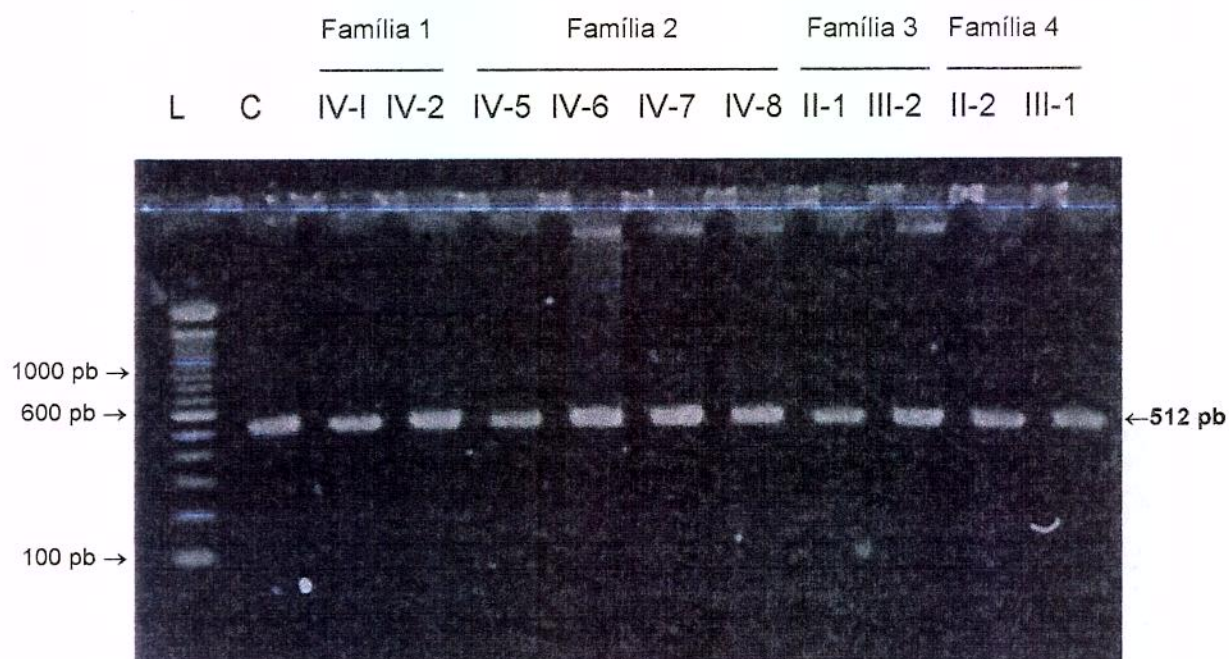


Figura 14 Fragmento **Twist 2**: Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Demonstrativo de amplificação dos indivíduos IV-1, IV-2, IV-5, IV-6, IV-7, IV-8, II-1, III-2, II-2, III-1 e um controle negativo (C). Ladder de 100 bp (L).

A amplificação do fragmento **Twist 4** não apresentou problemas, usando as mesmas condições que as descritas por Howard *et al.* (1997) para o fragmento Twist 2 (Figura 15).

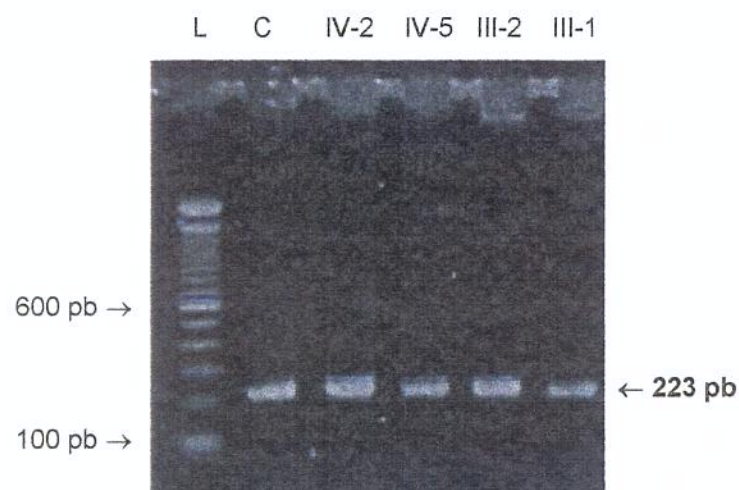


Figura 15 Fragmento **Twist 4**: Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. Demonstrativo de amplificação dos indivíduos IV-2 (família 1), IV-5 (família 2), III-2 (família 3), III-1 (família 4) e um controle negativo (C) Ladder de 100 bp (L).

ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO DIRETO POR INCORPORAÇÃO DE DIDEOXINUCLEOTÍDEOS

Os fragmentos **Twist 1** e **Twist 2** foram completamente seqüenciados nos propósitos das 4 famílias.

Twist 1

A leitura do seqüenciamento direto do fragmento **Twist 1** das famílias 1, 2, 3 e 4, demonstrou nos propósitos, um sinal sugerindo uma troca nucleotídica G→T, na posição 1.243. Essa transversão causaria troca do aminoácido no códon 35 de Glicina (Gly) para Triptofano (Trp). O controle normal não apresentou esta alteração (Figura 16).

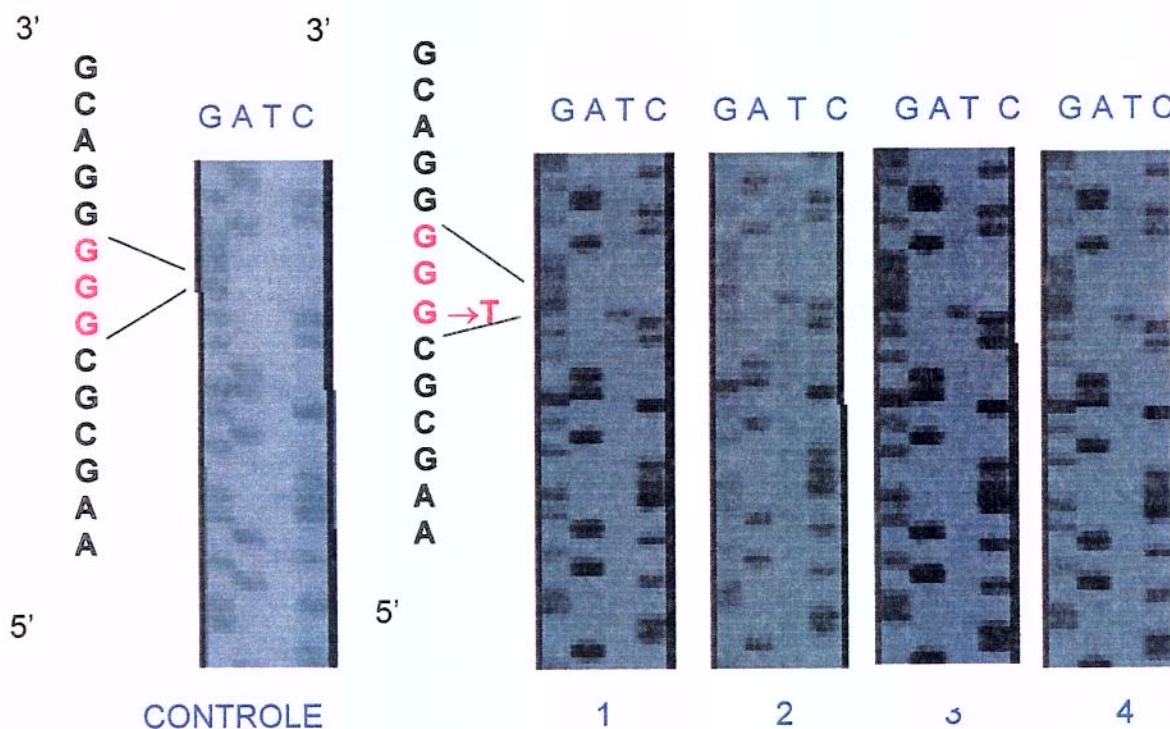


Figura 16 Parte do seqüenciamento direto com *primer sense* do fragmento Twist 1 dos propósitos e controle normal. 1- Família 1 (IV-2), 2-Família 2 (IV-5), 3-Família 3 (III-2), 4-Família 4 (III-1). A seta indica uma heterozigose para troca G→T na posição nucleotídica 1.243 que ocupa a primeira posição do Códon 35 (em vermelho).

Uma análise de sequência utilizando o programa Gene Runner 3.0 (Hastings Software Inc.), revelou que a troca G→T criaria um sítio de corte com a enzima de restrição *Hae* II. Dessa forma para se convalidar a variação observada realizou-se a digestão do fragmento Twist 1 com a enzima *Hae* II (LifeTechnologies®), que tem como propriedade cortar a sequência de nucleotídeos RGCYC/Y, onde R é G ou A e Y é C ou T. Assim, seriam formados 3 fragmentos contendo 7 pb, 156 pb e 212 pb a partir da digestão do fragmento mutante.

Incubou-se a mistura (Quadro 27) a 37°C, durante um período de 30 minutos. Aplicou-se a amostra no gel de agarose a 1,5% fazendo-se a corrida. O marcador de peso molecular utilizado foi DNA 'ladder' de 100 pb (Gibco BRL), corou-se o gel em solução diluída de Brometo de Etídeo (0,5 µg/ml) durante 10 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultra-violeta (UV transluminator, Fotodyne) e fotografado com câmera Polaroid.

Quadro 29 Componentes para a reação da enzima de restrição *Hae* II.

Reação	Volume
PCR	10 µl
<i>Hae</i> II	0,75 µl
Tampão da <i>Hae</i> II	2 µl
Água mQ	7.75 µl
Volume total	20 µl

A análise do produto de *PCR* após a reação com a *Hae* II, não evidenciou a formação de novos fragmentos (Figura 17).

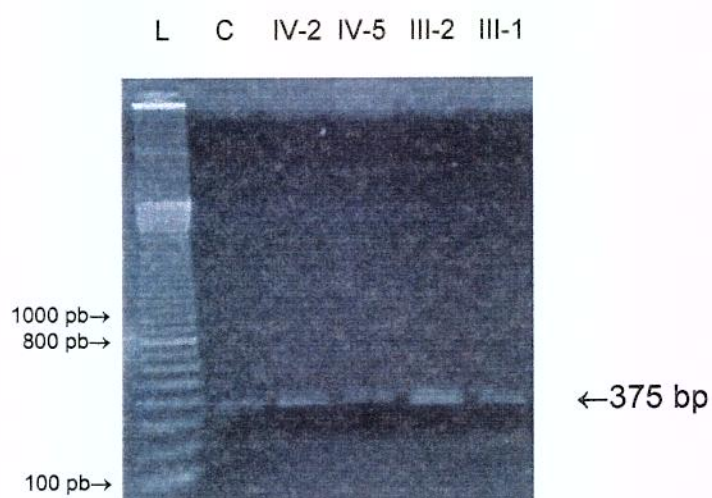


Figura 17 Demonstrativo de amplificação do fragmento **Twist 1** após digestão com a enzima *Hae* II. Indivíduos IV-2 (família 1), IV-5, (família 2), III-2 (família 3), III-1 (família 4) e um controle negativo (C). Ladder de 100 bp (L). Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Como a análise pela enzima de restrição não confirmou o achado, foram realizadas novas amplificações (*PCR*) para o fragmento **Twist 1** dos propósitos e do controle, com novos seqüenciamentos utilizando separadamente os *primers* *sense* e *antisense*. Repetiu-se o procedimento por duas vezes, e os resultados não demonstraram a existência desta alteração (Figura 18), bem como nenhuma outra em toda a seqüência do fragmento **Twist 1**.

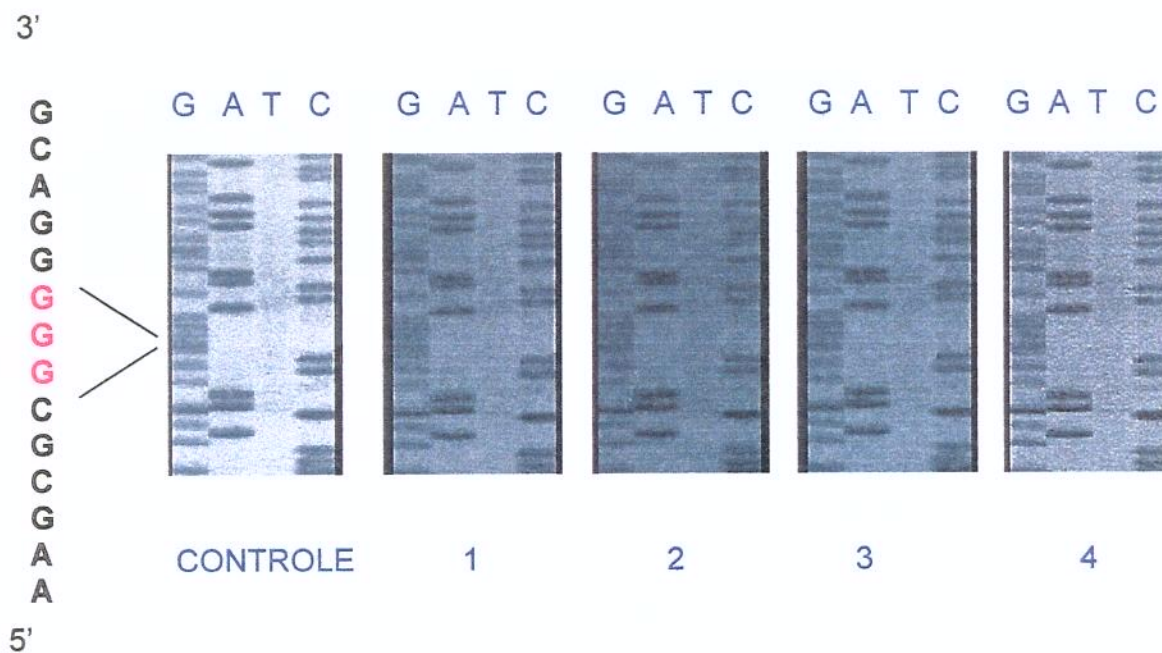


Figura 18 Parte do seqüenciamento direto com o *primer sense* do fragmento Twist 1 dos propósitos e do controle normal. 1- Família 1 (IV-2), 2- Família 2 (IV-5), 3- Família 3 (III-2), 4- Família 4 (III-1), demonstrando o Códon 35 (em vermelho) sem alteração.

Twist 2

O estudo do seqüenciamento direto do fragmento **Twist 2** demonstrou alteração na posição nucleotídica 1.622 apenas na **Família 2**. Cinco indivíduos desta família (III-8, IV-5, IV-6, IV-7 e IV-8) apresentaram um sinal sugerindo troca em heterozigose A→T (Figura 19). Essa troca mudaria o aminoácido do códon 162 de Ácido aspártico (Asp) para Valina (Val).

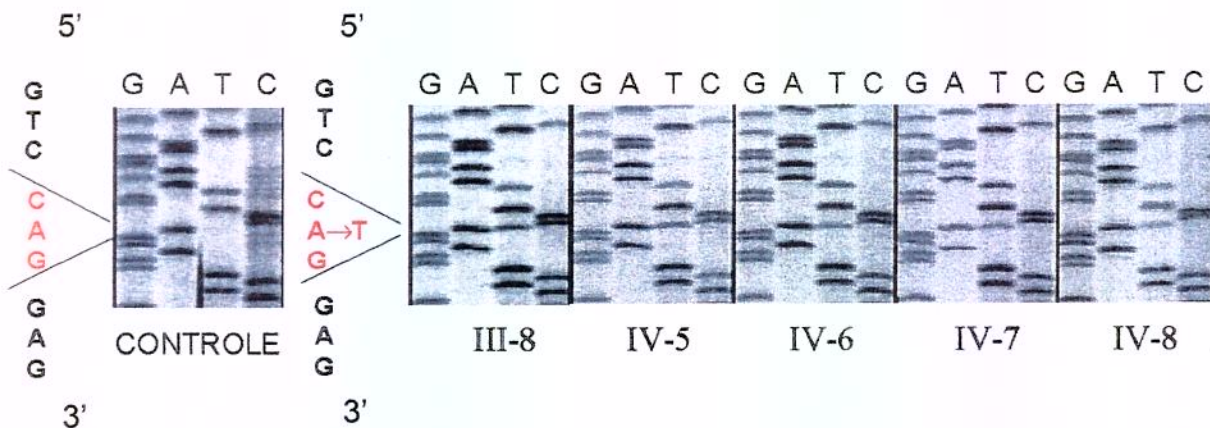


Figura 19 Parte do seqüenciamento direto com *primer antisense* do fragmento Twist 2 dos indivíduos da família 2 e controle normal. Os indivíduos III-8, IV-5, IV-6, IV-7, IV-8 da família 2. A seta indica uma heterozigose no segundo nucleotídeo do códon 162 de A→T (em vermelho).

