

ÉRIKA CRISTINA LOPES BURRONE DE FREITAS

**ESTUDOS MOLECULARES EM ANOMALIAS CRANIOFACIAIS RARAS:
SÍNDROME BLEFAROQUEILODÔNTICA E DEFEITOS DE LINHA MÉDIA FACIAL COM
HIPERTELORISMO**

2009

ÉRIKA CRISTINA LOPES BURRONE DE FREITAS

**ESTUDOS MOLECULARES EM ANOMALIAS CRANIOFACIAIS RARAS:
SÍNDROME BLEFAROQUEILODÔNTICA E DEFEITOS DE LINHA MÉDIA FACIAL COM
HIPERTELORISMO**

Dissertação de Doutorado, apresentada à pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

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

CO-ORIENTADORA: *Prof^a. Dra. Íscia Lopes Cendes*

CAMPINAS

2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Freitas, Érika Cristina Lopes Burrone de

F884e Estudos moleculares em anomalias craniofaciais raras: Síndrome blefaroqueilodôntica e defeitos de linha média facial com hipertelorismo/ Érika Cristina Lopes Burrone de Freitas. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, Íscia Lopes Cendes

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

1. Anomalias craniofaciais. 2. Desenvolvimento embrionário. 3. Biologia molecular. 4. Genes. 5. Citogenética humana. I. Lopes, Vera Lucia Gil da Silva. II. Lopes-Cendes, Íscia. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: Molecular biological studies in rare craniofacial anomalies: blepharocheilodontic syndrome and midline facial defects with hypertelorism

Keywords: • Craniofacial abnormalities

- Embryonic development
- Molecular biology
- Genes
- Molecular cytogenetics

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Profa. Dra. Chong Ae Kim

Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Data da defesa: 13-02-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Érika Cristina Lopes Burrone de Freitas

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Vera Lucia Gil Da Silva Lopes

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Marly Aparecida Spadotto Balarin
Professor (a) Doutor (a) Chong Ae Kim
Professor (a) Doutor (a) Mônica Barbosa de Melo
Professor (a) Doutor (a) Cláudia Vianna Maurer Morelli
Prof(a). Dr(a). Vera Lucia Gil Da Silva Lopes

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

Data: 13/02/2009

DEDICATÓRIA

Mais uma etapa vencida e um título alcançado... Mais um trabalho que dedico aos meus pais
que sempre me deram tanto amor e tanta força...

Primeiramente agradeço aos meus pais por me apoiarem e acreditarem sempre na minha capacidade. Também ao restante da minha família, meus irmãos, cunhadas, sobrinhas, cachorros, por fazerem minha vida mais completa e feliz.

A minha orientadora, Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes, pelos ensinamentos, pelo apoio e a confiança no meu potencial e no meu trabalho.

Ao Dr. Jeffrey Murray e Dr. Nigel Carter, pelas oportunidades internacionais e pelo aprendizado que me proporcionaram.

A Dra. Susan Gribble, Dra. Carla Rosenberg e Dra. Ana Cristina Krepischki dos Santos pelo apoio científico.

As minhas amigas e quase irmãs Ju e Cau, pelo companheirismo sempre e que compartilharam comigo todos os momentos em que vivi em Campinas.

Aos amigos que fiz durante o doutorado e que hoje são tão importantes para mim Társis, Milena, Bernardo, Carol e Karina.

A todos os outros amigos do laboratório que também são tão especiais e vivenciamos juntos muitos experimentos e muitos eventos sociais.

A todos os funcionários do departamento e da Pós-Graduação pelo auxílio e organização.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores Profa. Dra. Chong Ae Kim, Profa. Dra. Marly Balarin, Profa. Dra. Cláudia Maurer Morelli, Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo e Profa. Dra. Juliana Heinrich pelas sugestões e por fazerem meu trabalho tornar-se melhor e mais conciso.

E principalmente as famílias que aceitaram participar desse projeto, pois eles são a razão do meu trabalho.

**“... As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.
Mas as coisas findas,
muito mais que lindas,
essas ficarão. ”**

(Carlos Drummond de Andrade)

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxvi
RESUMO	xxix
ABSTRACT	xxxi
INTRODUÇÃO	37
Síndrome Blefaroqueilodôntica	40
Estudo de genes candidatos	42
Gene <i>IRF6</i>	42
Gene <i>P63</i>	43
Gene <i>OSR2</i>	45
Gene <i>TBX10</i>	46
Gene <i>FOXE1</i>	47
Os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo	49
Aspectos genéticos da formação da face e SNC	52
Estudo de genes candidatos	56
Gene <i>SHH</i>	56
Gene <i>FGF8</i>	57

Gene <i>PAX3</i>	59
Alterações cromossômicas nos DLMFH	60
Deleção cromossômica 22q11.2	61
As Aberrações cromossômicas e a utilização da técnica de <i>array-CGH</i> na pesquisa	64
OBJETIVOS	67
MATERIAL E MÉTODOS	71
Casuística	73
Infra-estrutura	74
Estudo de genes candidatos: <i>IRF6</i> , <i>P63</i> , <i>OSR2</i> , <i>TBX10</i> e <i>FOXE1</i>	74
Estudo de genes candidatos: <i>SHH</i> , <i>FGF</i> e <i>PAX3</i>	83
Estudo da deleção 22q11.2 por <i>FISH</i>	88
Investigação de alterações cromossômicas pela técnica de <i>array-CGH</i>	89
RESULTADOS	95
DISCUSSÃO	133
CONCLUSÕES	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
ANEXOS	177
Anexo I Parecer do Comitê de Ética da FCM/Unicamp	179
Anexo II Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	181
Anexo III Pacientes BCD e características clínicas	187

Anexo IV	Heredograma da família BCD1	189
Anexo V	Dados clínicos pacientes DLMFH	191

Figura 1	Estrutura do gene <i>IRF6</i>	43
Figura 2	Estrutura do gene <i>P63</i>	45
Figura 3	Estrutura do gene <i>OSR2</i>	46
Figura 4	Estrutura do gene <i>TBX10</i>	47
Figura 5	Estrutura do gene <i>FOXE1</i>	49
Figura 6	Estrutura do gene <i>SHH</i>	57
Figura 7	Estrutura do gene <i>FGF8</i>	59
Figura 8	Estrutura do gene <i>PAX3</i>	60
Figura 9	Ciclos utilizados na amplificação dos fragmentos gênicos	75
Figura 10	Ciclos utilizados na reação de sequenciamento no ABI	81
Figura 11	Ciclos utilizados na reação de sequenciamento no MegaBACE	86
Figura 12	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>IRF6</i>	97
Figura 13	Alteração encontrada na região promotora do gene <i>IRF6</i>	98
Figura 14	Alteração encontrada no exon 5 do gene <i>IRF6</i>	98
Figura 15	Alteração encontrada no intron 6 do gene <i>IRF6</i>	99
Figura 16	Alteração encontrada no intron 7 do gene <i>IRF6</i>	99
Figura 17	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>P63</i>	100
Figura 18	Alteração encontrada no intron 8 do gene <i>P63</i>	101
Figura 19	Alteração encontrada no intron 9 do gene <i>P63</i>	101
Figura 20	Dupla alteração encontrada no intron 10 do gene <i>P63</i>	102
Figura 21	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>OSR2</i>	102
Figura 22	Alteração encontrada no exon 1 do gene <i>OSR2</i>	103
Figura 23	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>TBX10</i>	103
Figura 24	Alteração encontrada no intron 2 do gene <i>TBX10</i>	104

Figura 25	Alteração encontrada no exon 3 do gene <i>TBX10</i>	104
Figura 26	Alteração encontrada no intron 3 do gene <i>TBX10</i>	105
Figura 27	Alteração encontrada no intron 4 do gene <i>TBX10</i>	105
Figura 28	Alteração encontrada no exon 5 do gene <i>TBX10</i>	106
Figura 29	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>FOXE1</i>	107
Figura 30	Alteração encontrada no exon 1 do gene <i>FOXE1</i>	108
Figura 31	Demonstrativo da região polialanina do gene <i>FOXE1</i>	108
Figura 32	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>SHH</i>	110
Figura 33	Alteração encontrada na região 5'UTR do gene <i>SHH</i>	111
Figura 34	Alteração encontrada no exon 1 do gene <i>SHH</i>	111
Figura 35	Alteração encontrada no intron 1 do gene <i>SHH</i>	112
Figura 36	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>FGF8</i>	112
Figura 37	Demonstrativo de amplificação dos fragmentos do <i>PAX3</i>	113
Figura 38	Alteração encontrada na região promotora do gene <i>PAX3</i>	114
Figura 39	Alteração encontrada no exon 2 do gene <i>PAX3</i>	114
Figura 40	Alteração encontrada exon 2 do gene <i>PAX3</i>	115
Figura 41	Alteração encontrada no exon 6 do gene <i>PAX3</i>	115
Figura 42	<i>FISH</i> da deleção 22q11.2	117
Figura 43	Perfil dos resultados do <i>array-CGH</i> do paciente DLMFH1	119
Figura 44	<i>FISH</i> deleção 2q36.1-2q36.3 da mãe do paciente DLMFH1	120
Figura 45	Haplótipo e resultados da genotipagem da família do paciente DLMFH1	121
Figura 46	Perfil dos resultados do <i>array-CGH</i> do paciente DLMFH2	122
Figura 47	Aumento detalhado da região 4q32.2	123
Figura 48	Perfil dos resultados do <i>array-CGH</i> do paciente DLMFH7	124
Figura 49	Aumento detalhado da região 6q21	125
Figura 50	<i>FISH</i> duplicação 6q21 paciente DLMFH7	126

Figura 51	Perfil do cromossomo 7 do paciente DLMFH9	127
Figura 52	Resultado do <i>array</i> de oligonucleotídeo na região do cromossomo 7	128
Figura 53	Aumento detalhado da região 9p24.1-9p24.3	129
Figura 54	Aumento detalhado da região 20p13	130
Figura 55	<i>FISH</i> paciente DLMFH10	131
Figura 56	<i>FISH</i> mãe paciente DLMFH10	132
Figura 57	Região deletada e genes contidos na região 2q36.1-2q36.3	143
Figura 58	Região deletada e gene contido na região 4q32.2	145
Figura 59	Região duplicada e genes contidos na região 6q21	146
Figura 60	Região deletada e genes contidos na região 9p24.1-9p24.3	149
Figura 61	Região duplicada e genes contidos na região 20p13	150

Tabela 1	Fatores de sinalização e transcrição expressos na crista neural e face	55
Tabela 2	Oligonucleotídeos do gene <i>IRF6</i>	76
Tabela 3	Oligonucleotídeos do gene <i>P63</i>	77
Tabela 4	Oligonucleotídeos do gene <i>OSR2</i>	78
Tabela 5	Oligonucleotídeos do gene <i>TBX10</i>	79
Tabela 6	Oligonucleotídeos do gene <i>FOXE1</i>	80
Tabela 7	Reações de seqüenciamento do ABI 3700	81
Tabela 8	Oligonucleotídeos do gene <i>SHH</i>	83
Tabela 9	Oligonucleotídeos do gene <i>FGF8</i>	84
Tabela 10	Oligonucleotídeos do gene <i>PAX3</i>	85
Tabela 11	Reações de sequenciamento do MegaBACE 1000	86
Tabela 12	Marcadores utilizados para comprovação da deleção 2q36.1-2q36.3	91
Tabela 13	Polimorfismos encontrados nos 5 genes pesquisados	109
Tabela 14	Polimorfismos encontrados nos 3 genes pesquisados	116
Tabela 15	Frequência dos alelos da cadeia polialanina do gene <i>FOXE1</i>	138

ACF	Anomalias Craniofaciais
ADAM33	<i>Disintegrin and Metalloproteinase Domain 33</i>
AEC	Síndrome Hay-Wells
AER	Ectoderma apical
ALX4	<i>Aristaless-like 4, Mouse, homolog of</i>
ARX	<i>Aristaless-related homeobox, X-linked</i>
ATG5	<i>Autophagy 5, S. Cerevisiae, homolog of</i>
AVP	<i>Arginine Vasopressin</i>
BAC	Cromossomo artificial de bactéria
BCD	Síndrome Blefaroqueilodôntica
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CGH	<i>Comparative Genome Hybridization</i> ou Hibridização Genômica Comparativa
CHD7	<i>Chromodomain Helicase DNA-Binding Protein 7</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
COL4A3	<i>Collagen, Type IV, Alpha-3</i>
CUL3	<i>Cullin 3</i>
DLMFH	Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo
DLX	<i>Distal-less Homeobox</i>
DMRT1	<i>Doublesex- and MAB3-related transcription factor 1 e 2</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EEC	Síndrome Ectrodactilia-displasia ectodérmica-fissura labial/palatina
EEG	Eletroencefalograma
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EN	<i>Engrailed</i>
EPHA4	<i>Ephrin Receptor</i>
ERM	Ermin

<i>PEA3</i>	<i>Polyomavirus Enhancer Activator Protein 3</i>
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
<i>FISH</i>	Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência
FL, FL/P, FP	Fenda Labial, Fenda Labiopalatal, Fenda Palatal
<i>FOXE1</i>	<i>Forkhead Box E1</i>
<i>FSTL5</i>	<i>Follistatin-related protein 5</i>
GCPS	Síndrome Greig cephalo-poli-sindactilia
<i>GLI</i>	<i>Glioma-Associated Oncogene Homolog</i>
<i>GLIS3</i>	<i>Glis Family Zinc Finger Protein 3</i>
<i>HIRA</i>	<i>Histone Cell Cycle Regulation Defective, S. Cerevisiae, homolog of</i>
<i>HOX</i>	<i>Homeobox</i>
<i>IL3</i>	<i>Interleukin 33</i>
<i>IRF6</i>	<i>Interferon Regulatory Factor 6</i>
<i>KCNE4</i>	<i>Potassium Channel, Voltage-Gated, Isk-Related Subfamily, Member 4</i>
<i>KCNV2</i>	<i>Potassium Channel, Voltage-Gated, Subfamily V, Member 2</i>
LCR	<i>Low Copy Repeat Sequences</i>
<i>MSX</i>	<i>Muscle Segment Homeobox, Drosophila, homolog of</i>
<i>OSR2</i>	<i>Odd-Skipped-Related 2</i>
<i>OTX</i>	<i>Orthodenticle, Drosophila, homolog of</i>
<i>OXT</i>	<i>Oxytocin</i>
<i>P63</i>	<i>Tumor Protein P63</i>
<i>PAX3</i>	<i>Paired Box Gene</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PHOX2B</i>	<i>Paired-like Homeobox 2b</i>
PMG	Polimicrogria
<i>PN1</i>	<i>Protease Nexin I</i>
<i>PRDM1</i>	<i>Positive Regulatory Domain I-Binding Factor 1</i>
<i>PTX</i>	<i>Pentraxin</i>
RA	<i>Retinoic Acid</i>

<i>RMN</i>	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
RPCI	Roswell Park Cancer Institute
<i>RUNX2</i>	<i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
<i>SCG2</i>	<i>Secretogranin I</i>
SDG	Síndrome DiGeorge
<i>SHH</i>	<i>Sonic Hedgehog</i>
<i>SLC19A3</i>	<i>Solute Carrier Family 19</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
<i>SNP</i>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOX3	Sry-Box 3
SPECT	Tomografia de Emissão de Fóton Único
SPP	Síndrome do Pterígio Poplíteo
SVCF	Síndrome Velocardiofacial
SVW	Síndrome de Van der Woude
<i>TBX</i>	<i>T-Box</i>
<i>TGF</i>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<i>TGIF</i>	<i>Transforming Growth Factor Induced Factor</i>
TM	Temperatura de <i>Melting</i> ou Anelamento
WGTP	<i>Whole Genome Tiling Path</i>
WNT	<i>Wingless</i>
<i>ZIC2</i>	<i>Zinc Finger Protein of Cerebellum 2</i>

RESUMO

A Síndrome Blefaroqueilodôntica (BCD) e os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo (DLMFH) são defeitos craniofaciais raros. Por esse motivo, os estudos de grandes casuísticas têm sido limitados. Contribuição científica significativa neste assunto tem sido dada por nosso grupo, que delineou características clínicas e diretrizes para seguimento de longo prazo e evidenciou achados neuroradiológicos em ambas as anomalias. Embasado nesses achados preliminares e evidências recentes da literatura pertinente, foi possível estabelecer uma estratégia inicial para investigação etiológica da BCD e dos DLMFH, sendo os objetivos desse projeto: investigar a etiologia da BCD nos indivíduos afetados pela síndrome, por meio de estudo dos genes candidatos *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10*, *FOXE1*, *SHH*, *FGF8* e *PAX3*; pesquisar, nos indivíduos com DLMFH, a presença de mutações nos genes candidatos *SHH*, *FGF8* e *PAX3*; identificar, em ambas as malformações, possíveis alterações cromossômicas; e, por último, associar os achados clínicos detectados nas investigações anteriores aos possíveis achados moleculares. Foram utilizadas técnicas de sequenciamento direto, *array-CGH*, genotipagem automática e hibridação *in situ* por fluorescência. Não foi possível relacionar nenhuma mutação pontual nos genes estudados associadas às malformações em questão, pois não foram encontradas alterações gênicas patogênicas. Entretanto foram detectadas em pacientes com DLMFH três aberrações cromossômicas em regiões distintas do genoma, tratando-se de um caso de duplicação no cromossomo 6 (paciente DLMFH7), um caso com deleção no cromossomo 9 e duplicação no cromossomo 20 (paciente DLMFH10) e um caso de deleção no cromossomo 2 (paciente DLMFH1). Nesse último, o gene *PAX3* encontrava-se dentro da região deletada, confirmando a hipótese inicial de que alguns genes de desenvolvimento estão envolvidos na etiologia dos DLMFH. Conclui-se, portanto, que em indivíduos com DLMFH, a técnica de *array-CGH* pode ser útil para detecção de aberrações cromossômicas diversas e o aconselhamento genético deve ser individualizado.