Para convalidação das alterações observadas no primeiro gel de seqüenciamento, novas reações de amplificação foram realizadas e seus produtos foram posteriormente seqüenciados, tanto com os *primers sense* quanto *antisense*. Entretanto, os resultados desses procedimentos formam incertos, pois a presença da alteração foi inconstante para um mesmo indivíduo. Como a troca nucleotídica não provocaria alteração em nenhum sítio de restrição, optou-se por reduzir o tamanho do fragmento, pois o sequenciamento com o *primer antisense* não apresentou resolução suficiente para convalidar a alteração, mesmo após a realização de uma corrida longa, devido ao tamanho do fragmento. Assim, os

novos *primers* desenhados amplificariam um fragmento de 223 pb, denominado **Twist 4**, que engloba a posição nucleotídica alterada.

O seqüenciamento direto com os *primers sense* e *antisense* deste fragmento, em todos os indivíduos afetados da família 2 (Figura 20) e nos propósitos das famílias 1, 3 e 4 não confirmou a existência desta alteração, assim como nenhuma outra alteração em toda a seqüência do fragmento **Twist 4** foi encontrada.

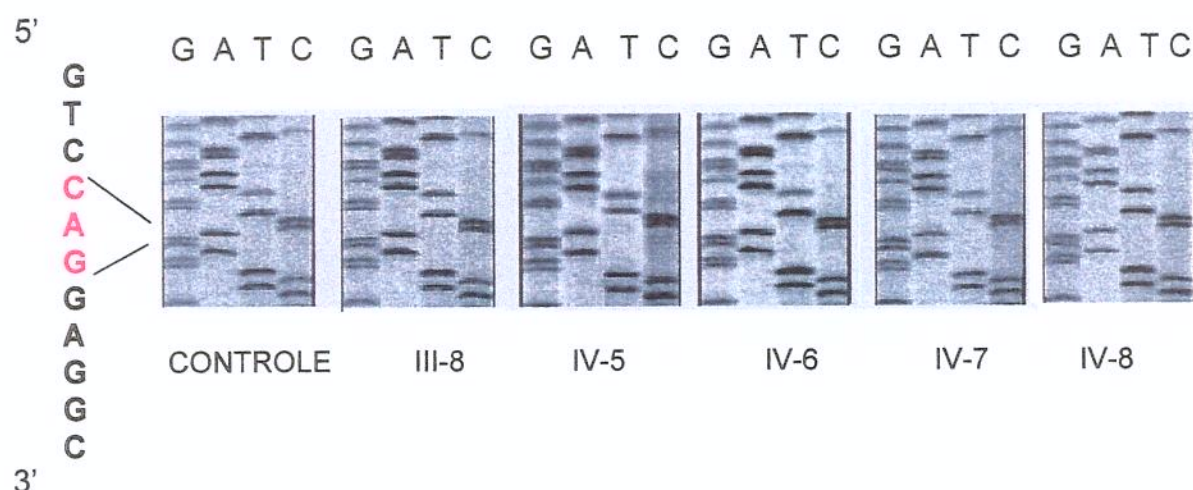


Figura 20 Parte do seqüenciamento direto com *primer antisense* do fragmento **Twist 4** dos indivíduos da família 2 e controle normal. Os indivíduos III-8, IV-5, IV-6, IV-7 e IV-8 da família 2 não confirmaram qualquer alteração no Códon 162 (em vermelho).

4. *DISCUSSÃO*

Foram examinadas 4 famílias somando 31 indivíduos, dos quais, sete não apresentaram alterações dismórficas. Observou-se a frequência de trinta e três características clínicas da SSC em cada um dos 24 indivíduos afetados.

Os achados clínicos mais frequentes nos indivíduos afetados foram braquicefalia (24/24), assimetria facial (20/24), orelhas com acentuação do ramo da hélice (15/24) e implantação baixa (13/24), hipoplasia malar (13/24), ponte nasal proeminente (13/24), implantação baixa dos cabelos na fronte (12/24), ptose palpebral (12/24). Achados adicionais incluíram sindactilia cutânea parcial dos artelhos (18/24), clinodactilia do 5º dedo (13/24), háluces alargados (13/24).

A Família 1 apresentou quatorze indivíduos afetados em 3 gerações. Foi observada ampla variedade fenotípica, sendo os sinais mais frequentes a sindactilia cutânea parcial dos artelhos (12/14), assimetria facial (10/14), clinodactilia do 5º dedo (9/14), implantação baixa das orelhas (8/14), háluces alargados (8/14), braquicefalia (6/14), ponta nasal caída (6/14), desvio do septo nasal (6/14) e acentuação do ramo da hélice (6/14). Esta família apresentou o único caso de sindactilia cutânea total de artelhos e dois casos de deficiência mental moderada, reforçando a expressividade variável já descrita por outros autores (Kopysc *et al.*, 1980; Howard *et al.*, 1997; El Ghouzzi *et al.*, 1999).

Interessante ressaltar a presença de sete indivíduos com expressão branda dos sinais clínicos, inclusive um indivíduo apresentando apenas braquicefalia e clinodactilia bilateral do 5º dedo como características fenotípicas, que poderiam representar apenas uma variação do normal (Smith, 1989).

Nesta família houve tendência dos indivíduos mais baixos (<p3), serem também os mais afetados. Foi também a que apresentou a maior relação dedo médio/mão, fugindo à característica de braquidactilia presente na descrição clássica da SSC.

A Família 2 apresentou seis indivíduos afetados em 3 gerações. Os achados clínicos mais frequentes foram braquicefalia (6/6), assimetria facial (6/6), hipertelorismo ocular (6/6), braquidactilia (6/6), ponte nasal proeminente (5/6), palato ogival (5/6), hipoplasia malar (5/6), acentuação do ramo da hélice (5/6), implantação baixa do cabelo na fronte (5/6), prega palmar única bilateral (5/6),

ptose palpebral (4/6), implantação baixa das orelhas (4/6), rotação posterior das orelhas (4/6), clinodactilia bilateral do 5º dedo (4/6), háluces alargados (4/6), polegares digitiformes (4/6) e epicanto (3/6). Esta família apresentou dois casos com estrabismo convergente e um indivíduo com plagiocefalia.

Nesta família, quatro dos seis indivíduos afetados tinham estatura abaixo do p3, mostrando novamente a tendência encontrada na Família 1. Estas duas famílias diferem, contudo, no achado de braquidactilia observado em 100% dos afetados da Família 2.

A Família 3 apresentou dois indivíduos afetados em 2 gerações. Os achados clínicos mais freqüentes foram braquicefalia (2/2), assimetria facial (2/2), ptose palpebral (2/2), hipoplasia malar (2/2), implantação baixa do cabelo na fronte (2/2), ponte nasal proeminente (2/2), acentuação do ramo da hélice (2/2), sindactilia cutânea parcial dos dedos (2/2) e sindactilia cutânea parcial dos artelhos (2/2). Nesta família não se observou baixa estatura, ocorrendo o único caso de hipotelorismo ocular e um caso de deficiência visual bilateral como seqüela da craniossinostose grave nos primeiros meses de idade, como descrito na literatura (Howard *et al.*, 1997).

A Família 4 apresentou dois indivíduos afetados em 2 gerações. Nesta família os achados clínicos mais freqüentes foram braquicefalia (2/2), assimetria facial (2/2), ptose palpebral (2/2), hipertelorismo ocular (2/2), hipoplasia malar (2/2), implantação baixa do cabelo na fronte (2/2), acentuação do ramo da hélice (2/2), ponte nasal proeminente (2/2) e sindactilia cutânea parcial dos artelhos (2/2). Observou-se um mesmo indivíduo apresentando criptorquidia bilateral, atraso do desenvolvimento motor e convulsão como observado por Kopysc *et al.* (1980). Nesta família, apenas o propósito apresentou estatura abaixo do p3.

O sinal clínico com freqüência de 100% nas 4 famílias foi a braquicefalia.

As alterações dismórficas como clinodactilia, prega palmar única, sindactilia cutânea parcial, epicanto interno, orelhas com implantação baixa e posterior rotação são consideradas discretas ou secundárias, quando isoladas, dificultando a identificação de um indivíduo afetado quando na ausência de um quadro dismórfico evidente (Smith, 1989). Porém, a ocorrência de duas ou mais

anomalias secundárias é um possível indicador da presença de malformações *major* ou múltiplas, e deve ser valorizada (Rosano *et al.*, 2000).

Assim, dentro de uma mesma família, houve casos em que discretos dismorfismos, que podem fazer parte da variação normal, apenas foram valorizados pelo contexto clínico.

Considerando as características mais freqüentes, todos os indivíduos afetados apresentaram sinais clínicos compatíveis com as descritas na literatura para a Síndrome de Saethre-Chotzen, com padrão de herança autossômica dominante com alta penetrância e expressividade variável (Cohen, 1986).

A extensa variabilidade fenotípica intra e interfamiliar que essas famílias apresentaram, reforça a importância da avaliação dismorfológica para detectar formas graves e brandas de SSC.

Embora apenas 9 indivíduos tenham realizado os exames de imagem (os demais declinaram esta parte da pesquisa), os estudos radiológicos mostraram 7 casos com craniossinostose bicoronal e um caso com unicoronal, sinal de prata batida em oito casos. A Família 2 apresentou em dois indivíduos forame parietal bilateral, como também fusão parcial dos 1° e 2° arcos costais e *spina* bífida lombar. Estes achados são concordantes com a literatura quanto ao diagnóstico radiológico da Síndrome de Saethre-Chotzen (Reardon *et al.*, 1994; Wilkie *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1997).

A hipótese inicial deste estudo era de correlação fenótipo-genótipo positiva, ou seja, para os casos de SSC identificados, deveria existir uma ou mais mutações na sequência codificante do exon 1 do gene *Twist*, como demonstravam os trabalhos de Howard *et al.* (1997) e El Ghouzzi *et al.* (1997, 1999).

O propósito de cada família apresentou cariótipo normal, tornando pouco provável a possibilidade de pontos de quebra como deleções e translocações balanceadas na região 7p, descritos por Reid *et al.* (1993), Wilkie *et al.* (1995) e Rose *et al.* (1997).

A estratégia de seqüenciamento direto dos produtos de PCR amplificados para o exon 1 do gene *Twist* pareceu a mais adequada, tendo em vista que os estudos publicados encontravam altas taxas de mutação nos portadores de SSC.

Embora, durante o desenvolvimento da pesquisa, tivessem sido evidenciadas duas alterações nucleotídicas em sequenciamentos distintos, a comprovação dessas alterações através de técnicas diferentes não foi possível, afastando a existência real de mutações no exon 1 do gene *Twist*, mesmo nos indivíduos mais afetados.

A metodologia de *PCR* e seqüenciamento direto, como qualquer outra, tem limitações e possibilidades de erro devido tanto à manipulação do DNA, quanto às características dos reagentes utilizados. A incorporação incorreta de nucleotídeos de DNA nas fitas recém-sintetizadas durante os ciclos da *PCR* pode causar o enriquecimento de “alelos falso-mutantes” nos produtos de reação. São, na verdade, falsas mutações induzidas pela *Taq* DNA Polimerase que podem ocorrer numa razão de 10^{-3} a 10^{-6} por nucleotídeo, dependendo das condições da reação e do tamanho e seqüência nucleotídica do fragmento de DNA (Hayashi, 1994). Modelos matemáticos da reação de *PCR* revelam que a taxa de falso positivo pode variar dependendo da quantidade inicial de DNA, da taxa de erro da *Taq* DNA polimerase, do número de ciclos, da eficiência da reação e da concentração dos reagentes (Keohavong *et al.*, 1999). Outro fator que pode alterar a fidelidade da *Taq* polimerase é o pH, existe uma correlação entre o baixo pH e o pareamento e incorporação corretos dos nucleotídeos (Eckert *et al.*, 1993). As seqüências com repetições de um único nucleotídeo, bem como aquelas com repetições de dinucleotídeos, como as observadas no exon 1 do gene *Twist*, acrescidas do grande conteúdo CG, podem ser responsáveis por erros de incorporação, devido à formação de estruturas secundárias de DNA, como discutido por Loewen *et al.* (1995). Este autor observou que principalmente nas regiões próximas à terminação 3' dos *primers* utilizados, este tipo de evento pode reduzir a eficiência da reação por interferir nos estágios iniciais da elongação, o que pode causar erros de incorporação. Eckert *et al.* (1999) demonstraram que apesar da perda da propriedade de leitura de prova da *Taq*, pôde aumentar a fidelidade da reação, quando a concentração de $MgCl_2$ e dNTP estavam presente em quantidades equimolares. Essas condições de alta fidelidade parecem extremamente úteis para utilização mais específica do DNA, como detecção de mutações pontuais e

foram as condições procuradas para amplificação do DNA no caso do gene *Twist* (Eckert *et al.*, 1990).

A *Taq* DNA polimerase produz freqüentes transições T→C em condições experimentais e, quando a PCR é realizada sob altas concentrações de enzima, o produto está sujeito a apresentar erros com aumento da freqüência de transversões A→T e G→T (Tosaka *et al.*, 2001). Nos resultados aqui apresentados, as duas alterações induzidas pela *Taq* DNA polimerase foram transversões A→T e G→T, aparentemente observadas na família 2 em todos os membros afetados e, no segundo caso, em todos os propósitos das 4 famílias.

É interessante ressaltar que nesses dois casos o controle normal sempre foi negativo, aumentando a indicativa incorreta de uma nova mutação. Essa possibilidade foi descartada pelo seqüenciamento com novos *primers*, desenhados com objetivo de reduzir o tamanho do fragmento e aumentar a resolução da leitura no gel, flanqueando melhor a região do fragmento Twist 2.

O produto do gene *Twist* é um fator de transcrição básico hélice-alça-hélice (Howard *et al.* 1997). Mutações em heterozigose neste gene causam haploinsuficiência, isto é, a perda completa da função de uma cópia gênica. Com isso ocorre comprometimento da função normal da proteína Twist, que tem efeito de regulação negativa na diferenciação dos osteoblastos (El Ghouzzi *et al.*, 2000; Gripp *et al.*, 2000).

A proteína Twist regula as FGFRs, através da modulação de sua expressão. A família de FGFR consiste de quatro receptores protéicos tirosina-quinase, com variáveis afinidades e especificidade a processos que incluem incluindo angiogênese, cicatrização de feridas, gênese tumoral e desenvolvimento embrionário. A FGF pode também agir em um estágio mais tardio na diferenciação dos osteoblastos, em que tanto o excesso de FGF quanto a superativação dos FGFR causam a aceleração do fechamento das suturas cranianas. Estudos realizados por Paznekas *et al.* (1998) e Passos-Bueno *et al.* (1999) observaram anormalidades esqueléticas resultantes de mutações nos *FGFRs*. Esses achados têm levado ao melhor entendimento da participação destes fatores na sinalização

durante o desenvolvimento ósseo endocondral e intramembranoso (Opperman, 2000; Rice *et al.*, 2000; Greenwald *et al.*, 2001).

A sobreposição das características clínicas e a presença de mutações nos genes codificadores para o *Twist* e *FGFR 1, 2 e 3* dão suporte aos estudos que reportam uma via molecular comum envolvida na modulação do desenvolvimento craniofacial e dos membros (Paznekas *et al.*, 1998; Passos-Bueno *et al.*, 1999; Gripp *et al.*, 2000).

A utilização do rastreamento destas mutações para o diagnóstico da SSC têm encontrado controvérsia entre diferentes autores, devido à diferença na frequência observada das mutações e a ampla variação de achados clínicos, tornando mais difícil a correlação genótipo-fenótipo. El Ghouzzi *et al.* (1999) observaram que em 22 indivíduos portadores de SSC, apenas quatro não apresentaram mutações no gene *Twist* ou *FGFR3*. Contudo, os estudos conduzidos por Paznekas *et al.*, (1998), a partir da casuística de Howard *et al.*, (1997) parecem não correlacionar tão claramente alterações genótípicas do *Twist* à SSC. Estes autores conseguiram identificar mutações no gene *Twist* em 48% dos indivíduos com SSC. Nesta mesma casuística, os indivíduos afetados apresentavam mutações no gene *FGFR3* em 16% dos casos e no gene *FGFR2* em 3%. Em conjunto, Paznekas *et al.*, (1998) identificaram mutações nos genes *Twist*, *FGFR2* e *FGFR3* em 68% dos casos, mostrando a necessidade de rastreamentos adicionais nas seqüências destes genes que poderão identificar regiões críticas envolvidas na patogênese do fenótipo da Síndrome de Saethre-Chotzen.

Os resultados negativos observados com o uso da técnica de seqüenciamento direto, em indivíduos com cariótipo normal, tornam pouco provável a existência de mutações no exon 1 do gene *Twist* em nossa casuística.

Entretanto, recentes estudos envolvendo indivíduos com SSC que apresentavam cariótipo normal e seqüenciamento do gene *Twist* sem alteração, demonstraram áreas de deleções submicroscópicas não observadas pelo uso de citogenética com hibridização fluorescente *in situ* (FISH), mas detectadas apenas

pela técnica de *Southern Blot*, podendo ser responsáveis pela haploinsuficiência do gene *Twist* (Gripp *et al.*, 2001).

Portanto, o emprego de outras técnicas de biologia molecular pode contribuir para elucidar o papel do gene *Twist* nos achados clínicos desta casuística, como também é possível que os distúrbios detectados sejam decorrentes de outros genes envolvidos na regulação do desenvolvimento craniofacial e de membros.

5. CONCLUSÕES

1. Os achados clínicos neste estudo estão compatíveis com a descrição da Síndrome de Saethre-Chotzen na literatura, incluindo a grande variabilidade intra e interfamiliar.
2. O estudo dismorfológico detectou indivíduos com sinais evidentes e outros com sinais menores, como braquicefalia, sindactilia cutânea e clinodactilia, o que pode sugerir formas brandas da SSC.
3. O estudo do gene *Twist* pelo seqüenciamento direto nesta casuística não mostrou alterações da seqüência codificadora do exon 1.
4. O emprego de outras técnicas de biologia molecular pode contribuir para elucidar o papel do gene *Twist* nos achados clínicos desta casuística.
5. É possível que os distúrbios detectados nesta casuística sejam decorrentes de outros genes envolvidos na regulação do desenvolvimento craniofacial e de membros.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA, JR G.; FARAH, S.B.; MELLO, M.P.-Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. **Braz J Med Biol Res.** v. 29, n.1, p.1-13, 1996.

BENNETT ,R.L.; STEINHAUS, K.A.; UHRICH, S.B.; O'SULLIVAN, C.K.; RESTA, R.G.; LOCHNER-DOYLE, D.; et al. -Recommendations for standardized human Pedigree Nomenclature. **Am. J. Hum. Genet.** v. 56, p.745-752, 1995.

BLAIS, M.M.; GREEN, W.T. & ANDERSON, M. -Length of the growing foot. **J Bone Joint Surg.** v. 39. p. 998-1001,1956.

BOURGEOIS, P.; BOLCATO-BELLEMIN, A.L.; DANSE, J.M.; BLOCH-ZUPAN, A.; YOSHIBA, K.; STOETZEL, C.; PERRIN-SCHMITT, F. -The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. **Hum Mol Genet.** v. 7, n. 6, p. 945-57, 1998.

BOURGEOIS, P.; STOETZEL, C.; BOLCATO-BELLEMIN, A. L.; MATTEI, M. G.; PERRIN-SCHMITT, F. - The human H-twist gene is located at 7p21 and encodes a b-HLH protein that is 96% similar to its murine M-twist counterpart. **Mammalian Genome.** v. 7, p. 915-917, 1996.

BRUETON, L.A.; van HERWERDEN, L.; CHOTAI, K.A.; WINTER, R.M. -The mapping of a gene for craniosynostosis: evidence for linkage of the Saethre-Chotzen syndrome to distal chromosome 7p. **J Med Genet.** v.29, p.681-685, 1992.

CHOTZEN, F. -Eine eigenartige familiäre Entwicklungsstörung (Akrocephalosyndaktylie, Dysostosis craniofacialis und Hypertelorismus). **Mschr. Kinderheilk.** v. 55, p. 97-122, 1932.

COHEN, M.M. JR. **Craniosynostosis: diagnosis, evaluation and management**, 59-73, 215-243, 467-471. 1st edition, Raven, New York, 1986.

COHEN, M.M. JR. -Pfeiffer syndrome update, clinical subtypes, and guidelines for differential diagnosis. **Am J Med Genet.** v. 45. p.300-7, 1993.

COHEN, M.M. JR & KREIBORG, S. - Visceral anomalies in the Apert syndrome. **Am J Med Genet.** v. 45.p. 758-60, 1993.

COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES (CIOMS) IN COLLABORATION WITH THE WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Geneva. p 8-63, 1993.

DROSSOPOULOU, G.; LEWIS, K.E.; SANZ-EZQUERRO, J.J.; NIKBAKHT, N.; MCMAHON, A.P.; HOFMANN, C.; TICKLE, C. -A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signaling. **Development.** v. 127, v.1337-1348, 2000.

ECKERT, K.A. & KUNKEL, T.A. -Fidelity of DNA synthesis catalyzed by human DNA polymerase alpha and HIV-1 reverse transcriptase: effect of reaction pH. **Nucleic Acids Res.** v. 21, n.22, p.5212-20, 1993.

ECKERT, K.A. & KUNKEL, T.A. -High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nucleic Acids Res.** v.18, n.13, p.3739-44, 1990.

EL GHOUZZI, V; LE MERRER, M; PERRIN-SCHMITT, F; et al. -Mutations in *TWIST* gene in the Saethre-Chotzen syndrome. **Nature Genet.** v. 15, p.42-46, 1997.

EL GHOUZZI, V.; LAJEUNIE, E.; LE MERRER, M.; CORMIER-DAIRE, V.; RENIER, D.; MUNNICH, A.; BONAVENTURE, J. -Mutations within or upstream of the basic helix-loop-helix domain of the *TWIST* gene are specific to Saethre-Chotzen syndrome. **Eur J Hum Genet.** v. 7, n.1, p.27-33, 1999.

EL GHOUZZI, V.; LEGEAI-MALLET, L.; ARESTA, S.; BENOIST, C.; MUNNICH, A.; DE GUNZBURG, J.; BONAVENTURE, J. -Saethre-Chotzen mutations cause *TWIST* protein degradation or impaired nuclear location. **Hum Mol Genet.** v. 22, 9 n.5, p.813-819, 2000.

EL GHOUZZI, V.; LEGEAI-MALLET, L.; BENOIST-LASSELIN, C.; LAJEUNIE, E.; RENIER, D.; MUNNICH, A.; BONAVENTURE, J. -Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of *TWIST* abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome. **FEBS.** v. 492, p.112-118, 2001.

FEINGOLD, M. & BOSSERT, W.H. -Normal values for selected physical parameters: an aid to syndrome delineation. **Birth Defects**, orig artic ser. v. 10. n.13. p. 1-16, 1974.

GOLLA, A.; LICHTNER, P.; VON GERNET, S.; WINTERPACHT, A.; FAIRLEY, J.; MURKEN, J.; et al. -Phenotypic expression of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation P250R in a large craniosynostosis family. **J Med Genet.** v. 34, p. 683-684, 1997.

GORLIN, R.J.; COHEN, JR M.M.; LEVIN, L.S. **Syndromes of the Head and Neck**, 3rd edition, New York, Oxford University Press. 1990.

GREENWALD, J.A.; MEHRARA, B.J.; SPECTOR, J.A.; WARREN, S.M.; FAGENHOLZ, P.J.; SMITH, L.P.; et al. -In vivo modulation of FGF biological activity alters cranial suture fate. **Am J Pathol.** v. 158, n. 2, p. 441-452, 2001.

GRIPP, K.W.; ZACKAI, E.H.; STOLLE, C.A. -Mutations in the human *TWIST* gene. **Hum Mutat.** v. 15, n.5, p.479, 2000.

GRIPP, K.W.; KASPARCOVA, V.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; BHATT, S.; BARTLETT, S.P.; STORM, A.L.; et al -A diagnostic approach to identifying submicroscopic 7p21 deletions in Saethre-Chotzen syndrome: fluorescence in situ hybridization and dosage-sensitive Southern blot analysis. **Genet Med.** v.3, n.2, p.102-8, 2001.

GRIPP, K.W.; STOLLE, C.A.; CELLE, L.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; WHITAKER, L.A.; ZACKAI, E.H. -*TWIST* gene mutation in a patient with radial aplasia and craniosynostosis: further evidence for heterogeneity of Baller-Gerold syndrome. **Am J Med Genet.** v. 82, n.2, p.170-6, 1999.

HALL, J.G; FROSTER-ISKENIUS, U.G.; ALLANSON, J.E. **Handbook of Normal Physical Measurements.** Oxford University Press, New York, 1989.

HAMAMORI, Y.; SARTORELLI, V.; OGRYZKO, V.; PURI, P. L.; WU, H.-Y.; WANG, J. Y. J.; NAKATANI, Y.; KEDES, L. -Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein Twist and adenoviral oncoprotein E1A. **Cell.** v.96, p. 405-413, 1999.

HAYASHI, K.- In **PCR** . Eds. Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. Birkhauser. Boston, 1994.

HOMERO. **Ilíada (em Versos)**. p. 83-84.Tradução em versos de Carlos Alberto Nunes. Ediouro, Rio de Janeiro, 2001.

HOWARD, T.D.; PAZNEKAS, W.; GREEN, E.D.; et al. -Mutations in *TWIST* gene in the Saethre-Chotzen syndrome. **Nat Genet.** v.15, p. 36-41, 1997.

JOHNSON, D.; HORSLEY, S.W.; MOLONEY, D.M.; OLDRIDGE, M.; et al. -A comprehensive screen for *TWIST* mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. **Am J Hum Genet.** v. 63, n. 5, 1282-1293, 1998.

KEOHAVONG, P.; TJACOBS, G.; TSCHOLL, E.; SEK, A.; PFREUNDSCHUH, M.; DAUS, H.; TRUMPER, L. -Enrichment polymerase chain reaction for the detection of Ki-ras mutations: relevance of Taq polymerase error rate, initial DNA copy number, and reaction conditions on the emergence of false-positive mutant bands. **J Cancer Res Clin Oncol.** v.125, n.7, p.395-401, 1999.

KIM, H.J.; RICE, D.P.C.; KETTUNEN, P.J.; THESLEFF, I. -FGF-, BMP- and Shh-mediated signaling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. **Development.** v. 125, p.1241-1251, 1998.

KLINT, P. & CLAEISSON-WELSH, L. -Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. **Front Biosci.** v.4, p.165-177, 1999.

KOPYSC, Z.; STANSKA, M.; RYZKO, J.; KULCZYK, B. -The Saethre-Chotzen syndrome with partial bifid of the distal phalanges of the great toes. Observations of three cases in one family. **Hum Genet.** v.56, n. 2, p.195-204, 1980.

KREBS, I.; WEIS, I.; HUDLER, M.; et al. -Translocation breakpoint maps 5 kb 3' from *TWIST* in a patient affected with Saethre-Chotzen syndrome. **Hum Mol Genet.** v. 6, p. 1079-1086, 1997.

KUNZ, J.; HUDLER, M.; FRITZ, B. -Identification of a frameshift mutation in the gene *TWIST* in a family affected with Robinow-Sorauf syndrome. **J Med Genet.** v. 36, p.650-2, 1999.

LEWANDA, A.F.; COHEN, Jr M.M.; JACKSON, C.E.; et al. -Genetic heterogeneity among craniosynostosis syndromes: mapping the Saethre-Chotzen locus between D7S513 and D7S516 and exclusion of Jackson Weiss and Crouzon syndrome loci from 7p. **Genomics**. v. 19, p. 228-232, 1994.

LEWIN, B. - **Genes VII**. p.621-622. Artmed, Porto Alegre, 2001.

LOEWEN, P.C. & SWITALA, J. -Template secondary structure can increase the error frequency of the DNA polymerase from *Thermus aquaticus*. **Gene**. v.164, n.1, p. 59-63, 1995.

MA, H.W.; LAJEUNIE, E.; PARSEVAL, N.; MUNNICH, A.; RENIER, D.; LE MERRER, M. -Possible genetic heterogeneity in the saethre-Chotzen syndrome. **Hum. Genet**. v.98, p. 228-232, 1996.

MALCOLM, S.; ROSE, C.P.S.; VAN HERWERDEN, L.; REARDON, W.; BRUETON, L.; WEISSENBAACH, J.; et al. -Mapping of Saethre-Chotzen syndrome (ACS III) to 7p21. **Am. J. Hum. Genet**. v.53, p. 136, 1993.

McEWEN, D.G.; GREEN, R.P.; NASKI, M.C.; TOWLER, D.A.; ORNITZ, D.M. - Fibroblast growth factor receptor 3 gene transcription is suppressed by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. Identification of a chondrocytic regulatory element. **J Biol Chem**. v.274, n. 43, p. 30934-42,1999.

MENKES, J. H. -**Tratado de Neuropediatria**. p.191-193. 2ª edição. Manole, São Paulo, 1984.

MERINO, R.; RODRIGUEZ-LEON, J.; MACIAS, D.; GAÑAN, Y.; ECONOMIDES, A.N.; HURLE, J.M. -The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. **Development**. v. 126, p. 5515-5522, 1999.

MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. p. 330-344. 5ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

MUENKE, M. & SCHELL, U. -Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. **TIG**. v.11, n. 8, p. 308-313, 1995.

NASKI, M.C. & ORNITZ, D.M. -FGF signaling in skeletal development. **Front Biosci**. v. 3, p. 781-94, 1998.

NELLHAUS, G. -Head circumference from birth to eighteen years. Practical composite international and interracial graphs. **Pediatrics**. v. 41. n.1. p. 106-14, 1968.

OPPERMAN, L.A. -Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. **Dev Dyn**. v. 219, n. 4, p.472-85, 2000.

PARK, W.J.; BELLUS, G.; JABS, E.W. - Mutations in fibroblast growth factor receptors: Phenotypic consequences during eukaryotic development. **Amer. J. Hum. Genet**. v.57, p. 748 – 754, 1995.

PASSOS-BUENO, M.R.; WILCOX, W.R.; JABS, E.W.; SERTIE, A.L.; ALONSO, L.G.; KITO, H. -Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. **Hum Mutat**. v.14, p.115-125, 1999.

PATEL, P.H.; KAWATE, H.; ADMAN, E.; ASHBACH, M.; LOEB, L.A. -A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for dna polymerase fidelity. **J Biol Chem**. v.276, n.7, p.5044-51, 2001.

PAZNEKAS, W.A.; CUNNINGHAM, M.L.; HOWARD, T.D.; et al. -Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. **Am J Hum Gen**. v.62 n.6, p.1370-1380, 1998.

RAFFIONI, S.; ZHU, Y.Z.; BRADSHAW, R.A.; THOMPSON, L.M. -Effect of transmembrane and kinase domain mutations on fibroblast growth factor receptor 3 chimera signaling in PC12 cells. A model for the control of receptor tyrosine kinase activation. **J Biol Chem.** v. 273, n.52, p. 35250-9, 1998.

REARDON, W. & WINTER, R.M. -Saethre-Chotzen syndrome. **J. Med. Genet.** v.31, p. 393-396, 1994.

REARDON, W.; WILKES, D.; et al. -Craniosynostosis associated with FGFR3 pro250arg mutation results in a range of clinical presentations including unsutural sporadic craniosynostosis. **J Med Genet.** v. 34, n.8, p. 632-6, 1997.

REID, C.S.; MCMORROW, L.E.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; GRACE, K.J.; RAMOS, F.J.; ZACKAI, E.H.; et al. -Saethre-Chotzen syndrome with familial translocation at chromosome 7p22. **Am J Med Genet.** v.47, n.5, p.637-639, 1993.

Resolução Normativa do Conselho Nacional Saúde 196/96.

RICE, D.P.; ABERG, T.; et al. -Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. **Development,** v.127, p.9, p.1845-55, 2000.

ROBIN, N.H. -Molecular genetic advances in understanding craniosynostosis. **Plastic and Reconstructive Surgery,** v.103, n.3, p. 1060-1070, 1999.

ROSANO, A.; BOTTO, L.D.; OLNEY, R.S.; KHOURY, M.J.; RITVANEN, A.; GOJJARD, J.; et al. -Limb defects associated with major congenital anomalies: clinical and epidemiological study from the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems. **Am J Med Genet.** v. 93, n.2, p.110-6, 2000.

ROSE, C.S.P.; KING, A.J.J.; SUMMERS, D.; et al. -Localization of the gene for Saethre-Chotzen syndrome by FISH using four cases with apparently balanced translocation at 7p21. **Hum Mol Genet.** v. 3, p. 1413-1418, 1994.

ROSE, C.S.P.; PATEL, P.; REARDON, W.; et al. -The TWIST gene, although not disrupted in Saethre-Chotzen patients with apparently balanced translocations of 7p21, is muted in familial and sporadic cases. **Hum Mol Genet.** v. 6, p.1369-1373, 1997.

SAETHRE, H. -Ein Beitrag zum Turmschädelproblem (Pathogenese, Erbllichkeit und Symptomatologie). **Dtsch. Z. Nervenheilk.** v. 119, p. 533-555, 1931.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. -**Molecular cloning – A Laboratory Manual**; 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1989

SHISHIDO, E.; HIGASHIJIMA, S.; EMORI, Y.; SAIGO, K. -Two FGF-receptor homologues of Drosophila: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. **Development.** v. 117, p. 751-761, 1993.

SMITH, D.W. **Síndromes de Malformações Congênicas**. 3^a edição. Manole, São Paulo, p.588-606,1989.

SPIVAK-KROIZMAN, T.; LEMMON, M.A.; DIKIC, I.; LADBURY, J.E.; PINCHASI, D.; HUANG, J.;JAYE, M.; CRUMLEY, G.; SCHLESSINGER, J.; LAX, I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. **Cell.** v.79, n.6, p.1015-24, 1994.

STRUHL, K. - Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. **Genes Dev.** v.12, p. 599-606, 1998.