ABSTRACT

The Blepharochelodontic Syndrome (BCD) and Midline Facial Defects with Ocular Hypertelorism (MFDH) are rare craniofacial anomalies. Considering the rarity of these two groups of congenital defects, studies with large casuistry have been limited. Our group has significantly contributed to the scientific knowledge about both anomalies, delineating clinical characteristics, evidencing neurological findings and designing protocols for long term follow-up. Based in these preliminary findings and recent evidences of pertinent literature, it was possible to determine an initial etiologic investigation strategy for the BCD and the MFDH. The objectives of this project are to investigate the etiology of the BCD in affected individuals through *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10*, *FOXE1*, *SHH*, *FGF8* and *PAX3* candidate genes study; to search MFDH patients for mutations in the *SHH*, *FGF8* and *PAX3* candidate genes; to identify, in both syndromes, possible chromosomal anomalies; and finally, to associate the detected clinical findings in previous investigations to the molecular results. The direct sequencing, array-CGH, automatic genotyping and FISH were the molecular techniques used in this study. It was not possible to relate any punctual mutation in the studied genes associated to the syndromes investigated since none pathogenetic alteration was found. Although, chromosomal anomalies in different locations of the genome were detected in three MFDH patients, a chromosome 6 duplication (in patient MFDH7), a chromosome 9 deletion and chromosome 20 duplication (in patient MFDH10), and a chromosome 2 deletion (in patient MFDH1). In the latter case, the *PAX3* gene was inside the deleted region, supporting the initial hypothesis that some development genes are involved in the MFDH etiology. Therefore, it can be concluded that in MFDH patients, the array-CGH investigation can be useful to detect a wide range of chromosomal anomalies and the genetic counseling must be individualized.

INTRODUÇÃO

Nos anos mais recentes os avanços proporcionados pela pesquisa na área do genoma humano têm possibilitado o reconhecimento do componente genético de muitas doenças, promovendo o surgimento de um novo paradigma: a medicina genômica como conhecimento aplicado aos cuidados à saúde de todos (Guttmacher et al., 2001). Na área dos defeitos congênitos, entre os quais as anomalias craniofaciais estão inseridas, esses novos conhecimentos poderão possibilitar a compreensão mais ampla da etiologia e fisiopatologia dessas condições e, por conseguinte, a realização de diagnósticos mais precisos e precoces, bem como o desenvolvimento de terapias mais adequadas e métodos de prevenção mais efetivos (WHO, 2002). Diversos genes têm sido caracterizados quanto aos seus papéis no desenvolvimento da face e crânio e, provavelmente, a compreensão das interações de múltiplos genes e seus polimorfismos, poderá explicar tanto a variabilidade normal quanto a anormal. Apesar disso, evidências sobre o papel de outros genes são menos conclusivas, tornando o conhecimento atual dos fatores genéticos que controlam esses processos ainda rudimentar (Chong, 2002).

Dentre os defeitos congênitos, as anomalias craniofaciais (ACF) constituem um grupo altamente diverso e complexo que afeta uma significativa proporção de pessoas no mundo (Casal-Andrews et al., 1997; Cohen et al., 1997; Murray et al., 1997; American Cleft Palate-Craniofacial Association – ACPA, 2000; Carinci et al., 2000; Correa e Admonds, 2002; Mossey e Little, 2002; WHO, 2002). A denominação genérica ACF pode incluir anomalias isoladas e quadros de dismorfias múltiplas, de etiologia genética ou não. Via de regra refere-se à situação em que os arcabouços cranianos e (ou) facial apresentam alterações de contorno (Gorlin et al., 1990; Cohen et al., 1997; WHO, 2002).

Devido a toda complexidade das ACF, a caracterização adequada dos quadros clínicos torna-se muito importante, pois muitas vezes o delineamento clínico é pouco consistente com a literatura devido à raridade e (ou) à heterogeneidade clínico-etiológica do distúrbio (Gil-da-Silva-Lopes, 1997). Frente a isso, nosso grupo vem realizando um extenso estudo das anomalias

craniofaciais, com profissionais de múltiplas áreas e caracterizando muitos quadros sindrômicos raros tanto na esfera da dismorfologia, como na área neurológica, fisiológica, fonoaudiológica e molecular, tendo em vista os objetivos do projeto *Global Strategies to Reduce the Health-care Burden of Craniofacial Anomalies* lançado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002).

Dentro da caracterização de anomalias craniofaciais raras está o delineamento de dois quadros: a Síndrome Blefaroqueilodôntica e os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo, anteriormente chamados de Malformação ou Displasia Frontonasal, um grupo de defeitos muito heterogêneo. Ambos estão sendo cuidadosamente estudados e descritos por nosso grupo. Foram feitas as descrições dos principais sinais clínicos de ambas as síndromes, das alterações neurológicas (Gil-da-Silva-Lopes, 1997; Gil-da-Silva-Lopes et al., 2003; Giffoni, 2005; Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra, 2007) e, por fim, pretendíamos buscar as causas etiológicas desses defeitos. Para tanto utilizamos os dois grupos de casuística, ambas únicas no mundo, e técnicas de biologia molecular para localizar os *loci* responsáveis por essas malformações.

SÍNDROME BLEFAROQUEILODÔNTICA

As fendas labiais ou labiopalatais (FL/P) e fendas palatais isoladas (FP) são graves defeitos congênitos. Coletivamente são denominadas fendas orofaciais. Estão entre os mais comuns defeitos congênitos e afetam de 1/500 a 1/1000 nascimentos. Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam outro defeito maior do desenvolvimento, sendo que mais de 300 síndromes com a presença de fendas, incluindo um grande número com herança mendeliana, já foram descritas. A BCD (OMIM 119580) inclui-se nesse grupo, tratando-se de uma rara condição geneticamente determinada por transmissão autossômica dominante com expressividade variável. Seus principais sinais clínicos são: defeitos ectodérmicos, anomalias oculares e fissuras orofaciais. A incidência dessa condição clínica ainda não pôde ser estabelecida, tendo em vista os escassos relatos na literatura, geralmente envolvendo casos isolados.

Os defeitos ectodérmicos caracterizam-se, principalmente, por oligodontia e dentes cônicos, enquanto os achados oculares mais frequentes são ectrópio de pálpebra inferior,

distiquíase, euribléfaro e lagoftalmia. Até o momento, deficiência mental não foi relatada. De todo modo, embora os sinais cardinais para essa condição já estejam definidos, o reduzido número de descrições clínicas na literatura, ainda permite uma ampliação do espectro clínico (Gil-da-Silva-Lopes et al., 2003). Sinais clínicos incomuns na síndrome BCD foram também observados, como pili torti (Martinez et al., 1987) e anquibléfaro (Guion-Almeida et al., 1998). Foi sugerido que o espectro clínico poderia incluir anomalias anorretais (Gorlin et al., 1996; Guyuron et al., 1995 e Gil-da-Silva-Lopes et al., 2003) e comprometimento da formação do sistema nervoso central (SNC) (Giffoni, 2005).

Existe uma similaridade clínica significativa entre a síndrome BCD e outras síndromes com defeitos ectodérmicos e fissura de lábio. Dentre elas, as síndromes Ectrodactilia-displasia ectodérmica-fissura labial/palatina (EEC; OMIM 129900) e Hay-Wells (AEC; OMIM 106260), mapeadas no gene *P63* e as síndromes de Van der Woude (SVW; OMIM 119300)/síndrome do pterígio poplíteo (SPP; OMIM 119500), relacionadas a mutações no gene *IRF6*.

Defeitos ectodérmicos e fissura de lábio, com ou sem envolvimento de palato são sinais cardinais para a síndrome EEC. Esses achados também estão presentes na síndrome AEC, na qual o anquibléfaro é relatado. Assim como nas síndromes anteriores, na BCD existe uma combinação de defeitos ectodérmicos variados, incluindo anomalias anorretais e anquibléfaro.

A presença de fissura de lábio com ou sem envolvimento palatino e anquibléfaro também demonstra a sobreposição fenotípica entre a síndrome BCD e a SVW/SPP.

Baseados nessas observações, Gil-da-Silva-Lopes et al. (2003), sugeriram que os genes *P63* e *IRF6* poderiam ser possíveis candidatos para a síndrome BCD.

Recentemente foram descritos outros dois genes candidatos à BCD, trata-se dos genes *OSR2* e *TBX10*. Esses dois genes estão sendo intensamente estudados em modelos animais e ratos portadores de mutações apresentam características compatíveis com a síndrome (Lan et al., 2004; Bush et al., 2004).

O *OSR2* seria intensamente expresso no palato em crescimento, comprovando ser um regulador intrínseco do desenvolvimento e crescimento orofacial e também se expressa nos

membros em formação e ainda ao redor dos olhos em desenvolvimento. (Lan et al., 2001; Lan et al., 2004).

O gene *TBX10* também é expresso durante a embriogênese e desde que foi mapeado numa região cromossômica associada com múltiplas desordens do desenvolvimento, especula-se que ele seja candidato a uma síndrome relacionada ao desenvolvimento embriológico. Camundongos portadores de mutações nesse gene mostram um significativo aumento de susceptibilidade às fendas orofaciais (Deol e Lane, 1996; Trasler et al., 1984).

Martinhago e Ramos (2004) descreveram um caso que apresentava agenesia de tireóide além dos típicos achados da BCD e estenderam a discussão dos genes envolvidos na causa da síndrome, propondo principalmente o gene *FOXE1* (ou *TTF-2*).

Estudo de genes candidatos

Uma das metodologias mais poderosas para estudo de genes candidatos é a análise de ligação, mas são necessárias grandes famílias e parte da família estudada por Gil-da-Silva-Lopes et al. (2003) não concordou em participar da pesquisa. Outra possibilidade é o sequenciamento total dos genes, na busca por possíveis alterações. Tendo em vista as propostas de estudos anteriores e a descrição de novos genes que poderiam estar envolvidos na etiologia dessa síndrome, esse estudo propôs inicialmente o sequenciamento de 5 genes candidatos: *IRF6*, *P63*, *TBX10*, *OSR2* e *FOXE1*.

Gene *IRF6* (OMIM 607199)

Kondo et al. (2002) identificaram, por meio de análise de ligação, o gene *IRF6* dentro da região crítica da SVW, no cromossomo 1q32-q41.

O fator de regulação de interferon tipo 6 pertence a uma família de fatores de transcrição com um domínio de ligação ao DNA altamente conservado (tipo hélice-alça-hélice) e um domínio menos conservado de ligação às proteínas (C-terminal). Outros fatores de

regulação de interferon incluem o *IRF1* no cromossomo 5q, *IRF2* em 4q, *IRF3* em 19q e *IRF4* em 6p. A maioria deles regula a expressão do interferon alfa e beta após a infecção viral. Já o *IRF6* está envolvido na formação do palato.

Kondo et al. (2002) conduziram análises de expressão gênica em camundongos, e essas mostraram altos níveis de RNAm do gene *IRF6* na ponte média da fissura palatina, brotos dentários, folículos capilares, genitália e pele. Suas observações demonstraram que a haploinsuficiência do gene *IRF6* interrompe o desenvolvimento orofacial e são consistentes com as mutações negativo-dominantes que causam distúrbios no desenvolvimento da pele e genitália.

Mutações nesse gene foram relacionadas às síndromes de Van der Woude e pterígio poplíteo. Além disso, alguns estudos demonstraram que o gene *IRF6* também contribui para a etiologia das fendas labiopalatais não-sindrômicas (Scapoli et al., 2005; Blanton et al., 2005).

O gene possui nove exons, transcreve aproximadamente 4306b produzindo uma proteína com 467 resíduos e 53,13kDa de peso. Sua estrutura está exemplificada na Figura 1.

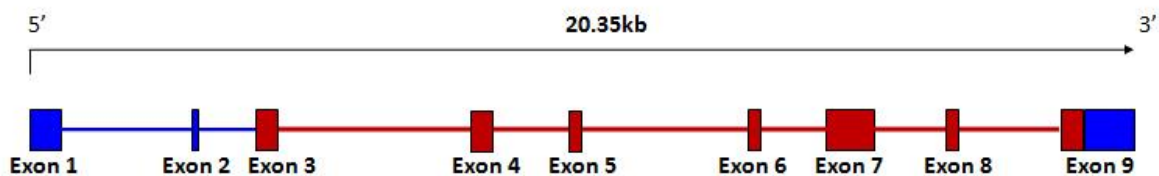


Figura 1 Estrutura do gene *IRF6*: apresenta 9 exons, sendo apenas 6 inteiramente transcritos (em vermelho), um parcialmente transcrito e 2 não transcritos (em azul).

Gene P63 (OMIM 603273)

Yang et al. (1998) localizaram o gene humano *P63* no cromossomo 3q27-q29 utilizando hibridização *in situ* com fluorescência (*FISH*). Por meio de análise de ligação, esse grupo mapeou o mesmo gene no rato no cromossomo 16, numa região homóloga à humana 3q27-q29.

O gene *P63* ou *Tp63* faz parte da família de supressores tumorais na qual se encaixa também o conhecido gene *p53* (família p53). Homólogo ao p53, o gene *P63* é um fator de transcrição que ativa alguns genes através de sua sequência específica de ligação ao DNA (Osada et al., 1998; Schmale e Bamberger, 1997; Senoo et al., 1998; Trink et al., 1998; Yang et al., 1998), inclusive interage com o próprio gene *p53* e outros membros da família (Yang et al., 1998).

Em 1999 Yang e colaboradores concluíram que o gene *P63* é crítico para a manutenção da população de células progenitoras que são necessárias à sustentação do desenvolvimento epitelial e morfogênese. O gene foi detectado numa variedade de tecidos humanos como a epiderme, cervix, urotélio e próstata.

Durante o desenvolvimento embriológico do rato, o gene é expresso principalmente no ectoderma apical (AER) dos membros e nos tecidos ectodérmicos maxilares e mandibulobranquiais, os quais são essenciais para o crescimento e padrão do mesênquima (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999). Ratos *P63* mutantes exibem anormalidades craniofaciais, membros malformados e falta de anexos epidérmicos como folículos capilares e primórdios dentários, bem como falta de glândulas sebáceas, lacrimais e salivares (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999).