TANNER, J.M.; WHITEHOUSE, R.H. -Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. **Arch Dis Child.** v.51.n.3.p.170-9,1976.

THISSE, B.; STOETZEL, C; GOROSTIZA-THISSE, C.; PERRIN-SCHMITT, F. - Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. **EMBO J.** v. 7, n. 7, p. 2175-2183, 1988.

TOSAKA, A.; OGAWA, M.; YOSHIDA, S.; SUZUKI, M. -O-helix mutant T664P of thermus aquaticus DNA polymerase I: altered catalytic properties for incorporation of incorrect but not correct nucleotides. **J Biol Chem.** v.276.n.29. p. 27562-7, 2001.

TSUJI, K.; NARAHARA, K.; YOKOYAMA, Y.; GRZESCHIK, K.-H.; KUNZ, J.-The breakpoint on 7p in a patient with t(6;7) and craniosynostosis is spanned by a YAC clone containing the D7S503 locus. **Hum. Genet.** v. 95. p. 303-307, 1995.

van HERWERDEN, L.; ROSE, C.S.P.; REARDON, W.; et al. -Localization of the gene for Saethre-Chotzen syndrome by FISH using four cases with apparently balanced translocations at 7p2.1. **Hum Mol Genet.** v. 3, p. 1413-1418. 1994.

WESTON, A.D.; ROSEN, V.; CHANDRARATNA, R.A.; UNDERHILL, T.M. - Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways. **J Cell Biol.** v. 148,n. 4, p. 679-90, 2000.

WILKIE, A.O.M. -Craniosynostosis: genes and mechanisms. **Hum Mol Gen.** v.6, n.10, p.1647-1656,1997.

WILKIE, A.O.M.; YANG, S.P.; SUMMER, D.; POOLE, M.D.; REARDON, W.; WINTER, R.M. -Saethre-Chotzen syndrome associated with balanced

translocations involving 7p21: three further families. **J Med Genet.** v. 32, p.174-180, 1995.

WOLF, C.; THISSE, C.; STOETZEL, C.; THISSE, B.; GERLINGER, P.; PERRIN-SCHMITT, F.-The M-twist gene of Mus is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the Xenopus X-twi and the Drosophila twist genes. **Dev Biol.** v.143,n. 2, p. 363-373, 1991.

YOUSFI, M.; LASMOLES, F.; LOMRI, A.; DELANNOY, P.; MARIE, P.J.-Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. **J Clin Invest.** v. 107, n. 9, p.1153-61, 2001.

ZACKAI, E.H. & STOLLE, C.A. -A new TWIST: some patients with Saethre-Chotzen syndrome have a microdeletion syndrome. **Am J Hum Genet.** v.63, p.1277-1281, 1998.

10. ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA PARA ESTUDO GENÉTICO

Data: ____/____/____

Família No

Registro no Hospital de Origem:

Nome do responsável :

Idade:

Parentesco:

R.G.:

Endereço e telefone para contato:

O CBMEG (Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP), o Departamento de Genética Clínica do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (Universidade de São Paulo - USP, Bauru) e o Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP) estão realizando um projeto para estudo molecular de pacientes com anomalias craniofaciais.

Assim, necessitamos de uma amostra do sangue do paciente para estudo genético.

Qualquer esclarecimento poderá ser solicitado aos responsáveis pelo projeto, Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes (telefone 019-788-8908) e Dra. Maria Leine Guion de Almeida (014-235-8138).

Autorizando a participação neste projeto de pesquisa, o responsável assinará esse termo de consentimento.

Responsável

ANEXO 2

FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO CLÍNICA DE PACIENTES COM SINAIS CLÍNICOS SUGESTIVOS DE SÍNDROME DE SAETHRE-CHOTZEN

Família nº: ____/____

REGISTRO: _____ HOSPITAL: _____

MÉDICO RESPONSÁVEL: _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

IDADE NA 1º CONSULTA: _____

SEXO: () M () F

RAÇA: () B () N () A () OUTRAS

NATURAL DE: _____

PROCEDENTE DE: _____

MÃE: G _____; P _____; C _____; A _____

HISTÓRIA CLÍNICA:

EXAME FÍSICO:

Estatura (cm)	Peso (kg)	PC (cm)	DBP (cm)	DAP (cm)	IC (Percentil)	DICE (cm)	DICI (cm)	DIP (cm)
Orelha D (cm)	Orelha E (cm)	Mão D (cm)	Dedo médio (cm)	Mão E (cm)	Dedo médio (cm)	Pé D (cm)	Pé E (cm)	

EXAMES COMPLEMENTARES

RAIO-X

CRÂNIO:

MÃOS:

PÉS:

COLUNA VERTEBRAL:

CT DE CRÂNIO:

US

HEREDOGRAMA (no mínimo 3 gerações)

Nº de Membros Afetados:

Nº de Membros

EXAME DISMORFOLÓGICO DIRIGIDO

1. Alterações cranianas	+	-
Craniosinostose:		
Descrever:		
2. Alterações faciais		
Assimetria facial		
Implantação baixa dos cabelos na fronte		
Hipoplasia maxilar		
Outras		
3. Alterações oculares		
Ptose palpebral		
Hipertelorismo		
Hipotelorismo		
Estrabismo		
Blefarofimose		
Fendas palpebrais oblíquas (para baixo)		
Estenose do canal lacrimal		
Outras		
4. Alterações nasais		
Desvio septo		
Ponte proeminente		
5. Alterações auriculares		
Orelhas: Acentuação do ramo da hélice Posterior angulação		
Implantação baixa		
Outras		
6. Alterações orais		
Palato ogival		
Palato estreito		
Má oclusão		
Anomalias dentárias		

7. Alterações em membros	+	-
Mãos: Sindactilia cutânea -Descrever:		
Clinodactilia -Descrever:		
Braquidactilia		
Polegar e/ou dedos alargados		
Alterações dermatoglíficas: prega única		
Outras		
Pés: Hálux valgo		
Alargamentos dos háluces () D () E		
Outras anomalias Descrever:		
Sindactilia Descrever:		
Articulações: Limitação da mobilidade articular; incapacidade para a extensão completa →		
8.Alterações neurológicas		
Deficiência mental		
Epilepsia		
Outras		
9. Outras alterações		

ANEXO 3

FOTOGRAFIAS

A autorização para a publicação da documentação
fotográfica foi obtida do paciente ou responsável.

FAMÍLIA 1

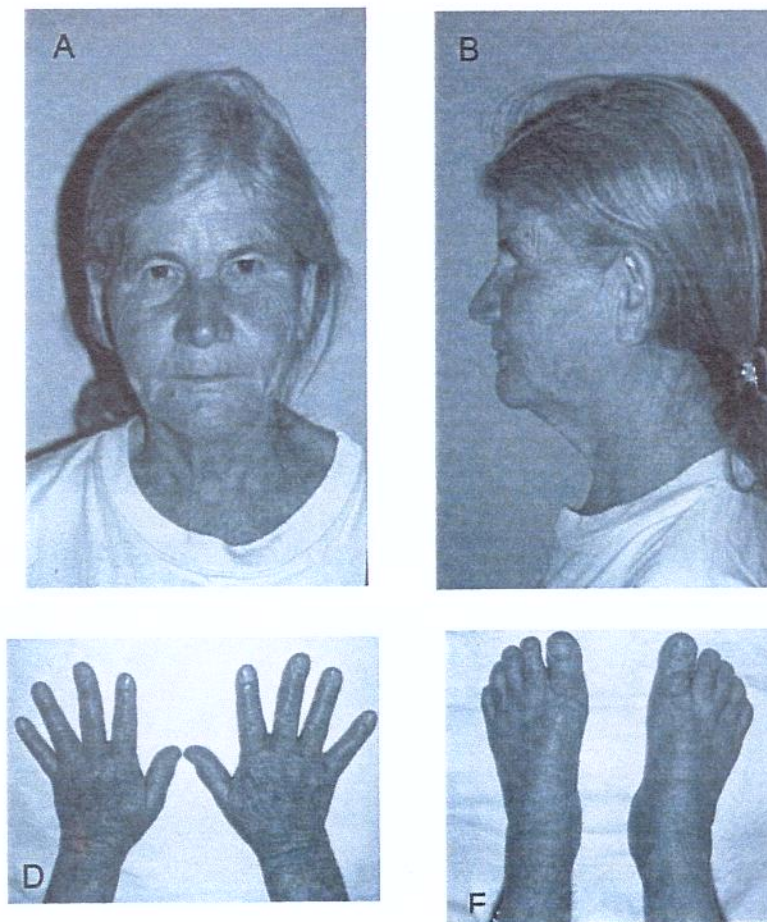


Figura 21 Fotografias do indivíduo II-2 da Família 1.

FAMÍLIA 1

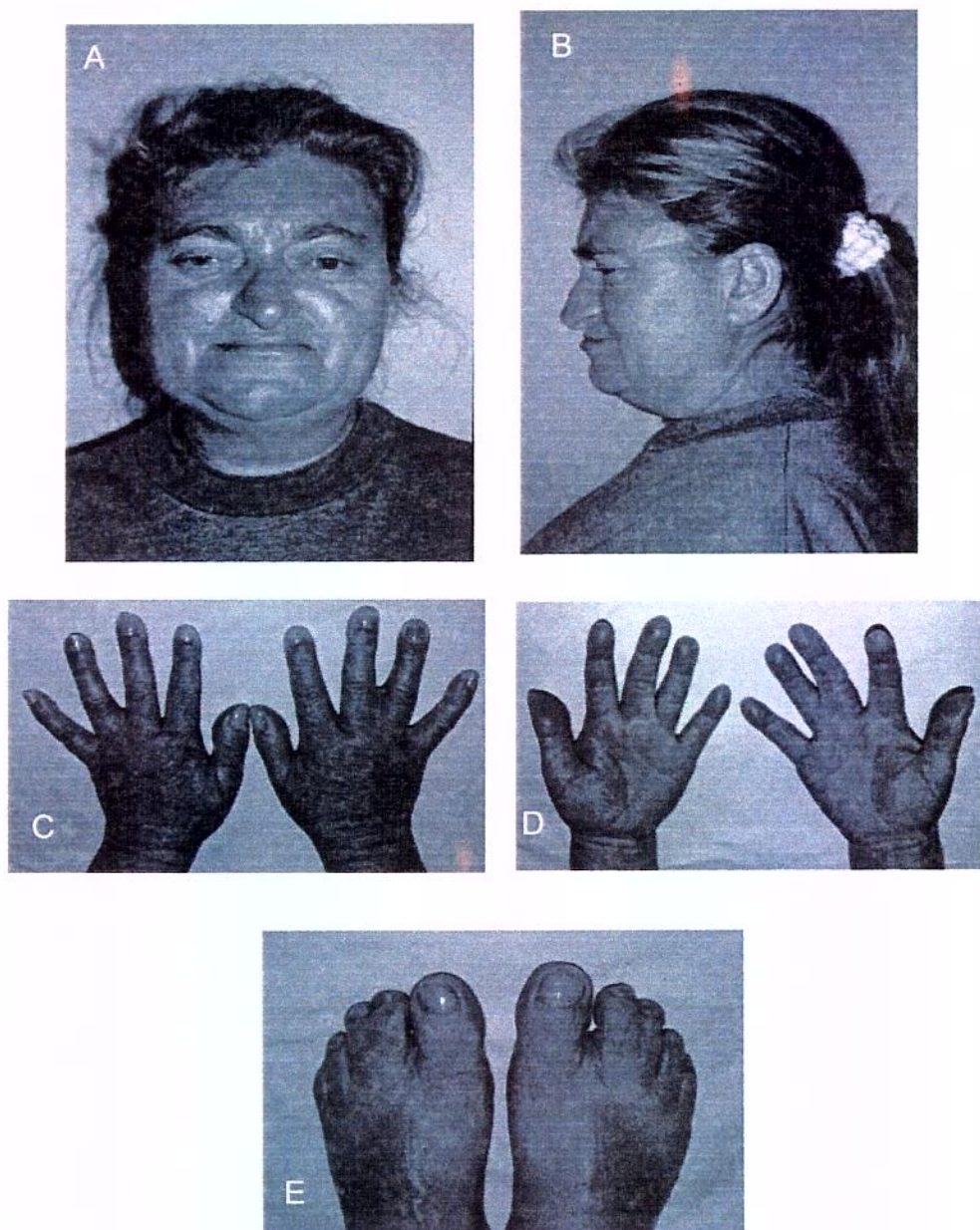


Figura 22 Fotografias do indivíduo III-1 da Família 1.

FAMÍLIA 1

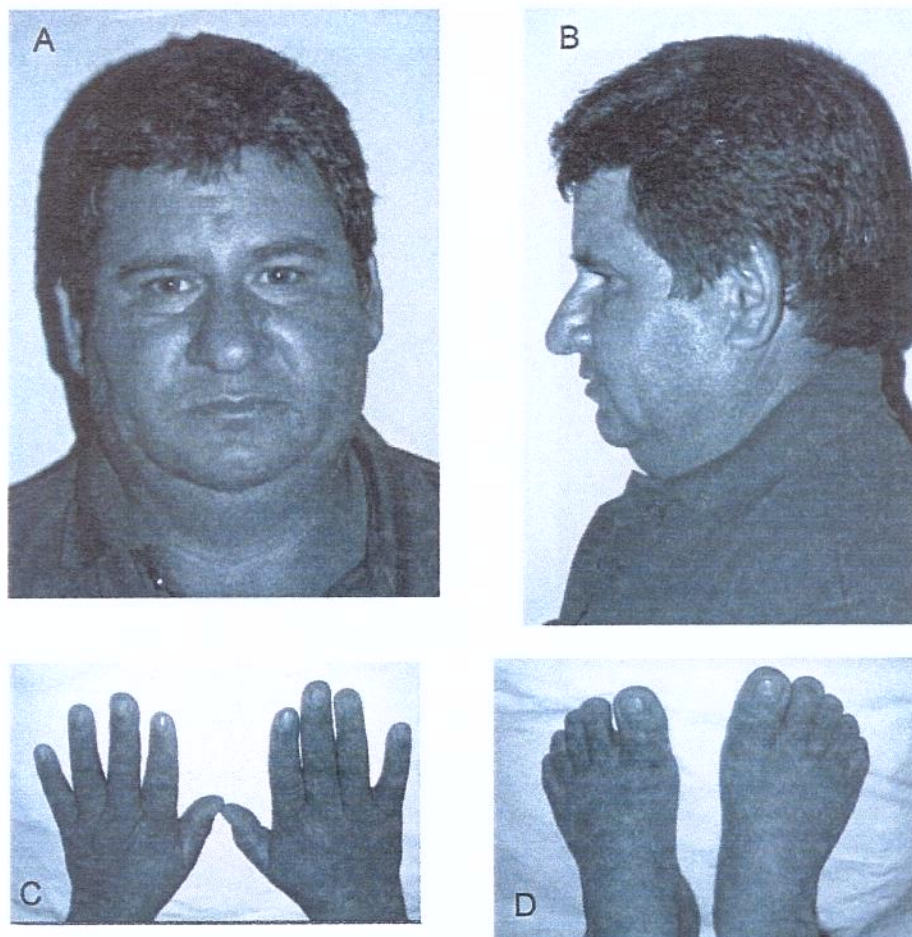


Figura 23 Fotografias do indivíduo III-2 da Família 1.

FAMÍLIA 1

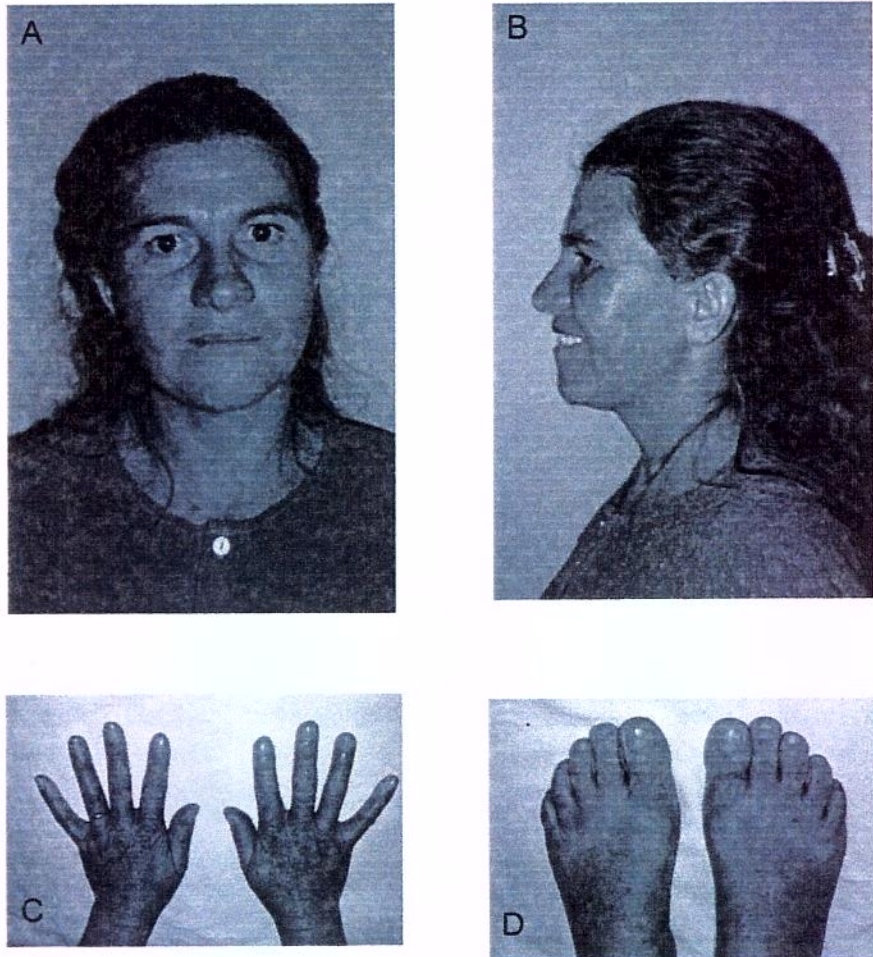


Figura 24 Fotografias do indivíduo III-3 da Família 1.

FAMÍLIA 1



Figura 25 Fotografias do indivíduo III-5 da Família 1.

FAMÍLIA 1

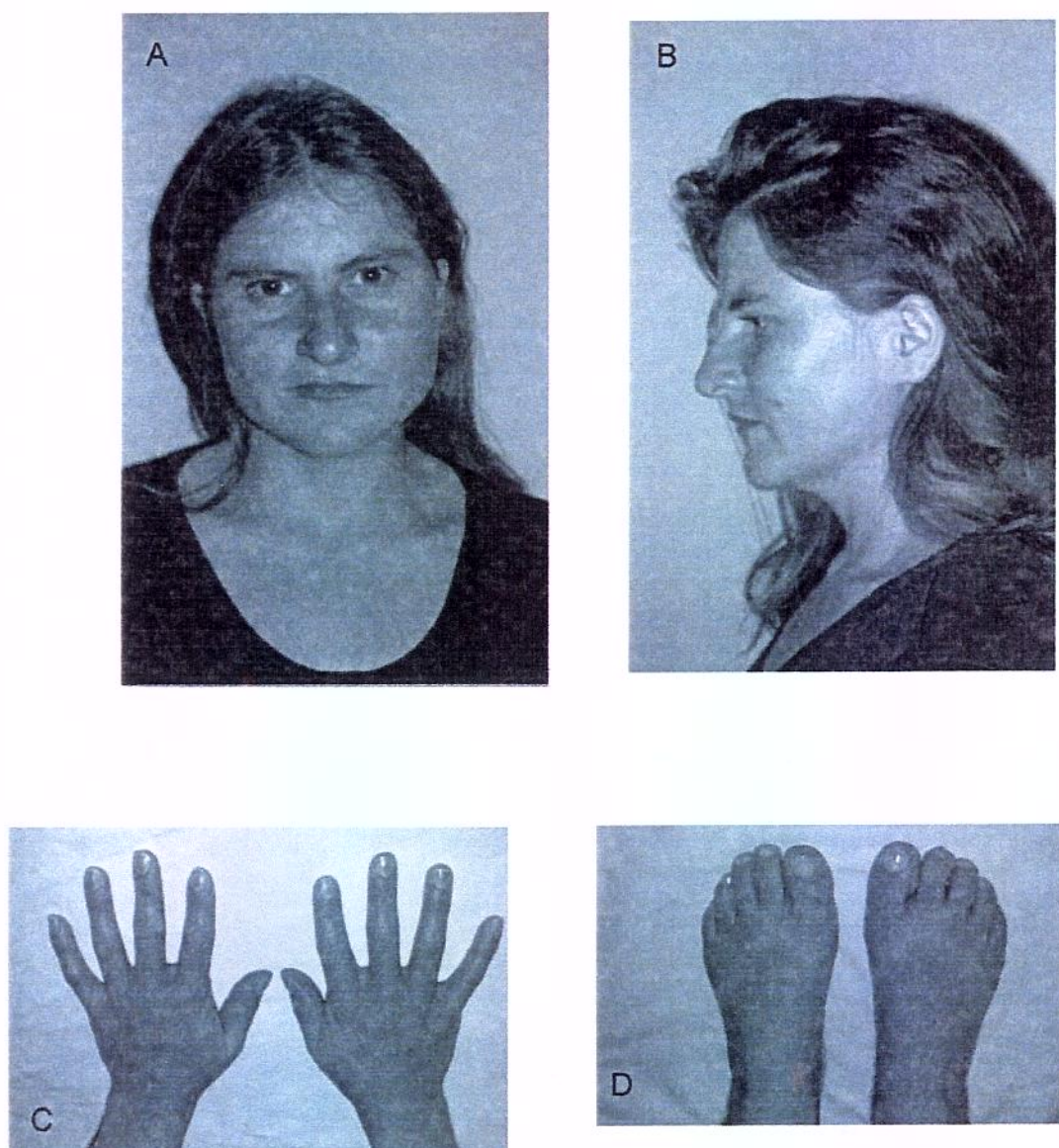


Figura 26 Fotografias do indivíduo III-8 da Família 1.

FAMÍLIA 1

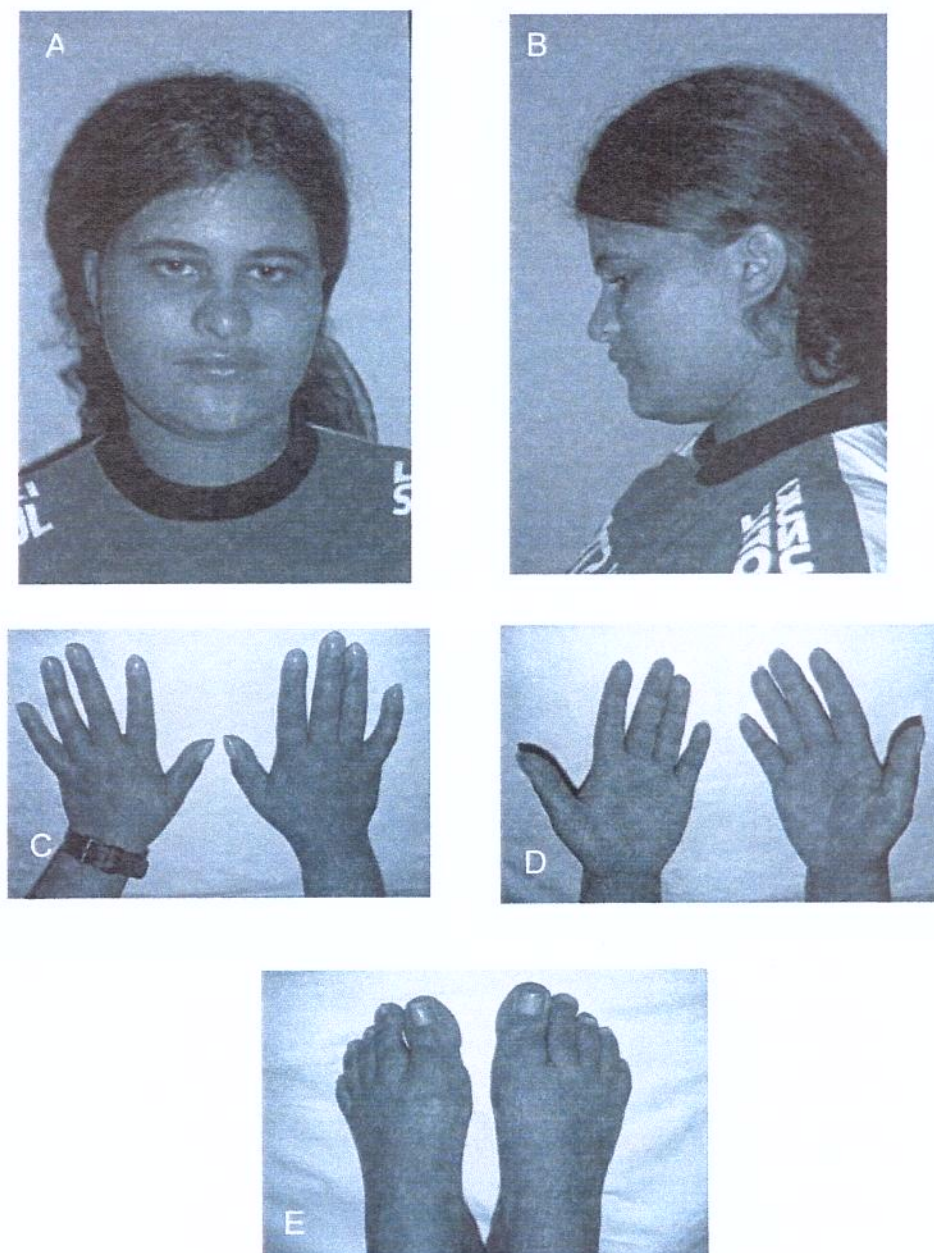


Figura 27 Fotografias do indivíduo IV-1 da Família 1.

FAMÍLIA 1

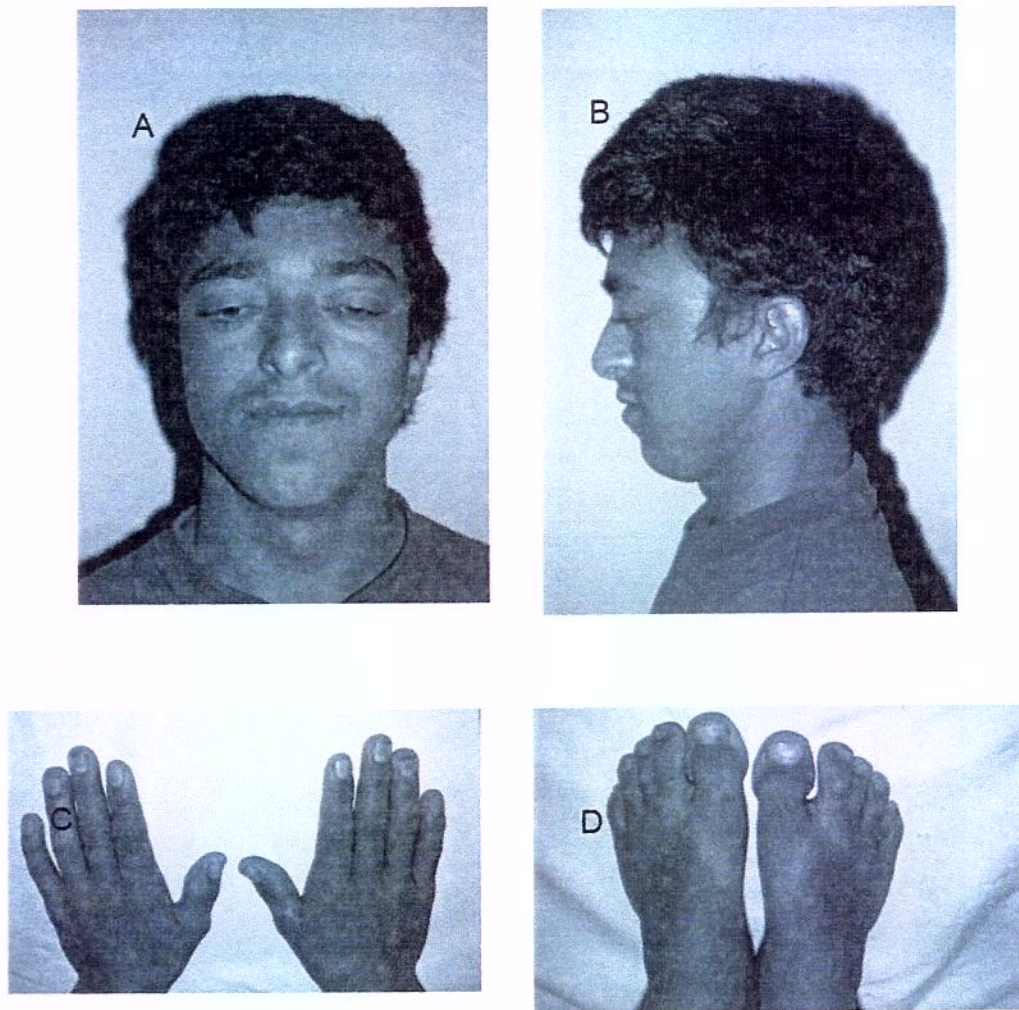


Figura 28 Fotografias do indivíduo IV-2 da Família 1.

FAMÍLIA 1

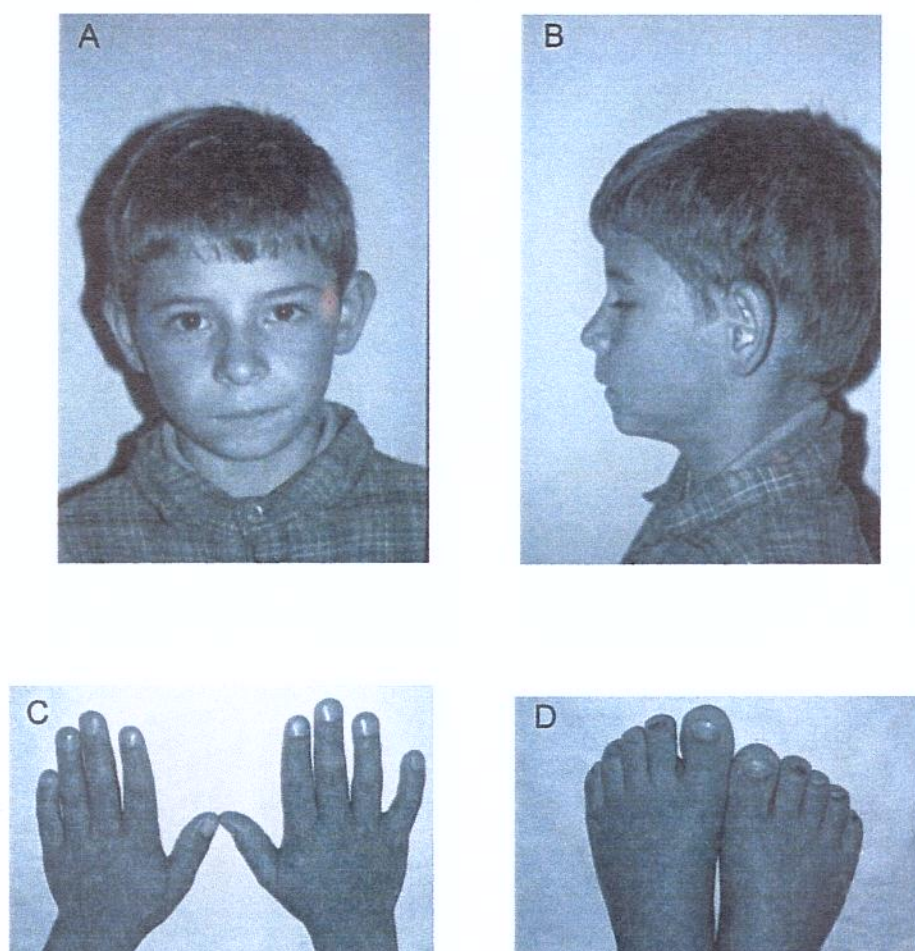


Figura 29 Fotografias do indivíduo IV-3 da Família 1.

FAMÍLIA 1

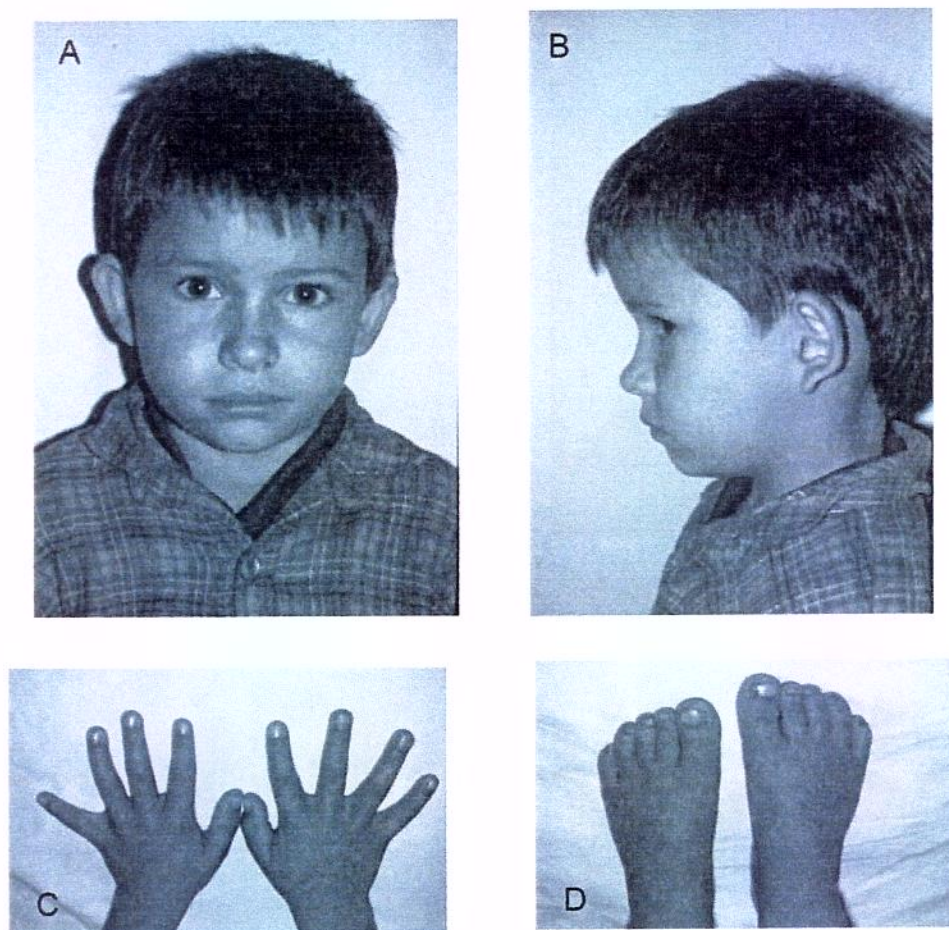


Figura 30 Fotografias do indivíduo IV-4 da Família 1.