A expressão do gene *P63* é necessária para o correto desenvolvimento e estratificação do epitélio e epiderme. Na ausência do gene, o epitélio se mantém monoestratificado. Durante a embriogênese o gene *P63* deve ser a molécula que inicia a estratificação do epitélio (Koster e Roop, 2004).

Mutações nesse gene foram relacionadas às síndromes EEC, AEC e outros tipos de displasias ectodérmicas (OMIM 603543; OMIM 103285; OMIM 605289; OMIM 129400) e fenda orofacial (OMIM 129400). Apesar de análogo ao gene *P53*, a função do *P63* na tumorigênese ainda é controversa (Tombova et al., 2008).

O gene pode possuir até 15 exons e transcreve uma proteína com até 680 aminoácidos, 79kDa de peso. A estrutura da isoforma 1 do gene está exemplificada na figura 2.

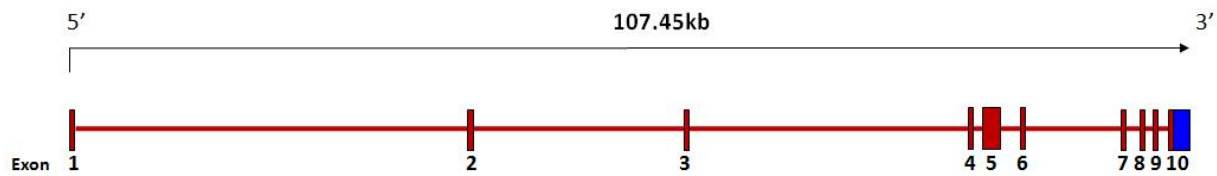


Figura 2 Estrutura da isoforma 1 do gene *P63*: apresenta 10 exons, quase todos inteiramente transcritos (em vermelho).

Gene *OSR2* (OMIM 611297)

O gene *Odd-skipped related 2 (OSR2)* codifica uma proteína do tipo dedo de zinco (*zing finger*) relacionada à proteína *Odd-skipped* de *Drosophila* e parece ser essencial ao desenvolvimento embrionário. Está localizado na região 8q23 (Lan et al., 2004).

Lan et al. (2001) demonstraram o padrão de expressão do gene homólogo em ratos. O gene é expresso no início do desenvolvimento no mesênquima rostro-lateral da mandíbula, adjacente ao processo maxilar e nos membros em desenvolvimento. O gene *OSR2* exibe um modelo de expressão dinâmico durante o desenvolvimento craniofacial, tanto no processo mandibular como maxilar e também no palato em formação. Também apresenta sítios de expressão em interações epitélio-mesenquimais durante o desenvolvimento dos dentes e rins. Em estudos recentes, o mesmo grupo (Lan et al., 2004) observou que embriões de ratos mutantes realmente apresentavam fissura palatina, identificando o gene *OSR2* como reguladores chave no desenvolvimento e crescimento palatal. Anos antes, a região na qual o gene foi mapeado já havia sido associada a fendas orofaciais não sindrômicas (Prescott et al., 2000). Em 2007, Kawai e colaboradores observaram que o gene regula ainda a proliferação das células osteoblásticas e formação óssea.

O gene possui 4 exons, transcreve 1838pb produzindo uma proteína com 312 resíduos, de 35,57kDa. Apresenta muitas variantes por splicing alternativo. Sua estrutura está exemplificada na figura 3.

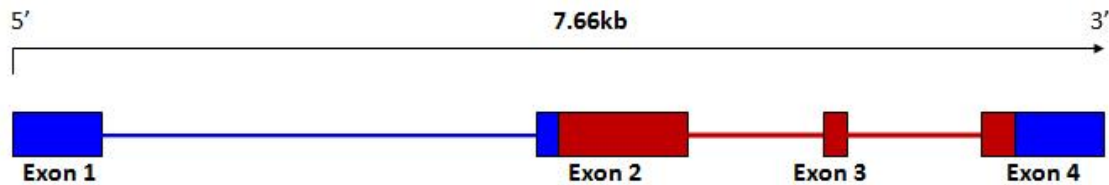


Figura 3 Estrutura do gene *OSR2*: apresenta 4 exons, sendo apenas 3 transcritos (em vermelho) e um não transcrito (em azul).

Gene *TBX10* (OMIM 604648)

Law et al. (1998) localizaram o gene humano *TBX10* no cromossomo 11q13 utilizando hibridização *in situ* com fluorescência (*FISH*). Esse grupo mapeou o mesmo gene, no rato, no cromossomo 19, numa região homóloga à humana.

O gene *TBX10* faz parte da família de fatores de transcrição *T-box*. Os genes dessa família têm um papel essencial em muitos processos do desenvolvimento de diversos organismos, incluindo a hidra, nematóides, mosca da fruta, sapo, galinha, camundongos (revisado por Papaionnou e Silver, 1998; Papaionnou, 2002). Esses genes são expressos diferencialmente durante a embriogênese e/ou de modo tecido-específico durante a vida adulta (revisado por Smith, 1997). Mutações em quatro genes *T-box* foram associadas a desordens do desenvolvimento humano, incluindo a síndrome ulnar-mamária (*TBX3*), síndrome Holt-Oram (*TBX5*), deficiência isolada do hormônio adrenocorticoide (*TBX19*) e fenda de palato (*TBX22*). O gene *TBX1* também está deletado na maioria dos casos de síndrome velocardiofacial/DiGeorge.

Camundongos portadores da mutação espontânea ‘Dancer’ (Dc) no gene *Tbx10* exibem fissura de lábio e palato (FL/P) em homozigose e um significativo aumento de susceptibilidade a

fendas em heterozigose (Deol e Lane, 1966; Trasler et al., 1984). Bush e colaboradores (2004) identificaram o ganho de função do fator de transcrição Tbx10 nesses ratos mutados como o mecanismo patogênico das fissuras de lábio e palato.

O gene possui 8 exons, transcreve aproximadamente 1558b produzindo uma proteína com 385 resíduos e 42,35kDa. Exemplificado na figura 4.

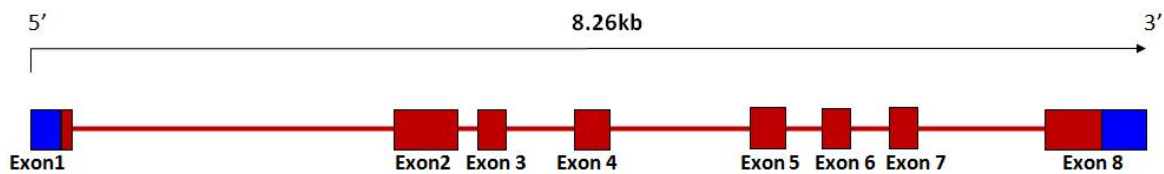


Figura 4 Estrutura do gene *TBX10*: apresenta 8 exons, sendo apenas 6 inteiramente transcritos (em vermelho) e outros 2 parcialmente transcritos ou não transcritos (em azul).

Gene *FOXE1* (OMIM 602617)

Esse gene, também chamado de Fator de Transcrição Tiroidiano 2 (TTF-2), é um membro da família *forkhead*, da qual muitos são reguladores chave no desenvolvimento embrionário (Zannini et al., 1997). O gene apresenta um domínio de ligação ao DNA de 100 aminoácidos altamente conservado (*forkhead*), uma cadeia polialanina e uma região C-terminal. Inicialmente acreditava-se que a cadeia polialanina do gene apresentava 19 resíduos de alanina (Chadwick et al., 1997), mas hoje se sabe que o tamanho dessa cadeia pode variar de 12 a 19 resíduos, sendo 14 o mais comum (Macchia et al., 1999). A exata função dessa cadeia polialanina permanece desconhecida e especula-se que ela deva funcionar como um elemento flexível entre os domínios funcionais do gene (Karlin e Burge, 1996).

Embora alterações no tamanho dessa cadeia polialanina já tenham sido associadas a diversos fenótipos anormais em outros genes (*ARX*, *HOXA13*, *PABP2*, *PHOX2B*, *RUNX2*, *SOX3* e *ZIC2*), no gene *FOXE1* essa variação não foi especificamente relacionada com qualquer síndrome ou mesmo disfunção da tireóide (Hishinuma et al., 2001). Entretanto, há a possibilidade de certos alelos, ou combinação deles, aumentarem o risco de complicações, principalmente na tireóide (Watkins et al., 2006; Caré et al., 2007).

O gene *FOXE1* foi mapeado na região 9q22 por Chadwick et al., 1997, sendo expresso na tireóide e na pituitária anterior embrionológica (Zannini et al., 1997), em testículos (Clifton-Bligh et al., 1998), epitélio orofaríngeo e timo (Trueba et al., 2005).

De Felice et al. (1998) demonstraram que o rato que não expressa o gene *FOXE1* exibe fenda de palato e também tem falta ou posição anormal da tireóide. Ratos mutantes também apresentam hipotireoidismo congênito similar à disgenesia de tireóide humana.

O gene *FOXE1*, até o momento relacionado a duas condições com fenda de palato sindrômicas (Clifton-Bligh et al., 1998; Castanet et al., 2002), também está sendo investigado pelo seu envolvimento em fendas não sindrômicas (Tonacchera et al., 2004; Venza et al., 2003), em disgenesia da tireóide (Tonacchera et al., 2004; Hishinuma et al., 2004; Sequeira et al., 2001) e na patogênese de um tipo de carcinoma (Eichberger et al., 2004). Apesar de um gene pequeno, com apenas um exon, apresenta um grande número de GCs, o que torna difícil a amplificação de toda a região codificante do gene (Macchia et al., 1999) e uma rápida triagem de mutações (Castanet et al., 2002; Tonacchera et al., 2004).

O gene possui apenas 1 exon, transcreve aproximadamente 3462b produzindo uma proteína com 373 resíduos e 38,29kDa. Modelo do gene *FOXE1* na figura 5.

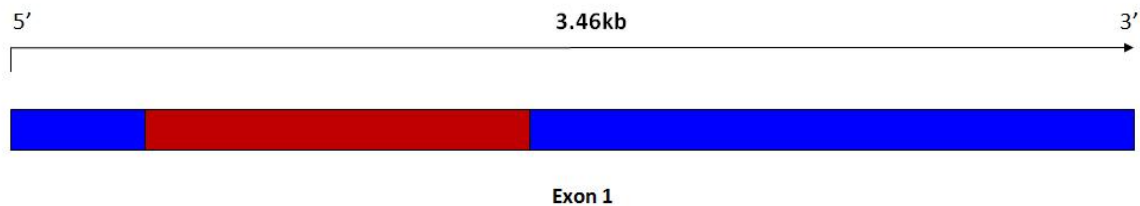


Figura 5 Estrutura do gene *FOXE1*: apenas um exon parcialmente transcrito (em vermelho).

Outros genes candidatos à BCD também foram propostos, como o *SHH*, *FGF8* e *PAX3*, por se tratarem de genes expressos na formação e desenvolvimento embrionário, em vários sistemas e órgãos do corpo humano, inclusive em tecidos ectodérmicos (pele/tegumento/dentes) e SNC. Esses genes serão descritos posteriormente.

OS DEFEITOS DE LINHA MÉDIA FACIAL COM HIPERTELORISMO, ISOLADOS E COMO PARTE DE QUADROS DE ANOMALIAS CONGÊNITAS MÚLTIPLAS

Cada região embrionária corresponde a uma unidade formadora. Opitz (1982) chamou essas unidades de campos de desenvolvimento. Esses campos seriam áreas embrionárias onde o desenvolvimento de estruturas complexas e apropriadas para cada região é determinado e controlado de uma maneira espacialmente coordenada, temporalmente sincronizada e hierarquicamente epimórfica. Essas unidades sofreriam a ação de diversos fatores, estando sujeitas a modificações durante o desenvolvimento embrionário.

O desenvolvimento embrionário segue um processo epigenético, com interação permanente entre fatores genéticos e ambientais. Alterações durante este período podem gerar várias anomalias (Opitz, 1982).

A formação da linha média é um dos principais eventos da primeira fase do desenvolvimento do embrião. Em torno dela, originam-se todos os processos que garantem uma simetria ao embrião (Martinez-Frias, 1995). Nesse processo está inserida a formação da face, e qualquer alteração que ocorra no desenvolvimento do mesênquima frontonasal, nos ossos membranosos da abóbada craniana, no condrocrânio ou nos 2 primeiros arcos branquiais, resultará em anomalias cranianas ou craniofaciais das mais diversas (Guion-Almeida, 2000).

Como a face e o sistema nervoso central iniciam sua formação em um período muito próximo e ambos pertencem ao mesmo campo de desenvolvimento (linha média), várias alterações faciais podem ser acompanhadas por anomalias corticais (Slavkin, 1990).

Os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo são um grupo de anomalias raras caracterizado, basicamente, por hipertelorismo ocular e fenda nasal mediana ou lateral (Gil-da-Silva-Lopes, 1997; Guion-Almeida, 2000; Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra 2007; revisado por Wu et al., 2007). Podem ainda ser observados crânio anterior bífido, ausência de ponta nasal, implantação em "V" dos cabelos na fronte, fissura labial mediana e (ou) fissura labial lateral e fissura palatina (DeMyer, 1967; Rosasco e Masa, 1968; Sedano et al., 1970; Sedano e Gorlin, 1988). Podem ser encontrados isoladamente ou associados a quadros de anomalias congênicas múltiplas, com etiologia já descrita ou não (Gil-da-Silva-Lopes, 1997, Guion-Almeida, 2000).

Inúmeras denominações já foram utilizadas para esse grupo de defeitos congênicos: Síndrome da fenda mediana (DeMyer, 1967), síndrome frontonasal (Rosasco e Masa, 1968), disostose frontonasal (Gollop, 1981), sequência mal formativa frontonasal (Toriello et al., 1986), displasia frontonasal (Sedano et al., 1970) e malformação frontonasal (Sedano e Gorlin, 1988). A maior parte das anomalias associadas aos DLMFH, tanto na forma isolada, como nos quadros sindrômicos, corresponde a defeitos de linha média. Nosso grupo, então, propôs a nomenclatura DLMFH, considerando as particularidades citadas e usando um nome descritivo, na tentativa de integrar as observações dos diferentes profissionais de saúde (Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra 2007).

Os DLMFH tratam-se de defeitos heterogêneos, tanto clínica como etiologicamente (Guion-Almeida et al., 1996). Já foram descritos vários quadros de associação de DLMFH a outras anomalias congênitas, com padrão de transmissão hereditária bem definido (Gil-da-Silva-Lopes, 1997). Considerando a raridade desses defeitos congênitos, os estudos de grandes casuísticas têm sido limitados, e assim a patogênese permanece parcialmente desconhecida. Falência na formação da cápsula nasal, alteração na migração das células da crista neural, alteração no suprimento sangüíneo nos processos frontonasais, perda de controle dos genes de desenvolvimento envolvidos no processo de formação facial, alterações cromossômicas, fatores teratogênicos e deficiência mesenquimal no plano facial mediano podem estar envolvidos na gênese desse quadro (Cohen Jr et al., 1971; Gil-da-Silva-Lopes, 1997).

Sabe-se que não há desvio em relação ao sexo e que a maioria dos casos é esporádica. Não existem estudos sobre a variabilidade racial ou dados globais sobre a prevalência e incidência (Guion-Almeida, 2000; Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra 2007). Entretanto alguns raros casos de recorrência familiar foram descritos. Poucas famílias demonstraram uma herança autossômica dominante, mas grandes genealogias com mais de 2 gerações são pouco frequentes (Cohen et al., 1971; Fryburg et al., 1993). Em uma família descrita por Warkany e colaboradores (1973) duas crianças afetadas nasceram da mesma mãe saudável e dois diferentes pais. Foi notada discordância em 5 pares de gêmeos monozigóticos em um estudo de Mohammed et al. (2004), sugerindo que fatores ambientais ou multifatoriais podem contribuir para a etiologia dessas malformações.

Vários relatos, em sua maioria esporádicos, evidenciam anomalias do SNC associados à DLMFH. As anomalias estruturais e funcionais do SNC são heterogêneas, mas frequentemente vistas nos DLMFH (DeMyer, 1967; Fontaine et al., 1983; Naidich et al., 1988; Meguid, 1993).

O primeiro trabalho em que foram definidas as características clínicas principais do quadro (DeMyer, 1967) já apontava várias malformações no SNC de alguns pacientes. Recentemente nosso grupo comprovou várias alterações corticais nesse grupo de malformações, através de estudos, utilizando as técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) (Giffoni, 2005). Os achados mais importantes são: anomalias do corpo caloso, redução e hipoplasia do cerebelo,

atrofia cortical e defeitos nos lobos frontal e parietal (Giffoni et al 2004, Giffoni et al 2006, Gil-da-Silva-Lopes e Giffoni 2006, Gil-da-Silva-Lopes e Maciel-Guerra 2007; Wu et al., 2007).

Uma grande revisão de literatura sobre os DLMFH (118 pacientes) apontou lipoma de corpo caloso em 44,4%, agenesia de corpo caloso em 40,7%, calcificação cerebral em 33,3%, anomalias ventriculares em 29,6% e encefalocelos em 11,1%. (Guion-Almeida et al., 1996).

Nos últimos estudos neurológicos do nosso grupo, as RNMs mostraram anormalidades estruturais no SNC de todos os pacientes analisados. Essas alterações incluíam alterações comissurais (94%), malformações do desenvolvimento cortical (58%), distúrbios de fechamento de tubo neural (42%) e anomalias de fossa posterior. Eletroencefalogramas (EEG) mostraram atividade epileptiforme em 35% dos casos e anormalidades de fundo em 29%. Com base nos dados obtidos nesses estudos e em revisão da literatura, sugeriu-se que as anomalias cerebrais seriam uma constante nessa condição (Giffoni et al. dados ainda não publicados).

Aspectos genéticos da formação da face e SNC

A morfogênese é caracterizada por um extraordinário conservadorismo, com mecanismos básicos que vêm sendo adaptados, repetidamente, a vários propósitos, desde a origem das espécies. Dentre esses mecanismos, destacam-se os genes de desenvolvimento (Opitz, 1993; Opitz e Gilbert, 1993).

Apesar de sua relevância clínica, o conhecimento desses genes é incompleto, sendo quase todas as informações, nesse sentido, obtidas através do estudo de organismos como a *Drosophila* (mosca das frutas) e o camundongo.

Numerosos genes de desenvolvimento (homólogos aos descobertos em *Drosophila*) já foram identificados e, em grande parte, os mecanismos de controle gênico da organização espacial da face e SNC parecem ter sido bem conservados ao longo da evolução. A maioria desses genes tem domínios particulares que codificam fatores de transcrição capazes de fixar-se a outros genes e modificar sua regulação (Drouin, 1996; Thompson, 2001).

Os genes mais estudados nessa área são os *HOX*, que possuem uma sequência comum (*homeobox*), codificadora de um homeodomínio responsável pela regulação protéica. Dessa forma, esses genes podem codificar fatores de transcrição e controlar a atividade de outros genes (ex: genes *PAX* e *EUX*) (Krumlauf et al., 1993).

Muito pouco se conhece sobre os mecanismos que controlam o desenvolvimento dos primórdios faciais e das regiões organizadoras desse desenvolvimento. Estudos de bloqueio em genes contendo *homeobox* têm observado que estes controlam o desenvolvimento de várias estruturas. A ausência de expressão dos genes *HOX* na porção anterior do embrião é crucial para o desenvolvimento da face, mandíbulas e prosencéfalo (Creuzet et al., 2002). Assim, os genes que se expressam durante o desenvolvimento facial são fortes candidatos ao controle dos padrões faciais (Krumlauf et al., 1993; Vieille-Grosjean et al., 1997).

Até o momento o que se conhece decorre do estudo de galinhas. Vieille-Grosjean et al. (1997) legitimaram o uso desses animais, mostrando que o grupo de genes *HOX* é o mesmo durante o desenvolvimento humano. Mutações em vários desses genes podem resultar em defeitos distintos no desenvolvimento facial (Vieille-Grosjean et al., 1997).

Existem alguns fatores de sinalização que se expressam durante o desenvolvimento facial. Os mais conhecidos são o fator de crescimento de fibroblastos (*FGF*), fator de crescimento transformador (*FGT*) e as famílias de genes *Hedgehog* (*HH*) e *Wingless* (*WNT*). Moléculas sinalizadoras como a endotelina 1 (*ET-1*), o fator de crescimento derivado da placa (*FGDP*), o fator de crescimento epidérmico (*FGE*) e os fatores ligadores de membrana (*JAGGED 1 e 2*) estão também envolvidas no desenvolvimento facial.

Estudos têm sugerido que a família *FGF* exerce um controle sobre a diferenciação, sobrevivência e motilidade celular. Vários genes dessa família parecem atuar no desenvolvimento dos primórdios faciais (Ornitz e Itoh, 2001).

Três genes da família *Hedgehog* foram identificados em humanos: *Sonic hedgehog* (*SHH*), *Indian hedgehog* (*IHH*) e *Desert hedgehog* (*DHH*) (Echelard et al., 1993). O gene *SHH* regula a atuação de outros genes como os *GLI* (2 e 3) e algumas de suas mutações resultam em malformações craniofaciais.

Em mamíferos e aves, alguns genes como *FGF8* e *SHH* controlam o crescimento inicial do processo frontonasal (Hu e Helms, 1999; Firnberg e Neubüser, 2002). Genes como *ERM*, *PEA3* e *PAX3* são expressos no mesênquima facial e *ERM* e *PEA3* no placóide nasal, sofrendo regulação de sinal pelo *FGF8*.

A segmentação cortical em camadas sofre influência da segmentação rombomérica, que, por sua vez, é controlada por genes regulatórios da família *HOX*. Outros genes regulam a síntese de neurotransmissores, o contato dos neuroblastos com as fibras radiais gliais, o processo de migração e formação sináptica (Palmini, 1994).

A família *Wingless* (*WNT*) parece ter vários papéis no desenvolvimento. Em camundongos, o gene *WNT-1* atua exclusivamente no desenvolvimento do SNC (McMahon, 1990), enquanto os genes *WNT-5*, *-10a*, *-10b* e *-11* atuam no desenvolvimento facial (Wang, 1996).

Da família *paired box*, o gene *PAX3* é expresso, no início da neurogênese, nas células mitóticas da zona ventricular, no desenvolvimento da medula espinhal e de algumas regiões do metencéfalo, mesencéfalo e diencefalo. Esse gene atua ainda, em conjunto com o *PAX1*, 6, 7 e 9, no desenvolvimento facial (Goulding et al., 1991).

Vários outros genes também participam do controle do desenvolvimento embrionário do crânio, face e SNC e a tabela 1 sumariza os principais genes.

Tabela 1 Fatores de sinalização e transcrição expressos na crista neural e face durante o desenvolvimento embrionário (adaptado de Francis-West et al., 1998).

	Fatores de sinalização	Genes <i>homeobox</i>	Outros fatores de transcrição
Migração crista neural	Wnt-5a	En protein Dlx-1 ^a e 2 ^b Msx-1 ^{a,b} e 2 ^b Otx-2 ^a Pax-3 ^{a,b} e 7 ^a	AP-2 ^a Gli-2 ^a e 3 ^a Twist ^{a,b}
Primórdio facial	Activin β a ^a Bmp-2, 4 ^a , 5 ^a e 7 ^a EGF ET-1 ^a FGF1, 2, 4, 5, 8 e 12 PDGF- α Jagged 1 ^b e 2 ^a Shh ^{a,b} TGF- α TGF β 1, 2 ^a e 3 ^a Wtn-5a, 10a, 10b e 11	Barx-1 e 2 Dlx1-6 (1 ^a 2 ^a) En-2 GH-6 Msx-1 ^{a,b} e 2 ^b Otx-2 ^a Pax-3 ^{a,b} e 7 ^a , 6 ^{a,b} Ptx-1 Hox-11	AP-2 ^a Gli-1,2 ^a e 3 ^a Pax-1 ^a Twist ^{a,b}

^a Mutações ou perda de função em ratos knockout resultam em alguma anormalidade facial

^b Existe uma síndrome humana associada a mutações nesse gene

Estudo de genes candidatos

Levando-se em conta a potencialidade dos genes de desenvolvimento estarem envolvidos na etiologia desse grupo, fica evidente a necessidade de delinear estudos que possam elucidar a participação dos mesmos no desenvolvimento normal e anômalo. Ainda não existem descrições de genes relacionados aos DLMFH. Num único caso de DLMFH com alterações oculares, fenda lábio-palatal, agenesia de corpo caloso e encefalocele, que havia sido primeiramente diagnosticado com holoprosencefalia, foi descrita uma única substituição no gene *TGIF* (Richieri-Costa e Guion-Almeida, 2004). Entretanto a relação entre essa alteração na sequência do gene e o fenótipo ainda não pôde ser estabelecida.

Dentre os diversos fatores que poderiam ser propostos, foram escolhidos 3 genes candidatos: *SHH*, *PAX3* e *FGF8*. Os três participam comprovadamente do desenvolvimento embrionário e, no caso dos dois primeiros, eles já foram implicados em síndromes com a presença de malformações craniofaciais (Marigo et al., 1995; Ishikiriya, 1993). Esses fatores são expressos em diversos estágios do desenvolvimento da face e SNC (no primórdio facial e migração da crista neural) e ainda não está claro qual estágio será afetado por mutações nesses genes.

Gene *SHH* (OMIM 600725)

O gene *SHH* pertence à família *Hedgehog*, a qual é composta por genes que controlam o desenvolvimento embrionário e foram primeiramente descritos em *Drosophila melanogaster*. O gene é expresso nos SNC, reprodutivo, respiratório, urinário, tecido epitelial (pele, tegumento, cabelo) e em células da linhagem hematopoiética e está envolvido no padrão e desenvolvimento desses sistemas, inclusive das estruturas craniofaciais (Ertzer et al., 2007). A formação da linha média e a expansão das estruturas ligadas a ela dependem da sinalização do *SHH* (Yamagishi et al., 2006). Hu e Helms (1999) demonstraram que a remoção de regiões que

expressam o *SHH* causa crescimento assimétrico da face e fissuras. Os mesmos autores demonstraram que a sinalização do *SHH* é necessária em estágios específicos da morfogênese facial, e a disrupção desses sinais está relacionada a vários níveis de dismorfologias faciais.

Mutações de perda de função no gene *SHH* perturbam o padrão mediolateral da placa neural, resultando em holoprosencefalia e ciclopia (Belloni et al., 1996; Roesler et al., 1996). Entretanto mutações de ganho de função promovem expansão mediolateral da face, ou seja, hipertelorismo e consequente duplicação das estruturas da linha média, como nariz ou boca (Hu e Hemls, 1999).

O gene *SHH* foi mapeado no cromossomo 7q36 por Marigo e colaboradores (1995). Possui 3 exons apenas (figura 6) e aproximadamente 9,41kb. Seu RNA tem 1576b, transcrevendo uma proteína de 462 aminoácidos e 49,6kDA de peso.



Figura 6 Estrutura do gene *SHH*: apresenta 3 exons, sendo apenas 1 inteiramente transcrito (em vermelho) e outros 2 parcialmente transcritos(em azul).

Gene FGF8 (OMIM 600483)

Os fatores de crescimento de fibroblastos (*FGFs*) compreendem uma família de 22 proteínas distintas (revistos por Ornitz e Itoh, 2001) com funções de sinalização pleiotrópicas no desenvolvimento e homeostase. Eles têm um papel importante no desenvolvimento geral do

embrião (Tanaka et al., 1992; Cohn et al., 1995; Slack, 1994) e no desenvolvimento de tipos celulares específicos. O gene *FGF8* pertence a essa família de sinalizadores intracelulares e está principalmente implicado no desenvolvimento embrionário. O padrão temporo-espacial de expressão do *FGF8* sugere que ele esteja envolvido na gastrulação, regionalização do cérebro, alongação axial, organogênese dos membros e face e na esqueletogênese (Yoshiura et al., 1997; revisado por Niswander, 2003; Richman e Lee, 2003). Juntamente com o *SHH* ajuda a determinar a lateralização direito-esquerda do embrião (Meyers e Martin, 1999).

Mutações em diversos membros da família dos *FGFs* acarretam uma variedade de doenças genéticas humanas caracterizadas por defeitos tanto craniofaciais como nos membros (revisado por Shum et al., 2003; Wilkie, 2005).

Um estudo recente de Bobick e colaboradores (2007) demonstrou que os fatores 8, 4 e 2 possuem tanto um efeito estimulatório como inibitório na diferenciação das células dos membros em formação, do processo frontonasal e do arco mandibular.

O gene foi mapeado no cromossomo 10q24 (Lorenzi et al., 1995; White et al., 1995) e trata-se de um gene pequeno, com aproximadamente 5,94kb. Já foram encontradas 4 isoformas diferentes do gene, mas o predominante possui 6 exons (figura 7), um RNA de 1071b, traduzindo uma proteína com 233 aminoácidos e peso molecular de 27,8kDa. O gene é expresso principalmente no período fetal, no cérebro em desenvolvimento, no sistema reprodutor (ovário, mamas, testículos e próstata), no sistema urinário e também medeia o crescimento de células cancerosas através de sua ação hormonal (Heikinheimo et al., 1994; Crossley e Martin, 1995).

Devido ao fato do gene *FGF8* expressar-se nos tecidos e órgãos acometidos nos DLMFH, mutações nesse gene poderiam estar envolvidas na etiologia dessas malformações, tratando-se de um bom gene candidato.

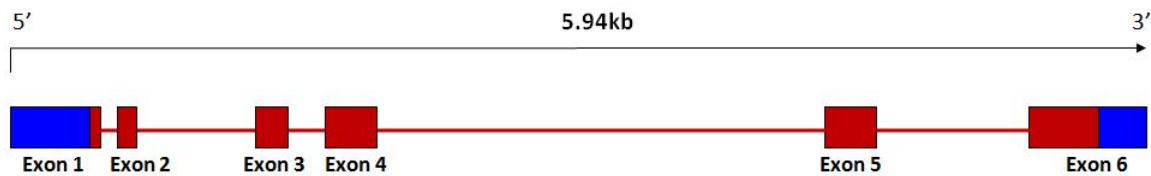


Figura 7 Estrutura da isoforma E do gene *FGF8*: 6 exons, sendo 4 deles inteiramente transcritos (vermelho) e 2 parcialmente transcritos (azul).

Gene *PAX3* (OMIM 606597)

O gene *PAX3* pertence a uma família de genes de fatores de transcrição que possuem uma sequência altamente conservada (*paired box*). Os genes *PAX* também foram descobertos por meio de estudos do desenvolvimento da *Drosophila* e podem ser agrupados em 4 classes, de acordo com a estrutura de seus domínios funcionais (Lamey, Koenders e Ziman, 2004). O *PAX3* foi mapeado na região 2q35 (Tsukamoto et al., 1992; Ishikeriyama, 1993) e possui 10 exons (figura 8) e aproximadamente 100kb. Já foram descritas 7 isoformas do gene, mas a forma predominante tem um RNA de 3193b, transcrevendo uma proteína de 479 resíduos e 52,9kDa. Pertence à classe III, juntamente com o *PAX7*, apresentando 2 domínios de ligação ao DNA, o domínio *paired* e também um domínio tipo *homeobox*, além de um optapeptídeo e uma região 3' rica em Ser-Thr-Pro a qual está envolvida na ativação transcricional (Chalepakakis et al., 1994; Bennicelli et al., 1995).