FAMÍLIA 1

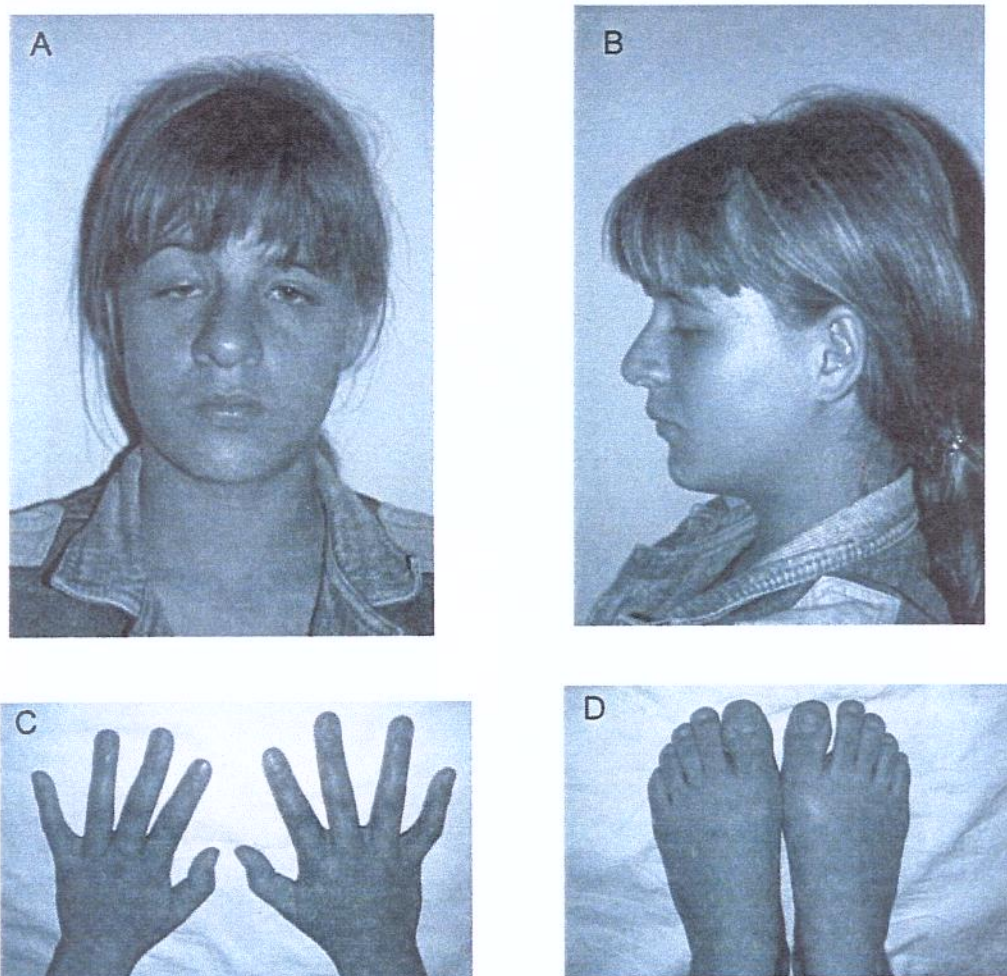


Figura 31 Fotografias do indivíduo IV-5 da Família 1.

FAMÍLIA 1

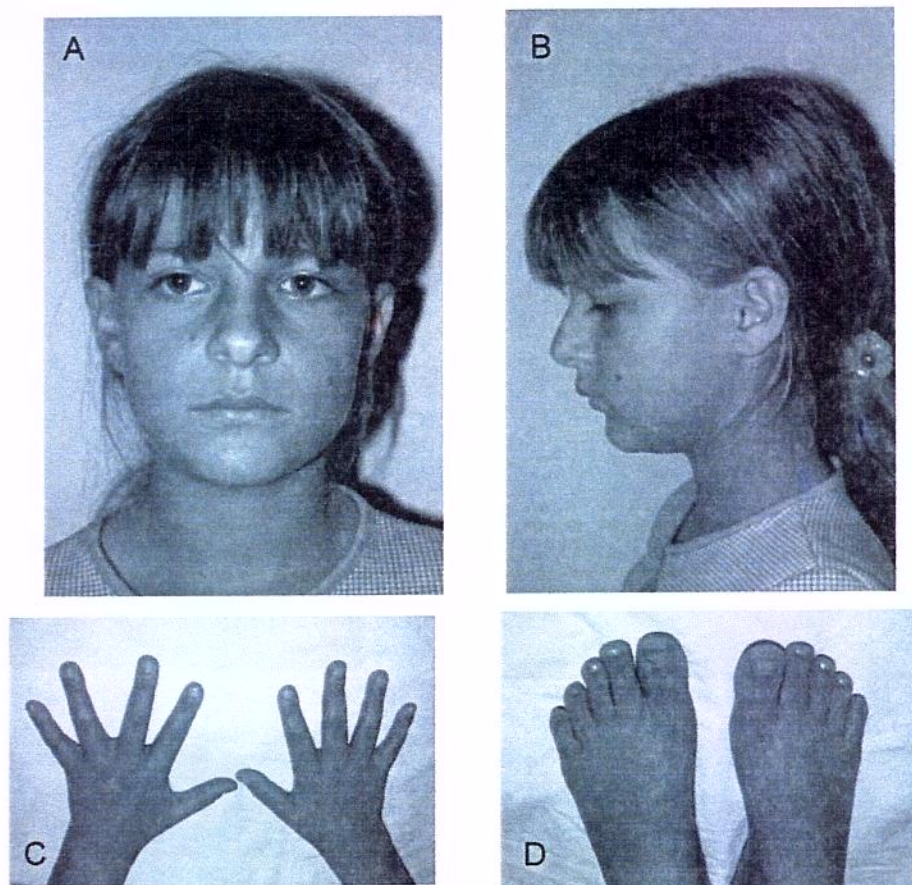


Figura 32 Fotografias do indivíduo IV-7 da Família 1.

FAMÍLIA 1

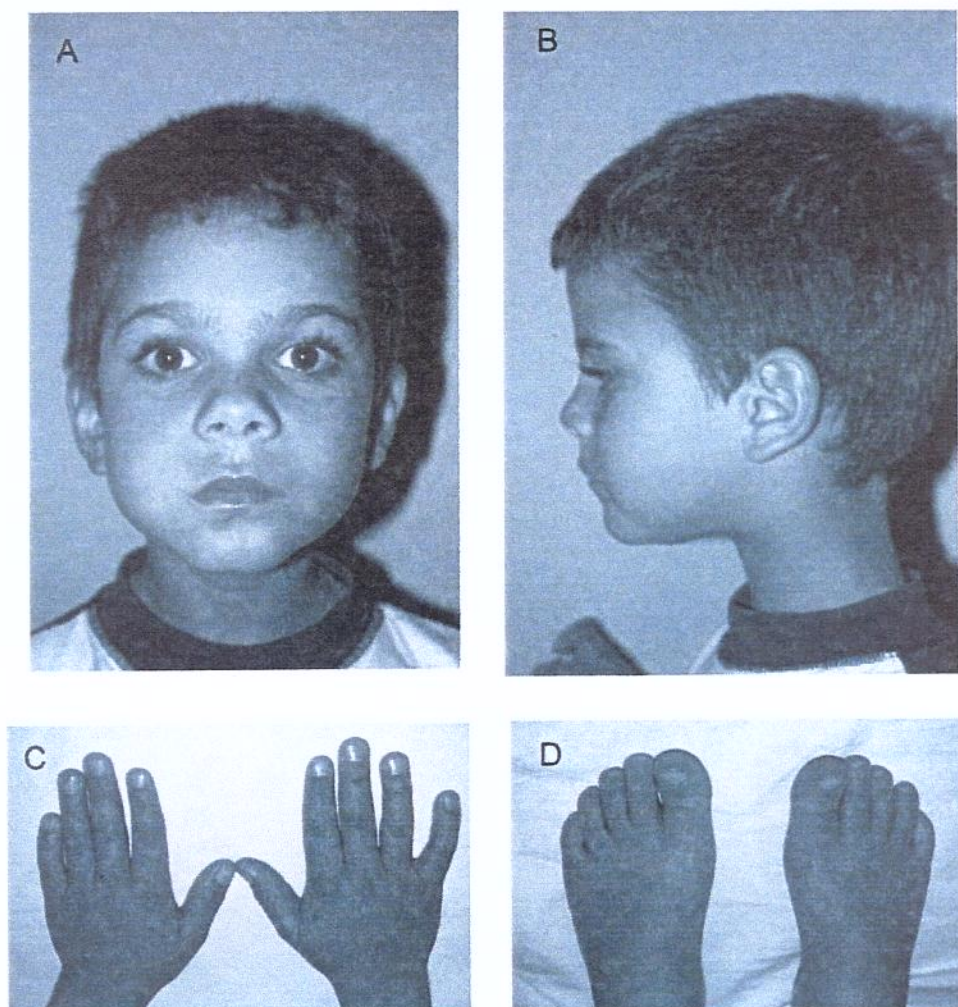


Figura 33 Fotografias do indivíduo IV-8 da Família 1.

FAMÍLIA 1

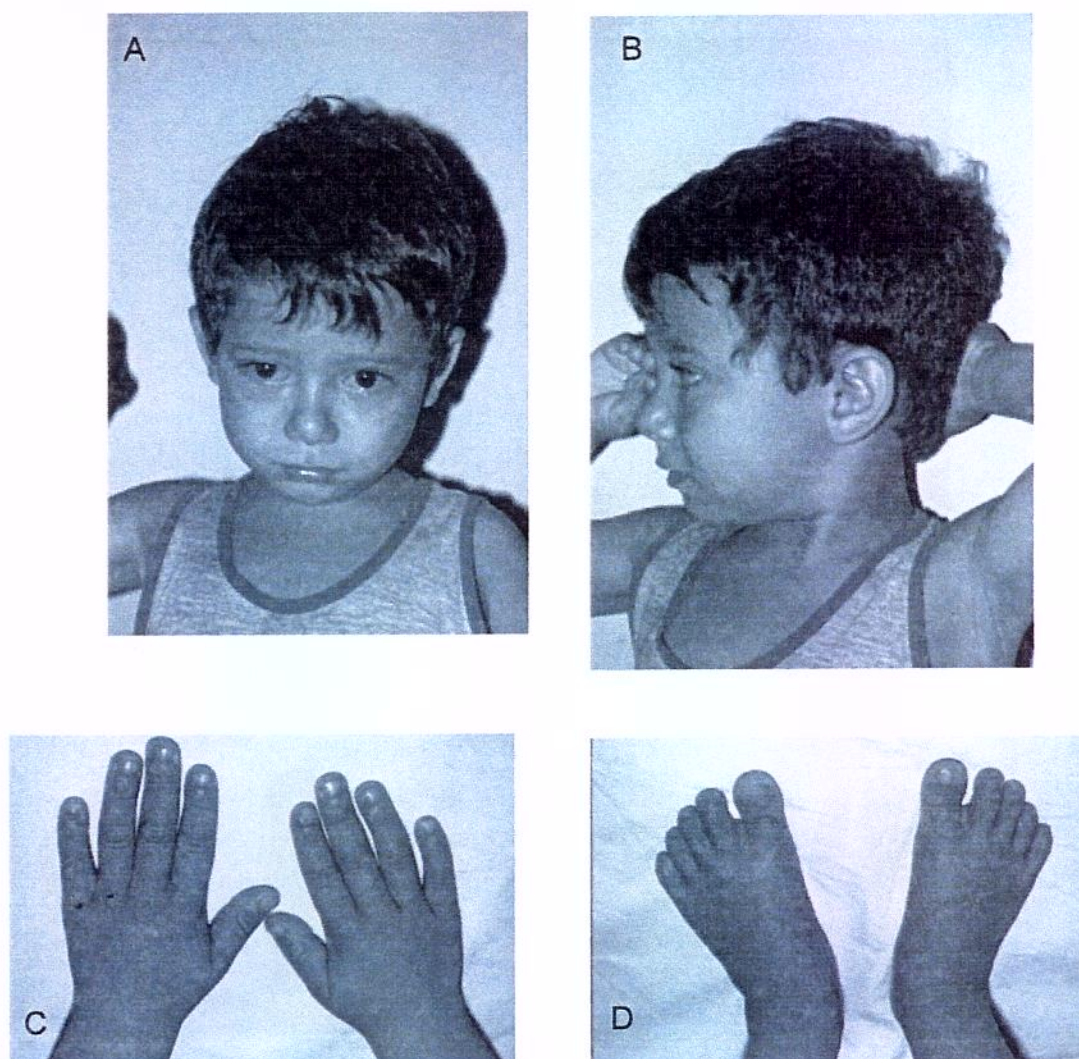


Figura 34 Fotografias do indivíduo IV-9 da Família 1.

FAMÍLIA 2

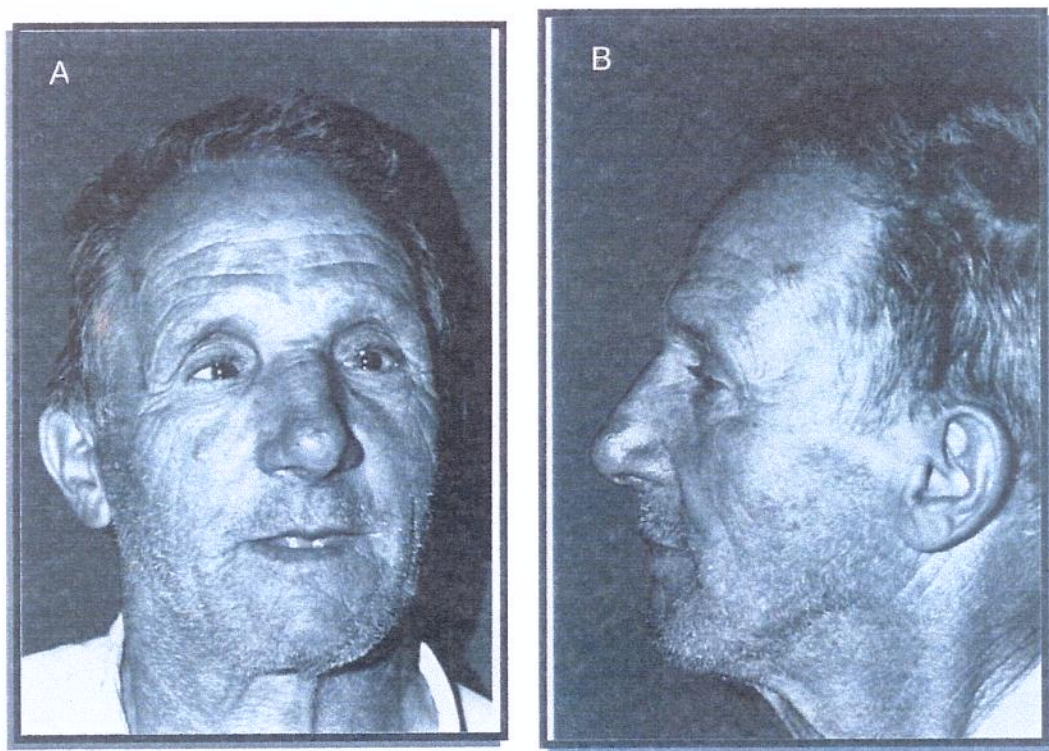


Figura 35 Fotografias do indivíduo II-1 da Família 2.

FAMÍLIA 2

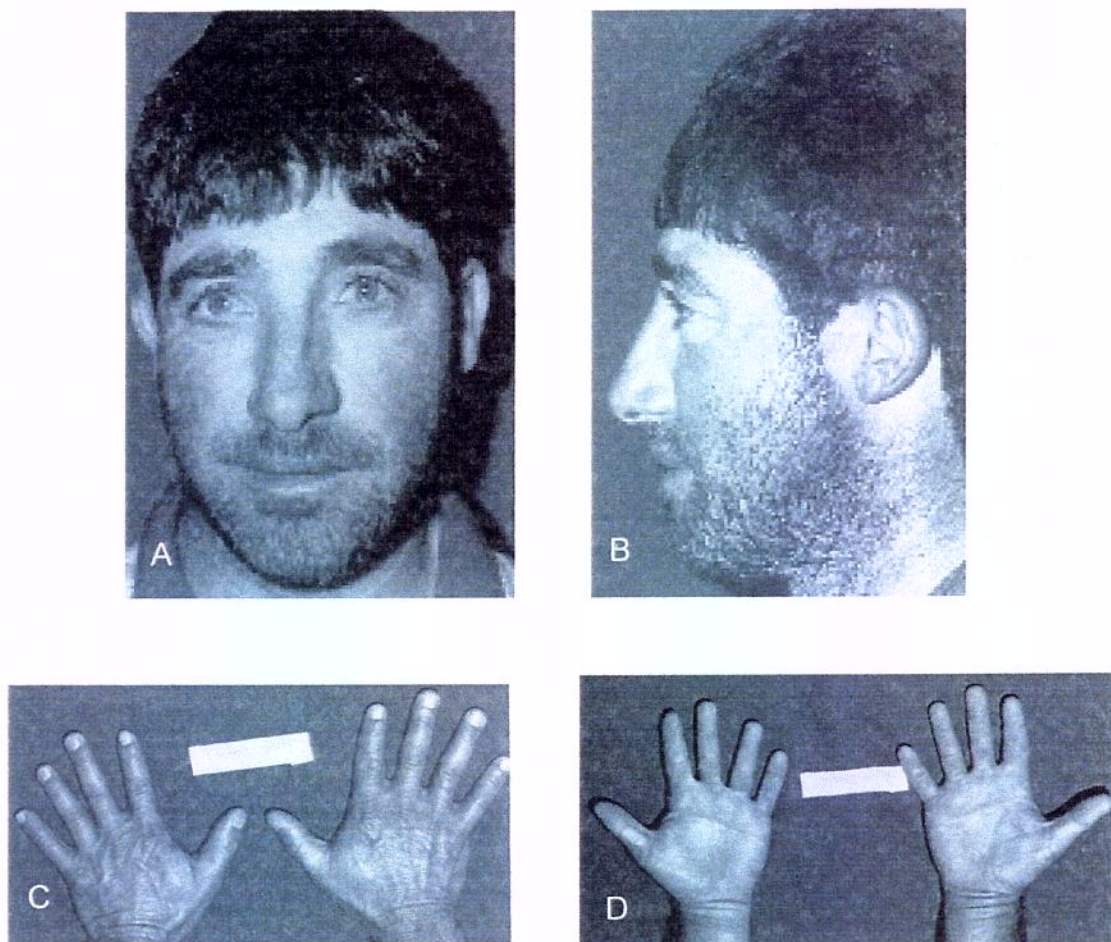


Figura 36 Fotografias do indivíduo III-8 da Família 2.

FAMÍLIA 2

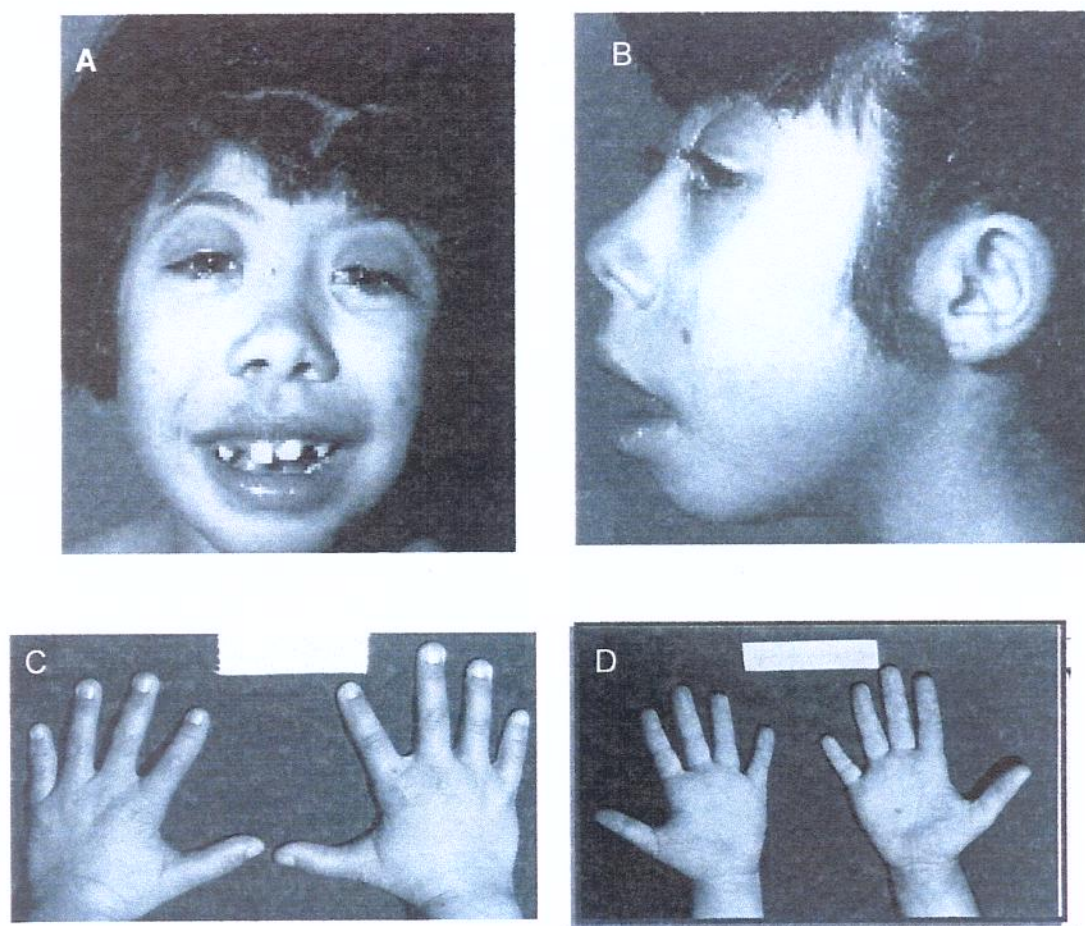


Figura 37 Fotografias do indivíduo IV-5 da Família 2.

FAMÍLIA 2

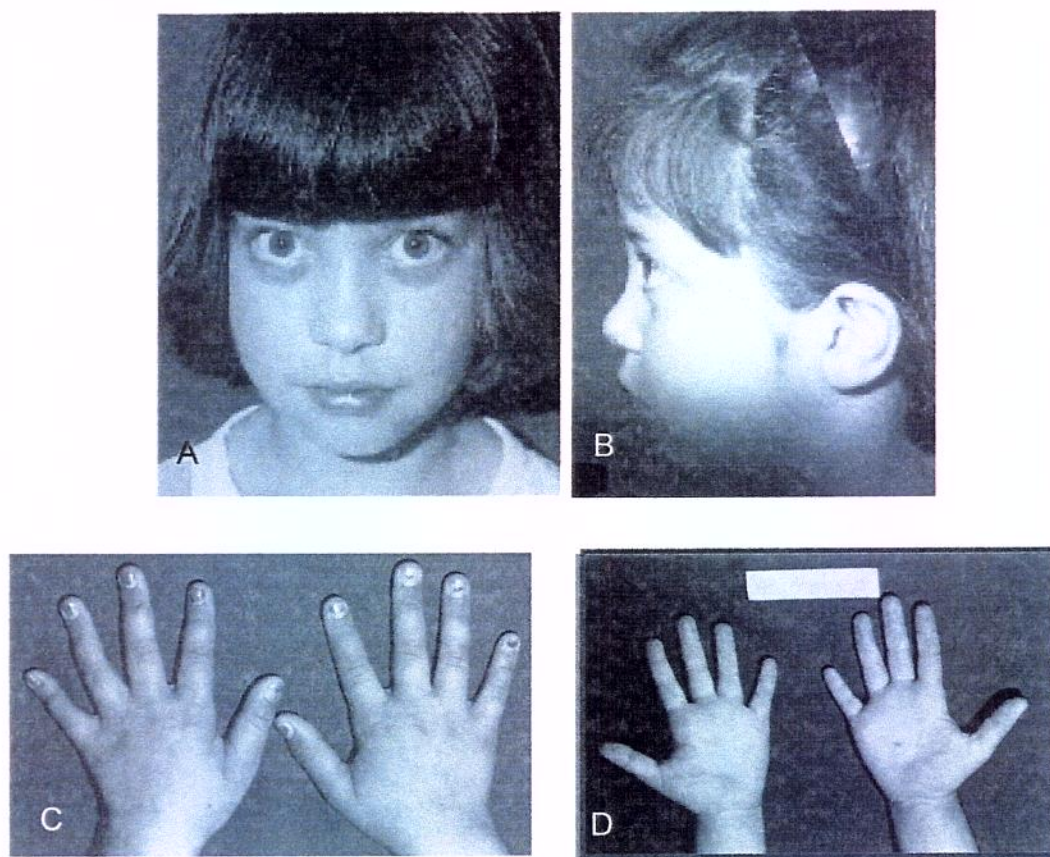


Figura 38 Fotografias do indivíduo IV-6 da Família 2.

FAMÍLIA 2

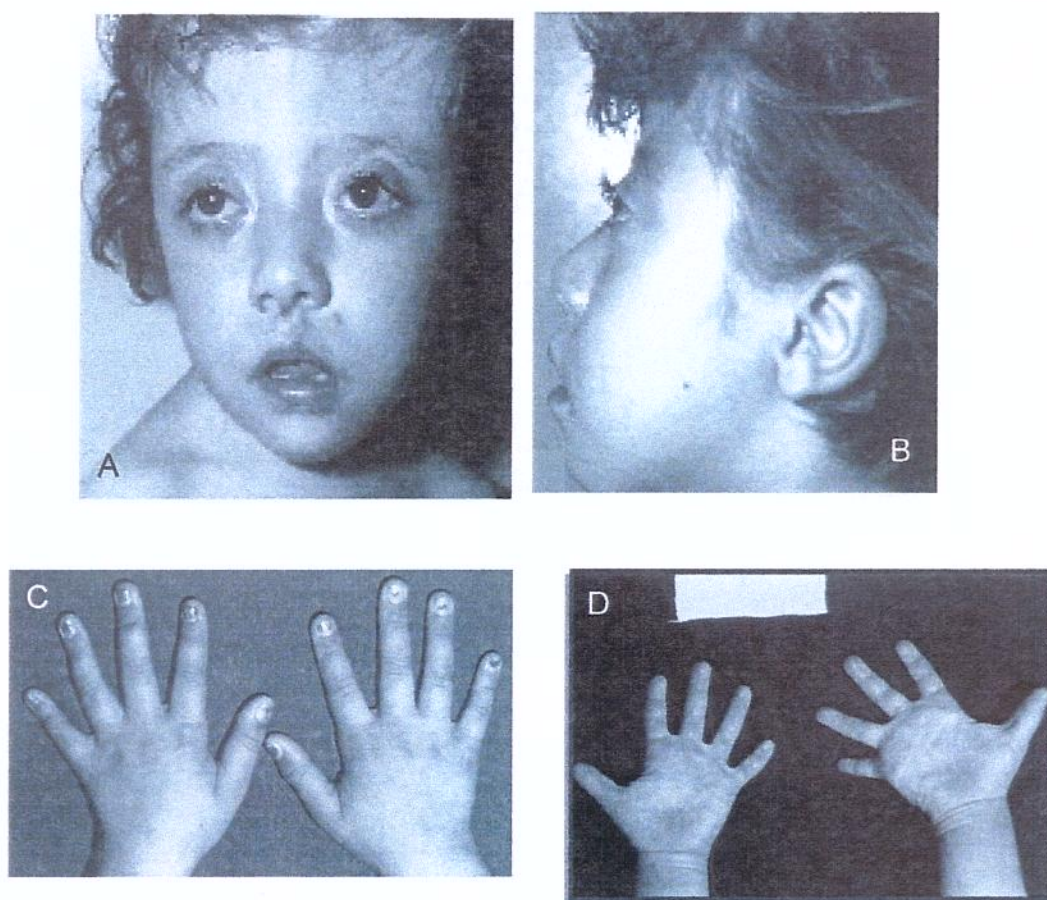


Figura 39 Fotografias do indivíduo IV-7 da Família 2.

FAMÍLIA 2



Figura 40 Fotografias do indivíduo IV-8 da Família 2.

FAMÍLIA 3

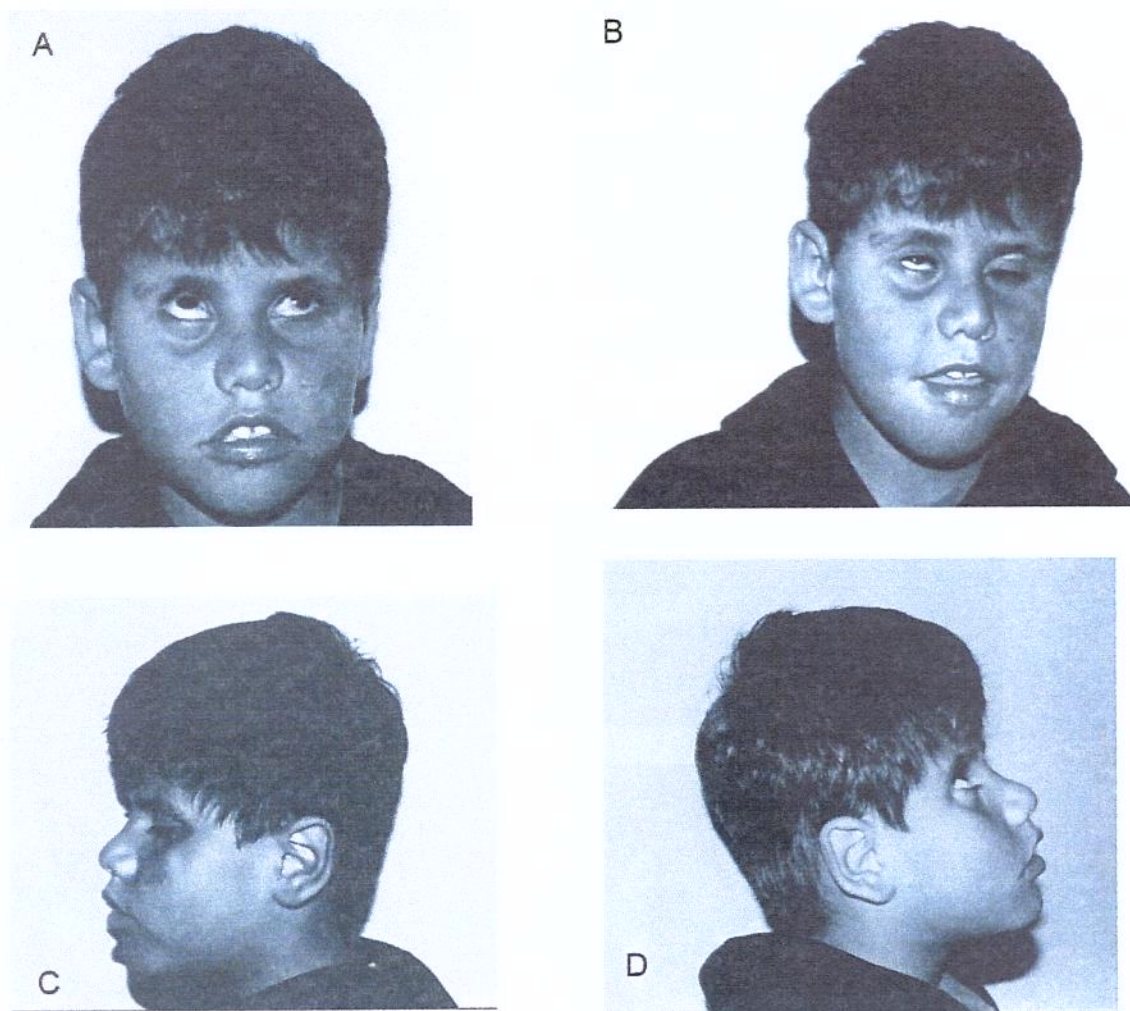


Figura 41 Fotografias do indivíduo III-2 da Família 3.

FAMÍLIA 4



Figura 42 Fotografias do indivíduo III-1 da Família 4.