O gene *PAX3* é expresso numa variedade de tecidos e órgãos como no SNC, trato respiratório e laringe, pele/tegumento. Está envolvido no desenvolvimento embrionário, tendo participação principalmente no padrão de desenvolvimento do tubo neural e cérebro (Jessell e Snaes, 2000; Thomas et al., 2004). A expressão do gene também está envolvida no crescimento dos somitos, a partir dos quais os precursores dos músculos esqueléticos são formados (Lamey, Koenders e Ziman,, 2004). Mutações no gene *PAX3* estão relacionadas principalmente à Síndrome de Waardenburg (Baldwin et al., 1992; Tassabehji et al., 1992).

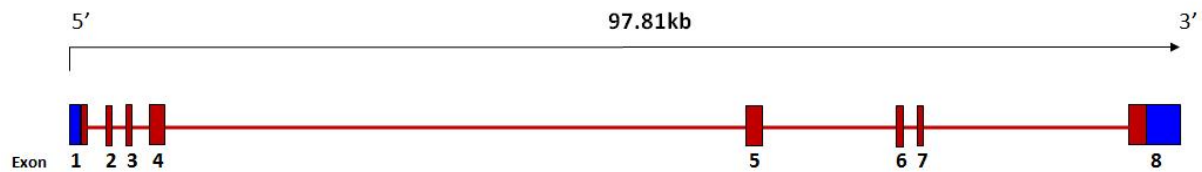


Figura 8 Estrutura do gene *PAX3*: possui 8 exons, sendo 6 inteiramente transcritos (vermelho) e dois parcialmente transcritos (azul).

Alterações cromossômicas nos DLMFH

Alguns exemplos de desbalanços cromossômicos já foram descritos em pacientes com DLMFH. Uma criança de 36 semanas com DLMFH e arrinencefalia apresentou trissomia da região 2q31-2qter e monossomia 7q36-7qter, resultado de uma segregação desbalanceada de uma translocação materna [46,XX,-7,+der(7), t(2;7)(q31;q36)mat] (Chen, 1994).

Outra criança com DLMFH e uma translocação recíproca aparentemente balanceada herdada de uma mãe clinicamente normal [t(15;22)(q22;q13)] foi descrita por Fryns et al. (1993).

Outra descrição de DLMFH com alteração cromossômica refere-se a um caso de rearranjo cromossômico complexo com uma translocação balanceada de novo entre os cromossomos 3, 7 e 11, com quatro pontos de quebra e cariótipo 46,XY,t(7;3)(3;11) (7pter-->7q21.3::3q27-->3qter;3pter-->3 q23::11q21-->11qter; 11pter-->11q21::3q23-->3q27::7q21.3-->7 qter). A criança descrita por Stevens e Qumsiyeh (1995), apresentou ao exame clínico acentuado hipertelorismo, ausência de ponta nasal, alargamento entre as narinas. Também tinha defeito no coração, genitálias, coluna e anormalidades estruturais no cérebro.

Deleção cromossômica 22q11.2

A microdeleção 22q11 é a deleção intersticial mais encontrada nos seres humanos com incidência de 1/4000 a 1/5000 (Devriendt et al., 1998). Existem relatos na literatura que associam a deleção 22q11 a mais de 80 tipos diferentes de malformações, combinando níveis variáveis de gravidade e causando um fenótipo que inclui a síndrome Velocardiofacial (SVCF; OMIM 192430), Sequência DiGeorge (SDG; OMIM 188400) e síndrome Malformativa Cardíaca Conotruncal (OMIM 217095).

A região cromossômica 22q11, conhecida como região DiGeorge, apresenta sequências repetidas curtas (*low copy repeat sequences*, LCR22). Recombinações entre as LCRs explicam a recorrência uniforme do tamanho da deleção, comumente de 3Mb (Baumer et al., 1998; Edelmann et al.; 1999; Shaik et al., 2000). Entretanto, 1 em cada 12 pacientes tem uma deleção menor de 1,5Mb próxima às regiões de LCRs, e os sinais observados em pacientes com esta deleção não são diferentes daqueles observados em pacientes com deleção de 3Mb. Assim, pode-se deduzir que essa região é fundamental ao fenótipo.

Desde a descoberta da deleção 22q11, ainda não está claro quais genes são responsáveis pelo fenótipo visto e se as desordens relacionadas são monogênicas ou se são síndromes de genes contíguos (Swillen et al., 2000).

Do ponto de vista embriológico, as condições malformativas associadas à deleção 22q11 têm origem em distúrbio na histogênese das células da crista neural derivadas do 3^o e 4^o arcos branquiais. Modelos animais em que se observa interrupção das células da crista neural sugerem que a haploinsuficiência gênica resultante da deleção, de alguma maneira afeta este grupo de células ou suas interações (Scambler et al., 2000).

A SVCF e a SDG são desordens autossômicas dominantes que compartilham um amplo espectro fenotípico, incluindo fissura palatal, defeitos cardíacos conotruncais e face dismórfica. Ambas as condições são o resultado de defeitos no padrão de desenvolvimento. Inúmeras estruturas e tecidos alterados na SVCF/SDG derivam dos arcos branquiais (Baldini, 2002). Há uma sobreposição das características clínicas das SVCF e SDG e ambas são causadas pela

deleção 22q11, sugerindo que estas condições representam variações na expressão do mesmo defeito genético (Swillen et al., 2000).

O primeiro estudo qualitativo utilizando RMN em indivíduos com SVCF descreveu inúmeras anomalias cerebrais, incluindo vermis pequeno, cistos adjacentes, cornos frontais e fossa posterior pequena (Mitnick et al., 1994). Estas anomalias cerebrais foram confirmadas em inúmeros outros casos descritos (Altman et al., 1995; Lynch et al., 1995; Devriendt et al., 1996b; Vataja e Elomaa, 1998). Há relatos de redução do volume da substância cinzenta no cerebelo e parte posterior bilateral do giro do cíngulo e lobo temporal direito e redução da massa branca nas regiões temporo-parietal e occipital. Outros achados por meio de RM incluem alargamento desproporcional da fissura silviana esquerda (Bingham et al., 1997) e anomalias de desenvolvimento da linha média, atrofia cerebral leve, agenesia do corpo caloso e anomalias de base de crânio (Chow et al., 1999).

Além dessas alterações cerebrais, há na literatura descrição de 11 pacientes com Polimicrogiria (PMG) e que apresentam síndrome da deleção 22q11 (Scambler et al., 2000). Outras malformações cerebrais tais como: atrofia, hipoplasia ou agenesia de corpo caloso, cisto em septo pelúcido, holoprosencefalia dentre outras, já foram associadas à deleção do 22q11, embora tanto a PMG como estas outras malformações sejam consideradas de baixa ocorrência na síndrome de deleção do 22q11 (Takanashi et al., 2003; Barkovich et al., 2001).

Após esta revisão da literatura, observou-se uma semelhança entre os achados neurológicos em DLMFH e as síndromes de deleção 22q11, sugerindo a possibilidade de etiologia comum para essas condições clínicas, ao menos em parte dos casos, em vista da heterogeneidade clínica dos DLMFH.

Alterações na região 22q11 foram relatadas associadas a casos de displasia frontonasal e condições similares.

Stratton e Payne (1997) descreveram um caso de displasia frontonasal caracterizado por nariz bífido, ponte nasal plana, filtro nasolabial plano, hipertelorismo, braquicefalia e tetratologia de Fallot. Utilizando a técnica de *FISH*, foi constatada a deleção na região 22q11 (região DiGeorge). Os autores sugerem que um ou mais genes desta região crítica interferem no

desenvolvimento do nariz. Além disso, sugerem que alterações na migração das células da crista neural possam estar envolvidas nas malformações frontonasais e que mais de um gene influencie este processo. Em 1998, Kirkpatrick et al. descreveram o caso de um menino com anomalias frontonasais e deleção na região 22q11, similar ao descrito por Stratton e Payne (1997).

Gripp et al. (1997) descreveram dois pacientes com síndrome de microdeleção 22q11.2 que apresentam fenótipo bem variável. Os indivíduos apresentavam nariz largo e bífido e tetralogia de Fallot, hipocalcemia neonatal, defeito no septo atrial, fissura palatal e úvula bífida. Já na fase adulta, um destes pacientes foi avaliado por Lynch et al. (1995) e classificado como portador da SVCF. Estes autores detectaram dismetria e disdiadococinesia consistente com a degeneração cerebelar, atrofia de vermis do hemisfério cerebelar, calcificação do gânglio basal, e lesões brancas no exame RMN sugeridas como perda axonal, isquemia ou desmielinização. Tais achados são similares aos referidos por nosso grupo em indivíduos com DLMFH (Giffoni et al., 2005).

Fryns et al. (1993) relatam um caso de displasia frontonasal, associado a uma translocação balanceada de herança materna entre os cromossomos 15/22, cariótipo 46, XX, t(15;22)(q22;q13). As características clínicas encontradas incluíam bossa frontal proeminente, crânio bífido, fissuras palpebrais oblíquas para baixo, hipertelorismo ocular, epicanto, estrabismo divergente, palato alto, nariz bífido e implantação baixa e em “V” dos cabelos na fronte. Tomografia computadorizada do crânio mostrou dilatação dos ventrículos laterais, calcificações epifisárias e hiperpneumatização dos seios paranasais.

Schulze et al. (2001) descrevem o caso de 2 pacientes com Displasia Facial Média. Os pacientes apresentavam fissura lábiopalatina bilateral, ponte nasal alta, fóvea profunda na ponta nasal, prolabium curto, ausência de freio labial, premaxila hipoplásica, e atraso no desenvolvimento da cartilagem septal e anomalias cardíacas. A RMN do cérebro detectou alargamento dos sinus frontais bilaterais, porção anterior de ambos os hemisférios cerebrais reduzida e padrão do giro frontal sugerindo polimicrogiria. Ambos os pacientes apresentaram cariótipo normal, mas pela técnica de *FISH* encontrou-se deleção na região 22q11.

AS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E A UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROARRAY CGH NA PESQUISA

A técnica de citogenética clássica utilizando bandamento G é o meio mais comum de se detectar aberrações cromossômicas, entretanto a despeito de seu indiscutível sucesso, esta ferramenta tem uma resolução limitada, geralmente não detectando alterações menores que 3–5 Mb. Sabemos que alterações menores também podem contribuir substancialmente para a etiologia de malformações (Schinzel, 2001). Essa limitação tem sido em parte superada pelo uso da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*), a qual tem uma resolução de 5–500 kb, entretanto essa outra técnica não apresenta a possibilidade da pesquisa de múltiplas regiões simultaneamente e sondas candidatas devem ser selecionadas antes da investigação por essa técnica, baseada no fenótipo do paciente. Recentemente o desenvolvimento de técnicas como a Hibridização Genômica Comparativa (*array-CGH*) (Pinkel et al., 1998; Antonarakis, 2001; Snijders et al., 2001) tem permitido a análise de milhares de regiões do genoma simultaneamente para a detecção de microdeleções e microduplicações (Solinas-Toldo et al., 1997; Pinkel et al., 1998; Snijders et al., 2001; Buckley et al., 2002; Vermeesch et al., 2005). Essa técnica compara o DNA marcado de dois diferentes indivíduos: o DNA teste (ou do paciente) e um referência (ou controle), os quais são co-hibridizados em um suporte sólido (normalmente uma lâmina de vidro de microscopia) que contém clones ou fragmentos de DNA sintetizados imobilizados (Albertson e Pinkel, 2003). Os *arrays* têm sido construídos com uma variedade de substratos de DNA, incluindo oligonucleotídeos (Lucito et al, 2003), cDNAs (Pollack et al, 1999) ou cromossomos artificiais de bactérias (BACs) (Bejjani et al, 2005). A resolução do *array* é limitada apenas pelo tamanho do DNA alvo clonado e pela distância entre essas sequências nos cromossomos.

A primeira vantagem do *array-CGH* sobre a técnica de *FISH* é a habilidade do primeiro de detectar alterações no número de cópias do DNA em múltiplos *loci* do genoma simultaneamente. Essas alterações incluem deleções, duplicações ou ampliações em qualquer *locus* desde que a região esteja contida no *array*. Assim, o *array-CGH* é um experimento de *FISH* coordenado e simultâneo de milhares de *loci* diferentes (Ligon et al, 1997).

Existem diferentes abordagens na construção e desenvolvimento dos *arrays-CGH*. Alguns foram desenhados para cobrir o genoma humano inteiro (Ishkanian et al, 2004; Snijders et al, 2001). Esses *microarrays*, designados *whole-genome*, geralmente incluem clones que cobrem todos os cromossomos e um exemplo deles são os que possuem um clone a cada mil bases 1kb, em média, no genoma (Snijders et al, 2001; Greshock et al, 2004; Shaw-Smith et al, 2004). *Whole-genome arrays* são muito úteis na triagem de ganhos ou perdas de DNA, ou seja, na identificação de alterações cromossômicas desconhecidas (*genome profiling*), com uma alta resolução.

O uso da técnica na pesquisa acelerou o passo da descoberta na genética humana. A alta resolução oferecida pelo *array-CGH* vem sendo usada para definir regiões candidatas que contenham supostos genes responsáveis por doenças genéticas humanas. Por exemplo, Vissers et al (2004) utilizaram a técnica para estudar indivíduos com Síndrome CHARGE. Os resultados obtidos permitiram aos autores focarem-se em apenas nove genes dentro da região delimitada pela técnica e eles foram capazes de detectar mutações no gene *CHD7*, finalmente mostrando que elas eram responsáveis pelo fenótipo da síndrome. A alta resolução do *array-CGH* foi crucial para refinar a região crítica da doença e reduzir o número de genes candidatos para serem investigados posteriormente.

O *array-CGH* torna-se então uma potente técnica para investigação de malformações nas quais a etiologia ainda é desconhecida. No caso da BCD e dos DLMFH, essa estratégia poderia indicar regiões alteradas ou até mesmo genes que estão envolvidos no fenótipo dos pacientes.

OBJETIVOS

Nesse contexto, nosso objetivo foi contribuir para o esclarecimento etiológico das síndromes raras com anomalias craniofaciais visando a uma melhor caracterização das mesmas. Especificamente, pretendia-se:

- 1) Investigar, nos indivíduos com BCD, a presença de mutações nos genes *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10*, *FOXE1*, *SHH*, *FGF8* e *PAX3*, em busca da etiologia dessa síndrome.
- 2) Investigar, nos indivíduos com DLMFH, a presença de mutações em genes candidatos como *SHH*, *FGF8* e *PAX3*, em busca dos fatores envolvidos na etiologia desses defeitos.
- 3) Identificar, em ambas casuísticas, possíveis alterações cromossômicas por meio da técnica de *array-CGH*.
- 4) Associar os achados detectados nas investigações neurológica e neuropsicológica anteriormente descritos aos possíveis achados moleculares.
- 5) Contribuir com dados para o aconselhamento genético das famílias, quando pertinente.

MATERIAIS E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Este projeto foi aprovado pelo CEP/FCM/UNICAMP (488/2002/CONEP 7016) (Anexo I). Após a anuência do participante ou de seu responsável, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

A casuística do presente estudo foi composta por dois grupos distintos: BCD e DLMFH. Na maior parte da pesquisa apenas o propósito foi testado, salve os casos da BCD, nas quais todos os indivíduos coletados também o foram ou casos em que foi necessário determinar a origem hereditária da alteração.

BCD

A casuística da BCD era formada por 3 casos, sendo apenas um familiar e os outros dois casos isolados. A família foi anteriormente descrita por Gil-da-Silva-Lopes et al. (2003) e um dos casos isolados descrito por Martinhago e Ramos (2004). Os aspectos clínicos estão no Anexo III e o heredograma da família BCD1 no Anexo IV. Trata-se de uma casuística com poucos indivíduos, pois é uma malformação rara, com poucos relatos na literatura.

DLMFH

Foram estudados 13 pacientes com DLMFH. Grande parte da casuística foi atendida no Ambulatório de Anomalias Craniofaciais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no período de 2001 a 2004 e avaliada dismorfologicamente por geneticista clínico com ficha padronizada de coleta de dados e investigados de acordo com a rotina dismorfológica padrão (AASE, 1990). A avaliação dismorfológica, neurológica, exames de Ressonância Magnética e, na maioria dos casos, exame de Spect foram anteriormente realizados (Giffoni, 2005). Os aspectos clínicos estão no Anexo V.

INFRA-ESTRUTURA

A primeira parte do trabalho foi desenvolvida no *Craniofacial Anomalies Research Center* da Universidade de Iowa, nos Estados Unidos, pois contava com a colaboração e apoio financeiro do grupo do Prof. Dr. Jeffrey C. Murray, com grande experiência na área. Tanto a complementação desse estudo, como os estudos moleculares dos DLMFH, foram feitos nas dependências do Laboratório de Genética Molecular também do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP, que apresenta toda a infra-estrutura necessária.

Os experimentos de citogenética molecular (*array-CGH*) foram desenvolvidos no *The Wellcome Trust Sanger Institute* com o apoio do Dr. Nigel Carter e os estudos posteriores, utilizando a técnica de *FISH* e Genotipagem Automática, foram feitos no Laboratório de Citogenética e no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética Médica da FCM/UNICAMP.

ESTUDO DOS GENES CANDIDATOS

- **Extração de DNA**

Foram colhidos de 10 a 20 ml de sangue periférico em tubos cônicos, contendo 1,0 ml de EDTA (etilenodiaminotetracetato dissódico.2H₂O) 10 % pH 8,0 como anticoagulante. Para obtenção das amostras de DNA genômico, utilizamos o método do fenol-clorofórmio (Araújo et al., 1996).

- **Amplificação dos fragmentos de interesse**

Utilizou-se a técnica de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de todos os exons e também regiões 5' e 3' não transcritas dos genes. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados com as respectivas temperaturas de anelamento (T_m) e tamanhos dos fragmentos gerados seguem em tabelas abaixo. Os componentes e

volumes das reações variaram conforme o gene e as condições de amplificação dos fragmentos seguiram o esquema da figura 9.

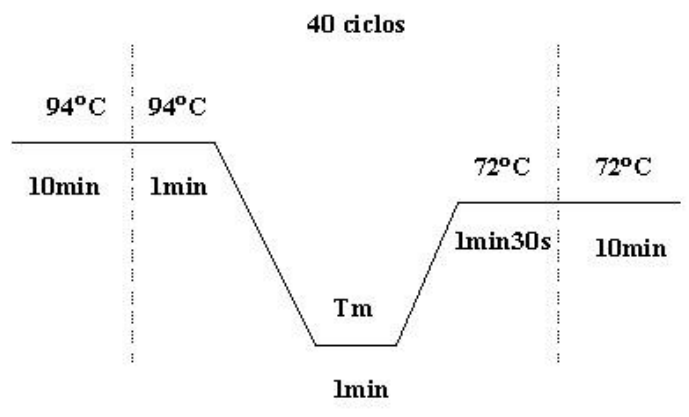


Figura 9 Esquema dos ciclos utilizados na amplificação por PCR dos fragmentos gênicos dos 5 genes primeiramente estudados.

GENES *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10* e *FOXE1* NOS PACIENTES COM BCD

► Gene *IRF6*

Para amplificação do gene *IRF6* foram utilizados 9 pares de oligonucleotídeos anteriormente descritos por Kondo et al., 2002 (tabela 2) e as reações preparadas com BIO-X-ACT™ Long DNA Polymerase (Bioline USA Inc., Taunton, MA, US), segundo recomendações dos fabricantes.

Tabela 2 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 9 fragmentos do gene *IRF6*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	Tm (°C)	Tamanho (pb)
1	forward: ATCTGGAAAAGGGCGACAGG	57	537
	reverse: AGAAGCGGAGGAGTAGGGTG		
2	forward: AAAGTTATGGAAACAGCAAC	57	382
	reverse: TTATTCTAGGGCTTCTGAGC		
3	forward: CATGCCCCCAAAGAGGAAT	57	560
	reverse: GGCTAGAGCATGAAGTGTA		
4	forward: AGGCTTTCTTGCTTTATCCA	57	512
	reverse: GCTCTGGGCAATGATAGGAC		
5	forward: TGCTTTCAGGGCAGTGGTGG	57	425
	reverse: CAGTGAATCTAGGGAGGTCC		
6	forward: TTTACTTCTTCCCTGGTGAC	57	432
	reverse: CAGTGTTTGGTTCTTGTCTA		
7	forward: CTTGACCTCCTCCAGACTAA	57	650
	reverse: AGTGGCCTTCCTGAATGATG		
8	forward: GTTTCAGCAAGACTCTAAGG	57	436
	reverse: AAAGATGGTATTTGTTGAGT		
9	forward: GTCTTCCTCAGGGCCTCTTT	57	446
	reverse: GGCATATTTGGATCACAAC		
10	forward: TCACTGTGTACCCACCAAA	57	492
	reverse: TGGGAGGAGGACCAGCTTAT		

► **Gene *P63***

Para amplificação do gene *P63* foram utilizados 13 pares de oligonucleotídeos anteriormente descritos por Vieira et al., 2005 (tabela 3) e os experimentos foram realizados tanto com protocolos do Laboratório de Iowa, como também protocolos novos desenvolvidos no Brasil.

Tabela 3 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 13 fragmentos do gene *P63*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	Tm (°C)	Tamanho (pb)
5'UTR	forward: TGTA AACGACGGCCAGTCTGGTAAGAATCGAGTGT TTTATGA reverse: CAGGAAACAGCTATGACCTGGGAAGATTCGCTTCAAAT	57	533
1	forward: TGTA AACGACGGCCAAGAAACGCTCCGCCTCT reverse: AGGAAACAGCTATGACCAAATGGGAAGATTCGCTTCA	57	474
3	forward: TGTA AACGACGGCCAGTTCCATTGGAGTGGAGGAGTC reverse: CAGGAAACAGCTATGACCCAGCCACCACAGAAAACATT	57	458
4	forward: TGTA AACGACGGCCAGTGTGAAGTGCTTCCGACGTG reverse: CAGGAAACAGCTATGACCTTTCCACCATGAACATGGAAT	57	490
5	forward: TGTA AACGACGGCCAGTAGCCTCAGCTTCTTCATGCT reverse: CAGGAAACAGCTATGACCATGCCACAGAATCTTGACC	57	537
7	forward: TGTA AACGACGGCCAGTTTGCCCTTTTAGGAGGAAGC reverse: CAGGAAACAGCTATGACCGTGAAATGCCTTGAGGACCA	57	533
9	forward: TGTA AACGACGGCCAGTCAGCAAGATAACGGGCTTTC reverse: CAGGAAACAGCTATGACCTCCTTTCCCATTGTCACAGA	57	507
10	forward: TGTA AACGACGGCCAGTTGTTTCCTTCTTTCCTTCTGC reverse: CAGGAAACAGCTATGACCTGTGTATGGACCAGGCATATAGA	57	464
11	forward: TGTA AACGACGGCCAGTAGCCTCGCAGTCAGTTTCTC reverse: CAGGAAACAGCTATGACCGTCAGAAACCCAAGCCACTC	57	501
12	forward: TGTA AACGACGGCCAGTAAGCAGAGAAAGGGGAGGAA reverse: CAGGAAACAGCTATGACCAACTCCAACCACAGGACTGC	57	520
13	forward: TGTA AACGACGGCCAGTAATCGCTGATCTGCAGGAAT reverse: CAGGAAACAGCTATGACCATAGGTTGAGGCCTGGGAAT	57	505
14	forward: TGTA AACGACGGCCAGTTGCCTTTGTGCTTAGTTCC reverse: CAGGAAACAGCTATGACCAAGCAGGAGTGCTTTTAGGG	57	543
15	forward: TGTA AACGACGGCCAGTGCCTTATCCCATTTCTTCCTC reverse: CAGGAAACAGCTATGACCTAGTGGCTTTGTGCCTTTGA	57	485

► **Gene *OSR2***

Para amplificação do gene *OSR2* foram utilizados 6 pares de oligonucleotídeos anteriormente descritos por Debeer (2002), presentes na tabela 4. As reações foram preparadas com o kit BIOLASE™ PCR (Bioline USA Inc., Taunton, MA, US), segundo recomendações dos fabricantes.

Tabela 4 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 6 fragmentos do gene *OSR2*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	T _m (°C)	Tamanho (pb)
1	forward: CCGCTACTAAAGCCCAAGAC	51	497
	reverse: CGAGAATCTGAACGCCTCT		
2a	forward: GGAGGGAGACTTAGGTGTGG	51	411
	reverse: GTGATCTCGTGACATTGG		
2b	forward: GACCATGCACATGAACCAC	51	545
	reverse: CTCCCAGCCATCCTCCTT		
3	forward: GGGGCAAAGTTATTTCAATG	48	180
	reverse: CGAACCAGCCACTGTTTTTA		
4a	forward: ATTGAAAAGGGTGCAAGTGGT	51	343
	reverse: GGGATGTAGTAGTGTGTGGCTTT		
4b	forward: TTTACTGACCCAGCTCTTC	51	330
	reverse: GCAAGACACCTTTGCAGGAG		

► **Gene *TBX10***

Para amplificação do gene *TBX10* foram utilizados 8 pares de oligonucleotídeos anteriormente descritos por Vieira et al., 2005 (tabela 5) e as reações foram preparadas seguindo mesmo protocolo descrito para o gene *OSR2*.

Tabela 5 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 8 fragmentos do gene *TBX10*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	T _m (°C)	Tamanho (pb)
5'UTR	forward: ACACAGGAAATCACAAGAGG reverse: TCGGGAGCATTTATTAGTTC	50	466
1	forward: AGATGGGAAGAGAAAAGTGGT reverse: TCGGAAATTATATCCAGGTG	51	513
1-2	forward: AGACTCGTACCAAACCTTTCC reverse: CTGGAAGCACCAAAGGAG	52	442
2	forward: TGCTTTTTATTTTCCTCCAG reverse: ACACAGGGGACCACAGTC	52	236
3	forward: GTTCAGGTCTTTTTGCTCAC reverse: GGGTAATAGCGACTGACTGT	52	324
4	forward: CTGCTTGTCTCAACCATGT reverse: CAGATCACCAATGTCAGCTA	51	264
5	forward: GTCGGAGAGAGAACTTGGAT reverse: CCTGTCTGGACTGAAGTAGG	53	332
6	forward: TTTGCCCTTTCAGTAAGAAG reverse: ACTGCAGAAGGATTCACTTG	52	361
7	forward: CTGATGAACTTTTGCACTGA reverse: TCAGGGAATTGAATATTTGG	50	355
8	forward: TCTGGATCTCTCTGCATTTT reverse: TTGAGTTTATCTCCCTTCCA	52	351
9-10	forward: CTAAAAAGCTGCGTGTGTTT reverse: ACAAGCAAATGGAATGTTCT	50	404

► Gene *FOXE1*

Para amplificação do gene *FOXE1* foram utilizados 3 pares de oligonucleotídeos anteriormente descritos por Castanet (2002), listados na tabela 6. As reações foram preparadas tanto com o protocolo utilizando o kit BIOLASE™ PCR (Bioline USA Inc., Taunton, MA, EUA), segundo recomendações dos fabricantes, como também com a Taq DNA Polymerase (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA), que possui o Q-solution como aditivo para melhorar a amplificação de fragmentos ricos em GCs.

Tabela 6 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 3 fragmentos do gene *FOXE1*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	T _m (°C)	Tamanho (pb)
1	forward: CTGAGCTCTCCGCAGAAGG	57	589
	reverse: GTAAGCCGGGTAGGTGGAGA		
2	forward: GCGGAGGACATGTTCGAGA	57	589
	reverse: ACGTGCGCCCGTAGAAGT		
3	forward: CTACCACCACCGGCTACCAG	59	405
	reverse: GAACGTGTGAACAGCCGATG		

Sequenciamento Automático

Todos os fragmentos obtidos foram diretamente sequenciados utilizando o kit de sequenciamento Big Dye Terminator Cycle v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os componentes e volumes da reação estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 Componentes e volumes utilizados nas reações de sequenciamento.

Reagente	Volume
H ₂ O	q.s.q 10µl
Big Dye	0,25µl
Tampão (5X)	1µl
PCR	1µl (200ng)
primer	0,5µl (5pmoles)
DMSO ₄	0,5µl

Para a realização da amplificação foram utilizados ciclos seguindo o esquema da figura 10.

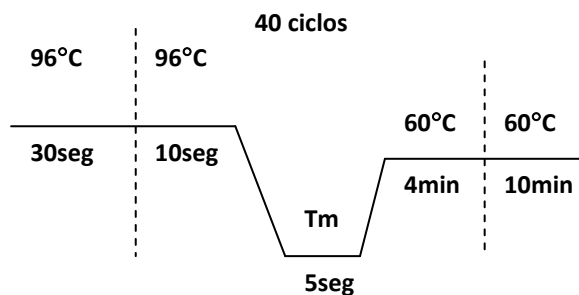


Figura 10 Ciclos e temperaturas utilizados na reação de seqüenciamento dos 5 genes. A temperatura de anelamento utilizada (T_m) foi a mesma das PCRs.

Depois de prontas, as reações foram purificadas utilizando-se isopropanol e etanol com o intuito de se removerem os nucleotídeos marcados não incorporados.

Foi utilizado o sequenciador ABI Prism™ 3730 (Perkin Elmer, Boston, MA, EUA) para a determinação da sequência linear dos fragmentos anteriormente amplificados.

Os cromatogramas foram transferidos para uma estação Unix (Sun Microsystems Inc., Mountain View, CA, EUA), as bases nomeadas com PHRED (versão 0.961028), alinhadas com

PHRAP (version 0.960731), escaneadas pelo POLYPHRED (versão 0.970312) e os resultados observados no programa CONSED (versão 4.0) (Nickerson et al., 1997).

GENES CANDIDATOS SHH, FGF8 e PAX3 NOS PACIENTES COM BCD E DLMFH

► Gene SHH

Para amplificação da região promotora e dos 3 exons do gene *SHH* foram utilizados 9 pares de oligonucleotídeos (tabela 8) desenhados utilizando o software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Na elaboração das reações também foi necessária a utilização do mesmo protocolo do gene *FOXE1*, pelo gene ser rico em GCs.

Tabela 8 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 9 fragmentos do gene *SHH*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	Tm (°C)	Tamanho (pb)
5'UTR	forward: GCTGTGCCCCTCAAATGT	58	401
	reverse: CTGGAGAGCTTGTGAGAGAG		
5'UTR2	forward: GGTGAAAATAAAGCAACAGC	60	401
	reverse: CTCTCTCTTGCGCTTTCC		
1	forward: GGGCAAGGTTATATAGGAAGA	60	233
	reverse: ATACCAGCAGCGAGGAGA		
1-2	forward: ACAGCTCGGAAGTCATCA	60	396
	reverse: GTGTTGCGCTTCTCGTAAC		
2	forward: AAATGCTGTCCCTCTTCC	60	419
	reverse: GTAGTACACCCAGTCGAAGC		
2-2	forward: AGAGGAGTCTCTGCACTACG	60	243
	reverse: CCCAGGTTTCTTTTCTCTT		
3	forward: CTCTTCTTCCCTTCTCCTC	60	235
	reverse: TCTCGATCACGTAGAAGACC		
3-2	forward: TCTACAGCGACTTCCTCACT	60	552
	reverse: GAGCGGTTAGGGCTACTCT		
3-3	forward: GCACCATTCTCATCAACC	60	418
	reverse: CTTTCCGAGTGTCTTTTG		

► **Gene *FGF8***

Para amplificação da região promotora e dos 5 exons do gene *FGF8* foram utilizados 10 pares de oligonucleotídeos anteriormente descritos por Yoshiura et al., 1997 (tabela 9).