ANEXO 4

Gráfico 1 Gráfico de desenvolvimento pôndero-estatural para sexo feminino

Ref: Tanner & WI **Gráficos de Desenvolvimento**
Pondero-Estatural (1 - 20 anos)

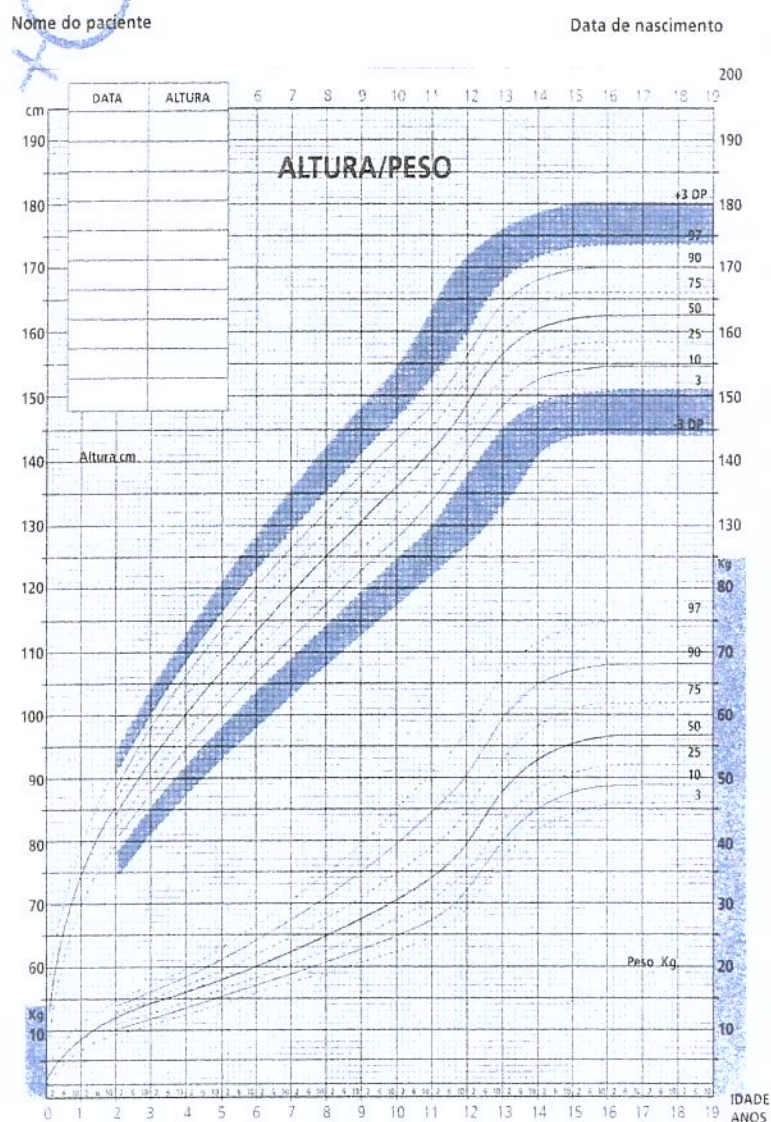


Gráfico 2 Gráfico de desenvolvimento pômdero-estatural para sexo masculino

Ref: Tanner & Whitehouse, 1976.

Gráficos de Desenvolvimento
Pômdero-Estatural (1 - 20 anos)

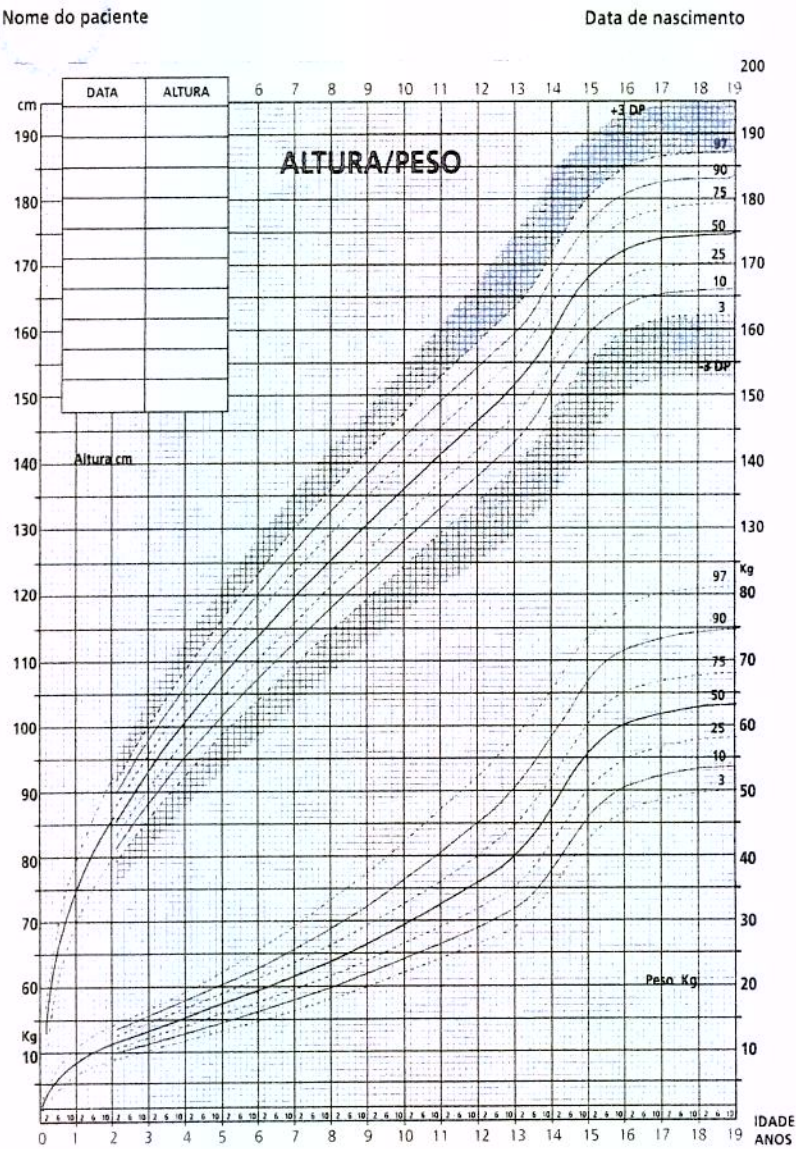


Gráfico 3 Gráficos de desenvolvimento do perímetro cefálico para sexo feminino e masculino

Ref: Nellhaus, 1968.

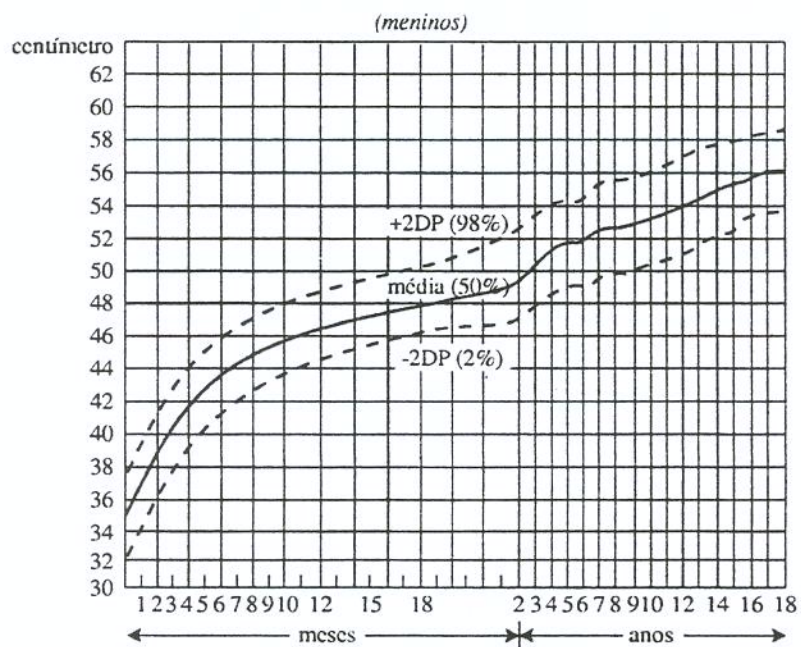
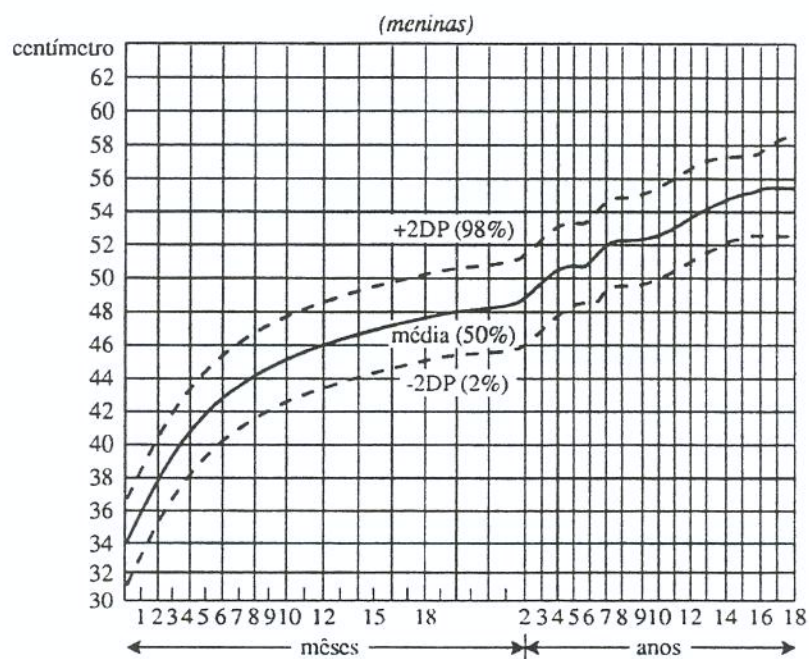


Gráfico 4 Gráficos da distância intercantal externa dos olhos -DICE, distância intercantal interna dos olhos -DICI e distância interpupilar – DIP (para ambos os sexos)

Ref: Feingold & Bossert, 1974.

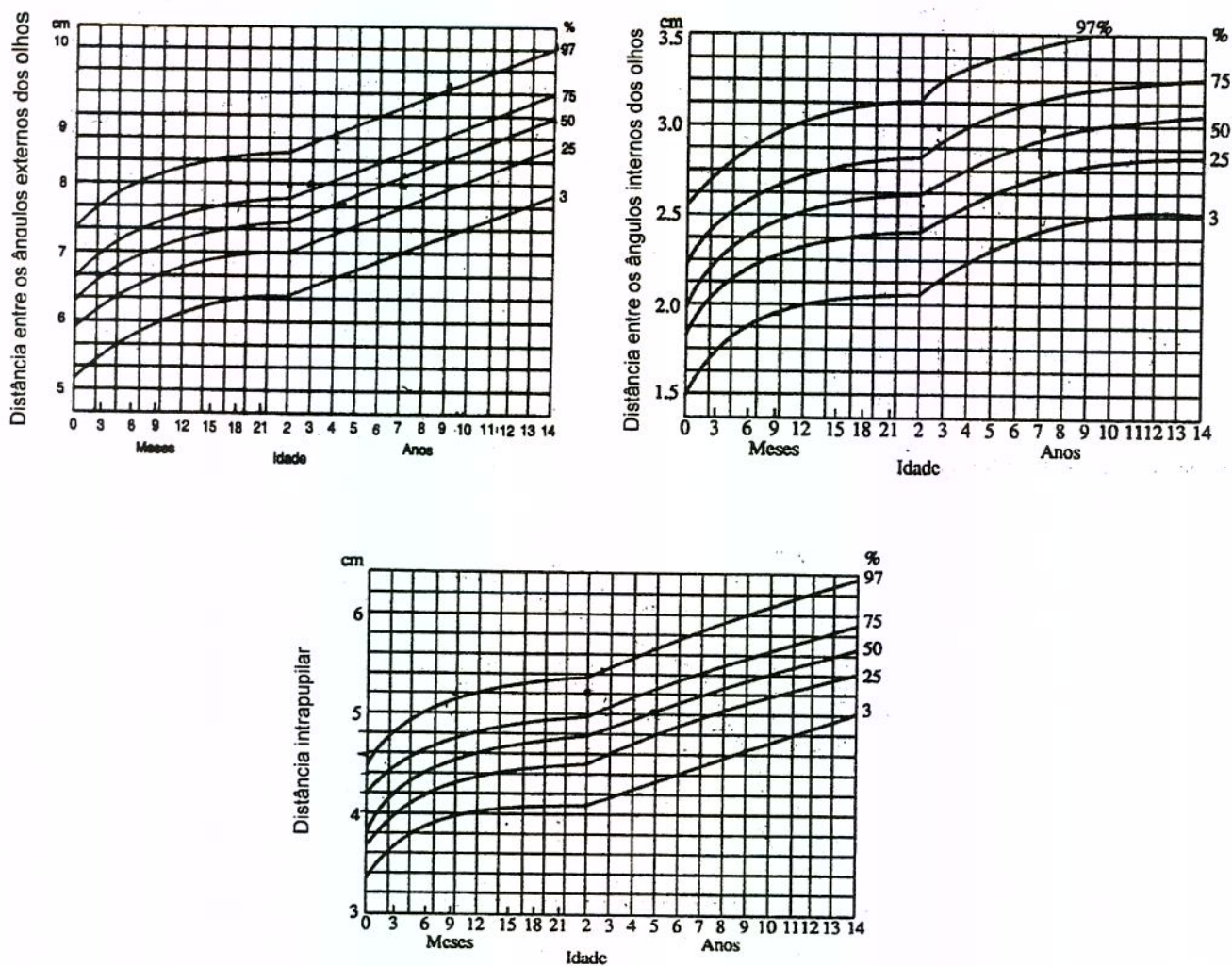


Gráfico 5 Gráficos de comprimento da mão (palma), dedo médio e relação dedo médio/mão total (para ambos os sexos)

Ref: Feingold & Bossert, 1974.

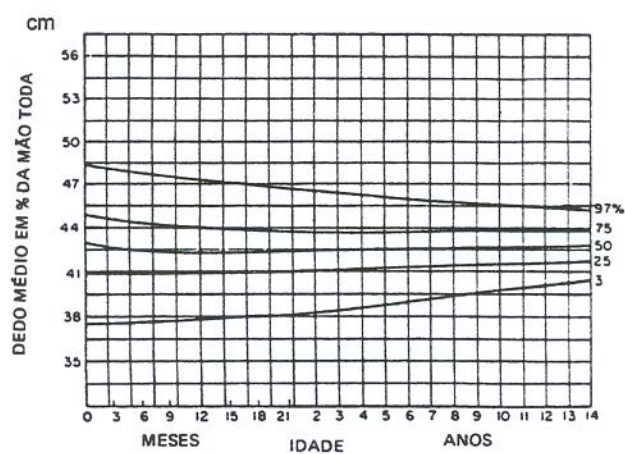
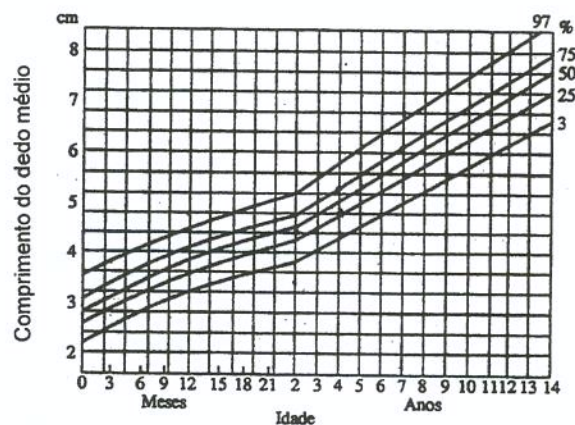
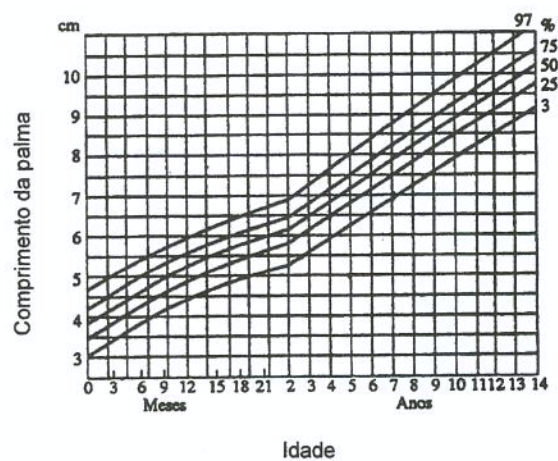


Gráfico 6 Gráficos de comprimento da orelha (para ambos os sexos)

Ref: Feingold & Bossert, 1974.

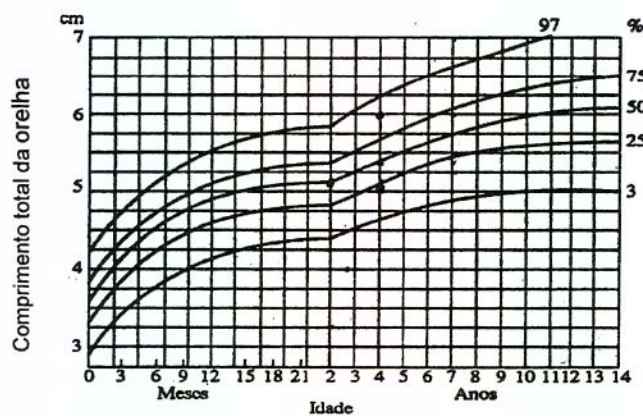


Gráfico 7 Gráfico de medidas do comprimento do pé

Ref: Blais et al., 1956.