Tabela 9 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 10 fragmentos do gene *FGF8*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	Tm (°C)	Tamanho (pb)
1	forward: ACCCGCACCTCTCCGCT	58	269
	reverse: CCTCACCTGGGCTTGG		
2	forward: GTTGCACTTGCTGGTCTCT	60	218
	reverse: CAGGAGGGGTGCTACCTCT		
3	forward: ACCGGGACTGACTCTGCGG	60	215
	reverse: CGGCTGGGTGAACCCTATG		
4	forward: CTCTCAACATTTGCTCCGTA	60	243
	reverse: CCCACCCACGCAAGTCGG		
5	forward: CTGGCGGCTTGGGGCAGT	60	222
	reverse: CCGCTGGTGCGGCTGTAGA		
6	forward: GAGCCTGGTGACGGATCAGC	60	203
	reverse: CGGCCAGTGCAAGTTGGGAC		
7-8	forward: TTTGGAGCAGTTGCTGCTGG	60	175
	reverse: TGTTTCATGCAGATGTAGAGGC		
8-9	forward: CGTGGAGACGGACACCTTTG	60	198
	reverse: TACCTTGTTGGGATCAGAGCC		
10	forward: GGGTGCCACCTGCTGTCT	60	236
	reverse: TGGTGCTGCCGCGTCTTGG		
11	forward: GCTGGTACATGGCCTTCACC	60	245
	reverse: TCTCTGCGGTCTGGCATTGT		

► **Gene *PAX3***

Para amplificação da região promotora e dos 10 exons do gene *PAX3* foram utilizados 11 pares de oligonucleotídeos desenhados também com o software Primer3 (tabela 10).

Tabela 10 Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos 11 fragmentos do gene *PAX3*.

Fragmento	Sequência do primer (5'-3')	T _m (°C)	Tamanho (pb)
5'UTR	forward: ACACAGGAAATCACAAGAGG	50	466
	reverse: TCGGGAGCATTTATTAGTTC		
1	forward: AGATGGGAAGAGAAAGTGGT	51	513
	reverse: TCGGAAATTATATCCAGGTG		
1-2	forward: AGACTCGTACCAAACCTTTCC	52	442
	reverse: CTGGAAGCACCAAAGGAG		
2	forward: TGCTTTTTATTTTCCTCCAG	52	236
	reverse: ACACAGGGGACCACAGTC		
3	forward: GTTCAGGTCTTTTTGCTCAC	52	324
	reverse: GGGTAATAGCGACTGACTGT		
4	forward: CTGCTTGTCTCAACCATGT	51	264
	reverse: CAGATCACCAATGTCAGCTA		
5	forward: GTCGGAGAGAGAACTTGGAT	53	332
	reverse: CCTGTCTGGACTGAAGTAGG		
6	forward: TTTGCCCTTTCAGTAAGAAG	52	361
	reverse: ACTGCAGAAGGATTCACTTG		
7	forward: CTGATGAACTTTTGCACTGA	50	355
	reverse: TCAGGGAATTGAATATTTGG		
8	forward: TCTGGATCTCTCTGCATTTT	52	351
	reverse: TTGAGTTTATCTCCCTTCCA		
9-10	forward: CTAAAAAGCTGCGTGTGTTT	50	404
	reverse: ACAAGCAAATGGAATGTTCT		

Sequenciamento automático

Todos os fragmentos obtidos foram diretamente sequenciados. Para tanto foi necessária uma purificação anterior com a enzima Exo-Sap (GE Healthcare, EUA) de acordo com as recomendações dos fabricantes, no intuito de se removerem restos de oligonucleotídeos, DNTPs, etc., que pudessem atrapalhar a qualidade da reação. Utilizou-se o kit de sequenciamento para MegaBACE 1000 DYEnamic ET (Amersham Biosciences, UK). Os componentes e volumes da reação estão na tabela 11 e o esquema dos ciclos utilizados na figura 11.

Tabela 11 Componentes e volumes utilizados nas reações de sequenciamento para MegaBACE.

Reagente	Volume
H ₂ O	q.s.q. 10µl
Pré-mix	4,0µl
Primer	1,0µl (5pmoles)
PCR tratado	2,0µl

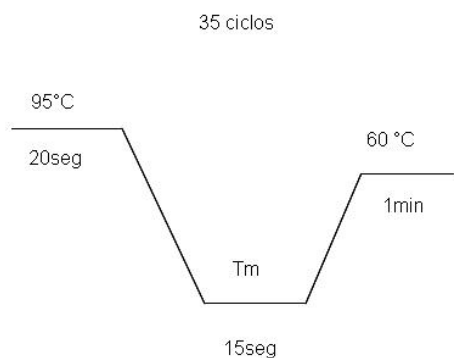


Figura 11 Esquema dos ciclos utilizados na reação de sequenciamento para MegaBACE. As temperaturas de anelamento de cada fragmento dos genes foram as mesmas das PCRs.

Posteriormente as reações foram purificadas utilizando-se acetato de amônia e etanol, também para remover as impurezas que poderiam atrapalhar o sequenciamento.

As reações foram submetidas ao sistema de eletróforo capilar MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences, UK) para a determinação da sequência linear dos fragmentos anteriormente amplificados.

As sequência foram analisadas utilizando os programas Chromas (Technelysiun Pty Ltd) ou FinchTV (Geospiza, Inc.) e o GeneRunner (Hastings Software, Inc.).

- **Bancos de dados**

Alterações não sinônimas, que causam substituição de um único aminoácido na sequência protéica, podem ou não alterar a função e a estrutura da proteína. Seguindo as recomendações para interpretação de alterações gênicas (ACMG recommendations, 2000), as trocas de bases encontradas nos genes foram pesquisadas em bancos de dados genéticos para verificação de descrições anteriores.

O primeiro tipo de banco utilizado foi de polimorfismos ou SNPs, principalmente o *Single Nucleotide Polymorphism database* (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>), para verificar se a alteração era comumente encontrada na população e o segundo tipo de banco pesquisado foi de mutações como o *Human Gene Mutation database* (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

ESTUDO DA DELEÇÃO 22q11.2 POR FISH

Para investigação da amostra, foi utilizada uma sonda tipo locus específica para a região 22q11.2 – DiGeorge/VCFS, *HIRA/TUPLE1* locus (Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA) de 120 Kb espectro *orange* e uma sonda controle telomérica banda 22q13 espectro *green*. A visualização dos cromossomos foi realizada em microscópio de epifluorescência Olympus (BX51-BF-II/BX2[®]) utilizando um sistema automático para análise de imagem.

Para a realização da técnica, foram utilizadas suspensões de linfócitos de sangue periférico. Essas células foram estocadas em solução de metanol e ácido acético 3:1 a -20°C e depois utilizadas para preparação de lâminas.

Para cada caso foram analisados 20 metáfases e 50 núcleos. A deleção deveria ser considerada verdadeira se todas as metáfases analisadas apresentassem hibridação da sonda controle em ambos os cromossomo 22 e da sonda teste em apenas 1 cromossomo 22.

Esse estudo foi objeto de tese anterior, tendo sido desenvolvido por Simioni (2008).

INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS PELA TÉCNICA DE *array-CGH*

Para a investigação de possíveis alterações cromossômicas foram utilizadas lâminas ou plataformas *Whole Genome Tiling Path* (WGTP), contendo cerca de 30000 insertos clonados que cobrem todo genoma (Fiegler et al., 2007). As informações sobre todos os clones e suas localizações podem ser obtidas no banco de dados do site do *The Wellcome Trust Sanger Institute* (Ensembl genome Browser: <http://www.ensembl.org/>).

- **Marcação do DNA por *random priming***

Antes dos DNAs referência-controle e dos pacientes serem hibridados nos chips, estes foram amplificados e marcados com fluoróforos de cores diferentes para serem detectados pelo laser do scanner. Para tanto utilizamos o kit *ENZO Labeling* (ENZO, UK) e os fluoróforos cyanine 3 (Cy3-dCTP) e cyanine 5 (Cy5-dCTP) (Amersham Biosciences, UK).

- **Lavagem e precipitação das amostras de DNA marcadas**

Após a marcação dos DNAs, esses foram purificados, utilizando-se colunas Microcon YM30 (Millipore/Amicon) para a retirada dos nucleotídeos não incorporados e tratados com Cot-1 DNA humana, com o intuito de se bloquearem ligações inespecíficas e seguiu-se a precipitação das amostras com acetato de sódio e etanol. Por fim as amostras foram ressuspensas em um tampão apropriado para pré-hibridação.

- **Hibridação**

As sondas (DNAs marcados) foram hibridadas às plataformas em uma estação de hibridação Tecan (Hs.4800, Tecan Inc.) na qual um sistema automatizado desnatura as amostras e promove várias lavagens subsequentes e uma secagem final para seguinte escaneamento das lâminas. Todos os experimentos foram feitos em duplicidade, mas com a marcação reversa (*dye swap*).

- **Escaneamento das lâminas**

Para coleta dos dados foram utilizados o scanner da Agilent e o software Agilent Feature Extraction (ambos da Agilent Technologies).

- **Análise das imagens e dados**

Para analisar os dados obtidos utilizou-se o software *BlueFuse for Microarrays Software Package* (BlueGnome, Cambridge, UK), com o qual se obteve as intensidades das fluorescências e os dados estatísticos (log2 ratio). Com o *Bluefuse* a análise completa do experimento pode ser observada: a extração da intensidade de cada *spot*, visualização, análise estatística dos resultados e um display gráfico dos resultados. Todos os resultados foram depois, analisados no Microsoft Excel.

- **Confirmação dos resultados pela técnica de Genotipagem Automática e FISH**

A comprovação das alterações cromossômicas observadas foi realizada por outro método. Como apenas os propósitos foram testados, no caso de alguma alteração era realizado o teste dos genitores com as mesmas técnicas de confirmação.

Genotipagem Automática

Para confirmar uma alteração encontrada no paciente DLMFH1 foi utilizada a técnica de genotipagem automática.

Foi realizada a PCR para a amplificação dos marcadores polimórficos de DNA de acordo com protocolos previamente padronizados no laboratório e utilizando oligonucleotídeos marcados com moléculas fluorescentes (FAM, VIC e NED). O número, localização e a porcentagem de heterozigose dos marcadores do tipo microsatélites foram obtidos a partir do

banco de dados GENETHON (<http://www.genethon.fr>) ou do GENOME DATABASE (<http://www.gdb.org>). As amostras foram posteriormente submetidas à eletroforese capilar em equipamento MegaBACE 1000.

Para a confecção da genotipagem foram utilizados 7 pares de marcadores (tabela 12), localizados tanto dentro da região, como fora dela. E foram testadas as três gerações da família.

Tabela 12 Marcadores utilizados para comprovação da deleção 2q36.1-2q36.3.

Marcador	Lócus	Heterozigose	Fragmentos amplificados (pb)
D2S126	2q36.1	0,8250	133-137
D2S2197	2q36.1	0,7200	130-142
D2S133	2q36.1	0,6898	230-238
D2S2354	2q36.3	0,800	264-270
D2S2308	2q36.3	0,8410	181-233
D2S362	2q36.3	0,7704	106
D2S396	2q36.3	0,8348	237-241

Os resultados foram analisados por meio do software *MegaBACE™ Fragment Profiler* v2.1 (GE Healthcare, EUA). A determinação do tamanho dos fragmentos amplificados é dada pela visualização dos picos de fluorescência. Após a visualização do tamanho dos fragmentos, foram determinados os genótipos de cada um dos membros da família analisados para a determinação da perda de heterozigose.

FISH

A técnica de hibridação *in situ* com fluorescência (*FISH*) baseia-se na capacidade de hibridação de sondas de DNA, marcadas por fluorescências, às sequências que lhes são complementares no DNA genômico, permitindo sua visualização e análise. No caso, as deleções ou duplicações encontradas no *array-CGH* podem ser diretamente ligadas a clones genômicos específicos e esses usados como sonda no experimento de *FISH*.

Para a realização da técnica foram utilizadas suspensões de linfócitos de sangue periférico e clones da biblioteca de BACs RPCI (<http://www.chorio.org/bacpac>), marcados diretamente e indiretamente. Os BACs foram adquiridos junto ao Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências da USP.

Cultura e extração de DNA

Inicialmente foi realizada uma cultura em meio LB com antibiótico dos BACs, seguida de extração de DNA. Essa foi realizada utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

Marcação das sondas por método direto

As sondas foram marcadas por moléculas repórteres Fluorescein-12-dUTP ou Tetramethyl-rhodamine-6-dUTP pelo processo de *nick translation* (Feinberg e Vogelstein, 1983), utilizando-se o kit *Nick Translation Mix* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA).

As sondas foram suprimidas com *Cot-1 DNA*, pois contêm DNA genômico e, conseqüentemente, sequências repetitivas que irão hibridar inespecificamente nos cromossomos se não forem suprimidas, e, posteriormente precipitadas com acetato de sódio e etanol. Por fim foram ressuspensas em meio de hibridação, desnaturadas a 90° C e pré-aneladas a 37° C.

Hibridação e preparação pós-hibridação

Foram aplicados 10µl da sonda nas lâminas previamente preparadas e também desnaturadas. As lâminas foram seladas e incubadas em estufa por 24-48 horas a 37º C.

A seguir as lâminas foram lavadas e 10 µL de solução de detecção Dapi II (Vysis Inc., Downers Grove, IL, EUA) foi aplicada sobre a área de hibridação.

Análise dos resultados

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência da Olympus® com filtros de fluorescência adequados e as imagens capturadas utilizando-se o software *FISHView* (Applied Spectral Imaging).

- **Bancos de dados**

Assim como nas alterações encontradas pelo método de sequenciamento, as alterações cromossômicas também foram pesquisadas em bancos de dados para verificação de descrições anteriores, análise dos genes contidos nas regiões, entre outras coisas.

Para descrições de casos anteriores foram utilizados principalmente o *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Abberations* (ECARUCA) (<http://www.ecaruca.net>), o *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation>) e o *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* (DECIPHER) (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>). Para verificação dos CNVs foi utilizado o banco de dados do projeto HapMap (<http://www.hapmap.org/>). Outros bancos utilizados podem ser encontrados no corpo do texto ou nas referências.

RESULTADOS

ESTUDO DOS GENES CANDIDATOS *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10* e *FOXE1* NOS PACIENTES COM BCD

► **Gene *IRF6***

Os protocolos para a amplificação dos fragmentos do gene *IRF6* foram os mesmos anteriormente padronizados para a busca por mutações nos pacientes com Síndrome de van der Woude (Kondo et al., 2002). Na figura 12 temos um demonstrativo de amplificação de todos os fragmentos de gene utilizando amostras controle.

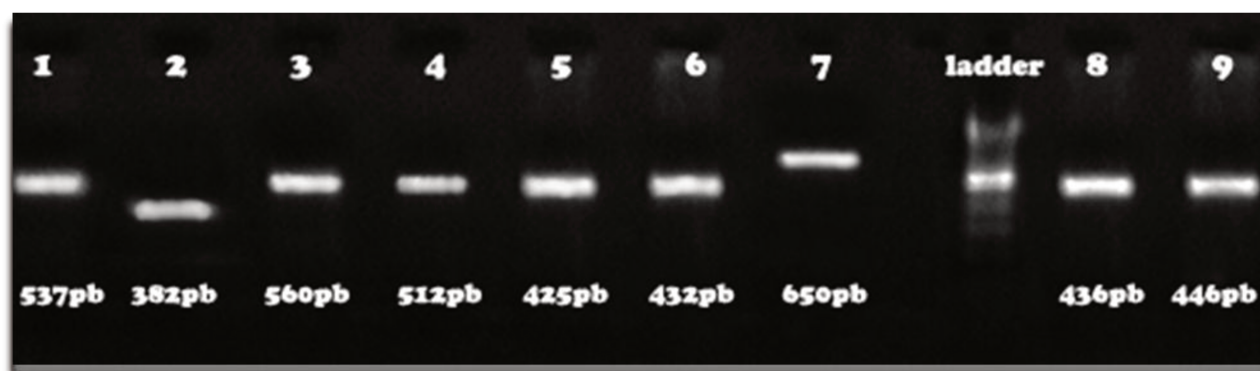


Figura 12 Demonstrativo da amplificação dos 9 fragmentos do gene *IRF6* utilizando amostras controle em gel de agarose 2%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

A análise dos sequenciamentos da região promotora, do exon 5 e introns 6 e 7 do gene *IRF6* mostrou algumas alterações e diferenças entre os indivíduos analisados. Os resultados desses sequenciamentos seguem em figuras abaixo (figuras 13, 14, 15 e 16).

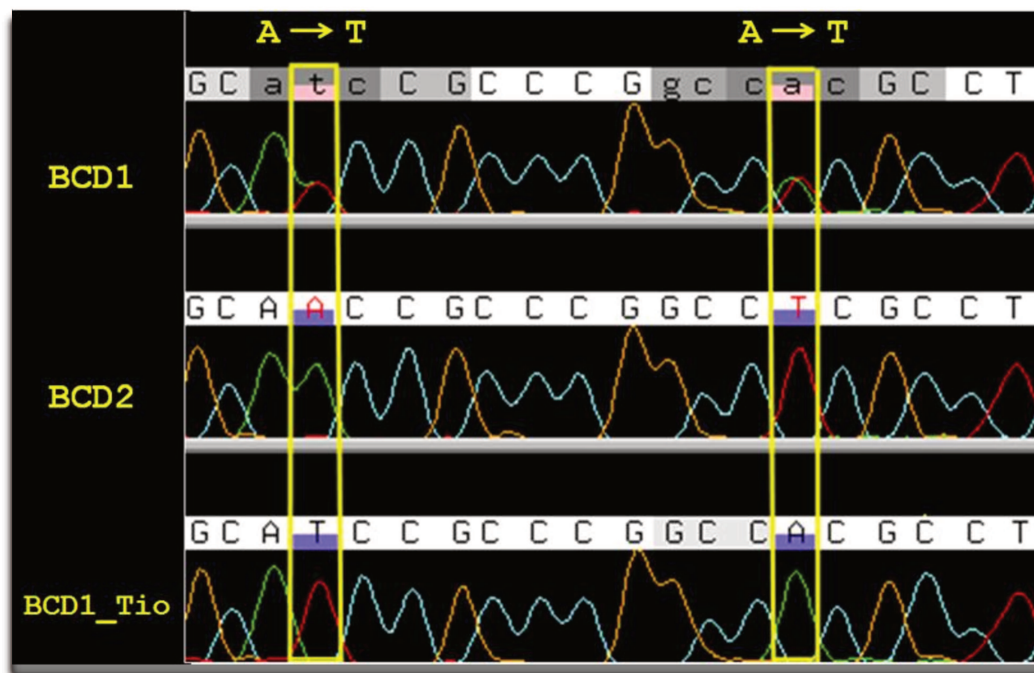


Figura 13 Alterações encontradas na região promotora do gene *IRF6*. Duas tocas A>T (rs34743335 e rs12403006).

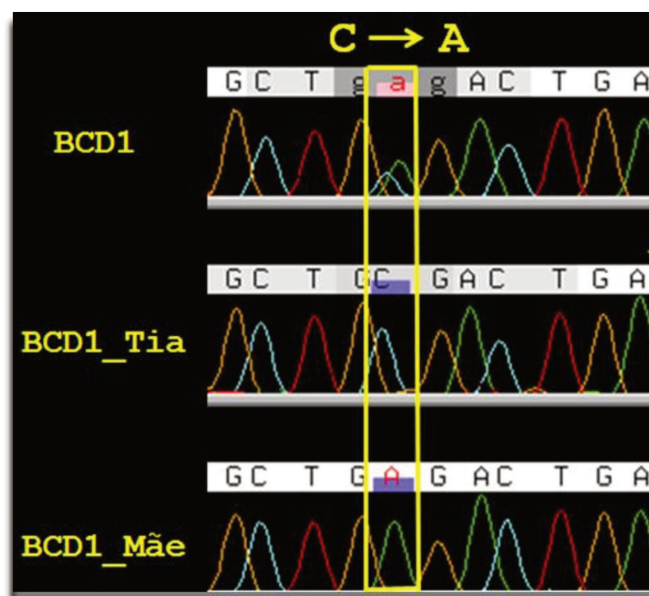


Figura 14 Alteração encontrada no exon 5 do gene *IRF6*. Troca C>A (rs2013162).

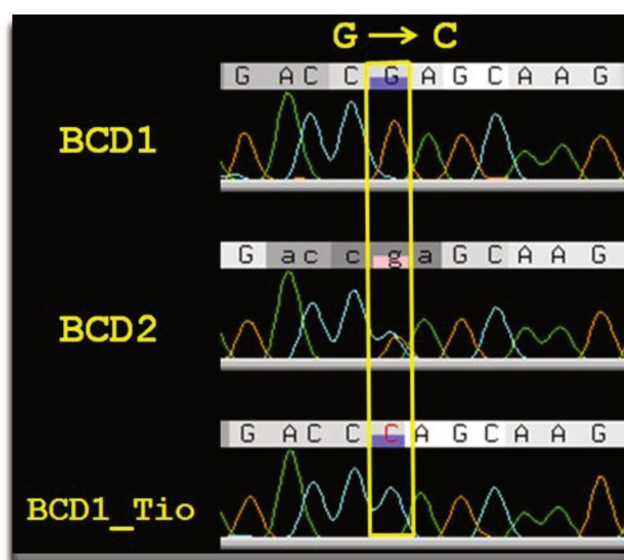


Figura 15 Alteração encontrada no intron 6 do gene *IRF6*. Troca G>C (rs2235375).

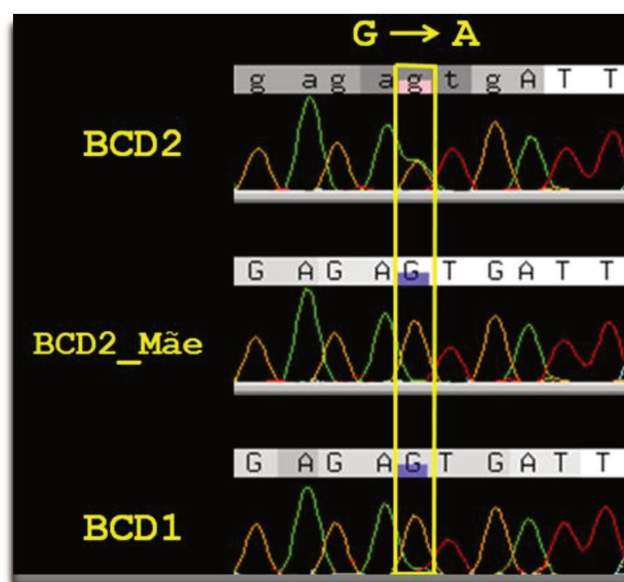


Figura 16 Alteração encontrada no intron 7 do gene *IRF6*. Troca G>A (rs2235373).

► Gene *P63*

A amplificação de todos os fragmentos do gene *P63* utilizando amostras controle podem ser visualizados na figura 17.

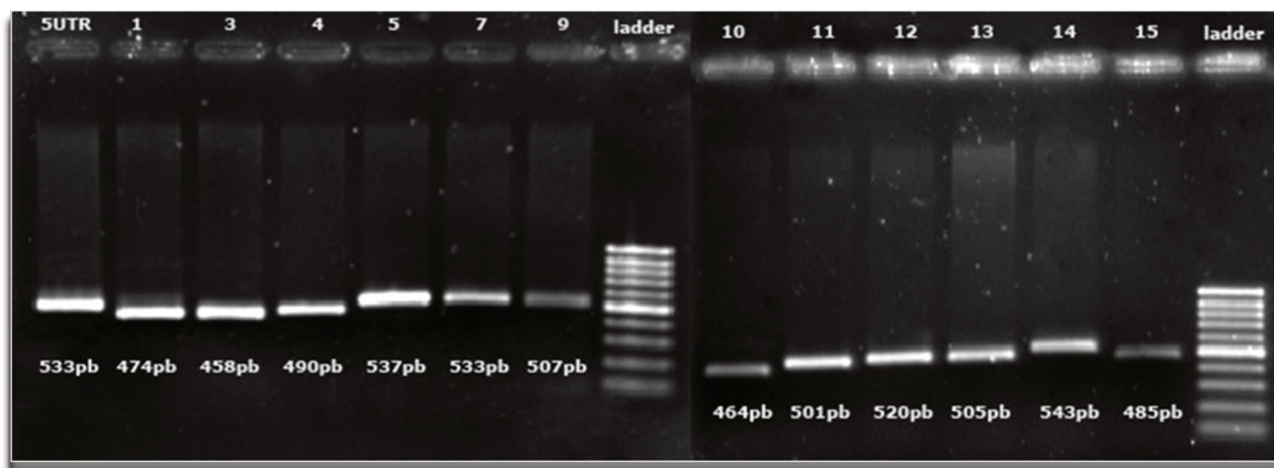


Figura 17 Demonstrativo da amplificação dos 13 fragmentos do gene *P63* utilizando amostras controle em gel de agarose 1%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

A análise dos sequenciamentos mostrou algumas alterações nas sequências dos introns 8, 9 e 10. Os resultados desses sequenciamentos seguem nas figuras 18, 19 e 20.

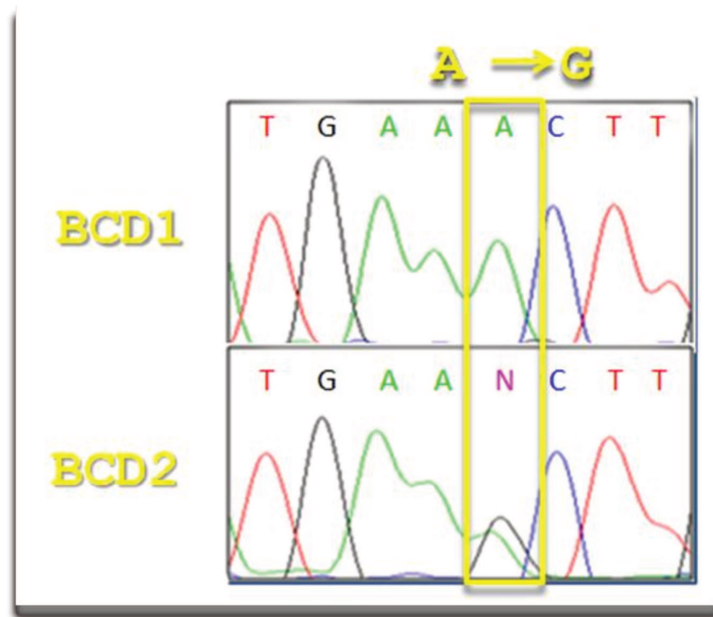


Figura 18 Alteração encontrada no intron 8 do gene *P63*. Troca A>G (rs67899661).

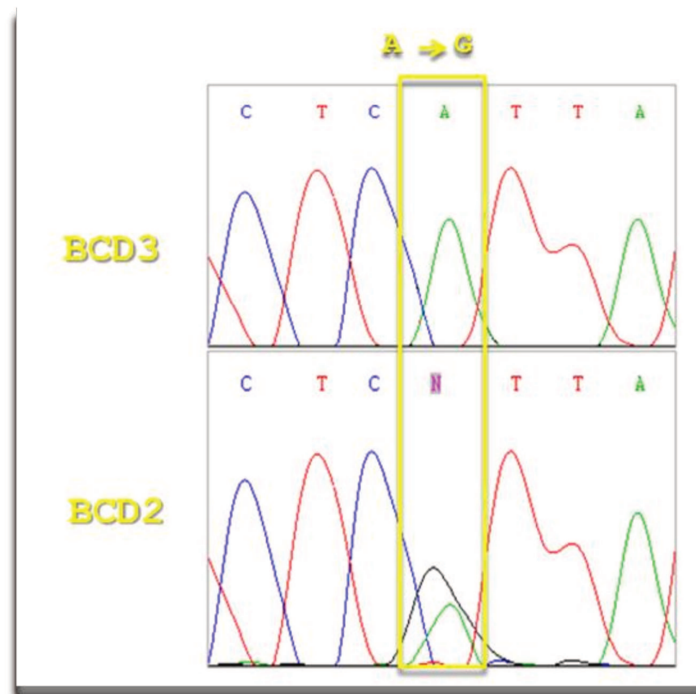


Figura 19 Alteração encontrada no intron 9 gene *P63*. Troca A>G (rs6790167).

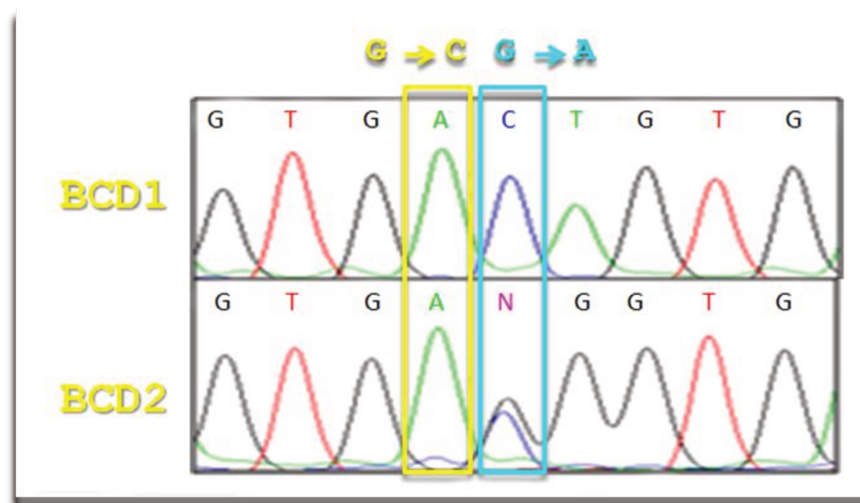


Figura 20 Dupla alteração encontrada no intron 10 do gene *P63*. Troca G>C (rs9840359) e G>A (rs9840360).

► Gene *OSR2*

A figura 21 demonstra amplificação dos fragmentos do gene *OSR2* utilizando amostras controle.

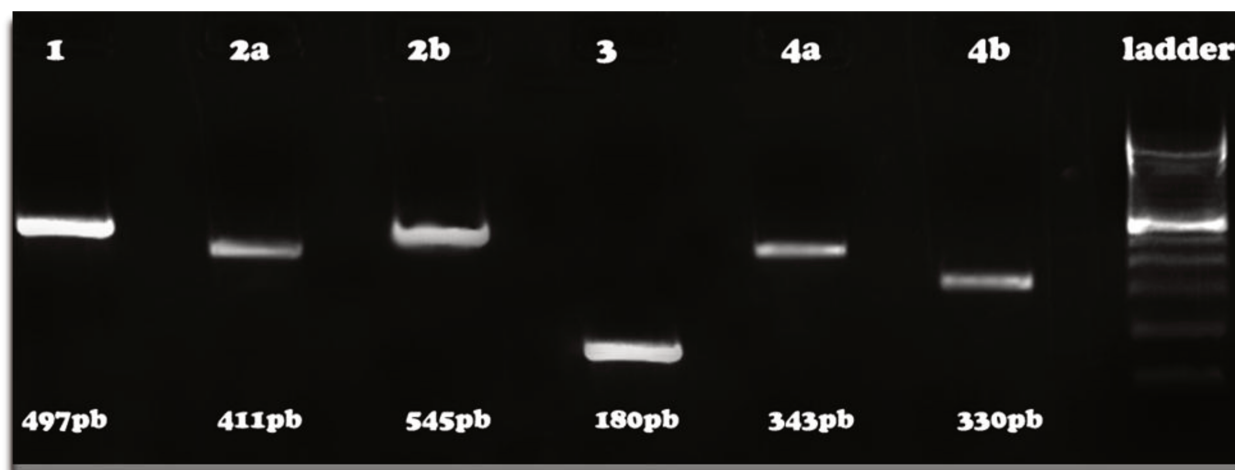


Figura 21 Demonstrativo da amplificação dos 6 fragmentos do gene *OSR2* utilizando amostras controle em gel de agarose 2%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

A análise dos sequenciamentos mostrou uma alteração na sequência do exon 1 do gene *OSR2* (figura22).

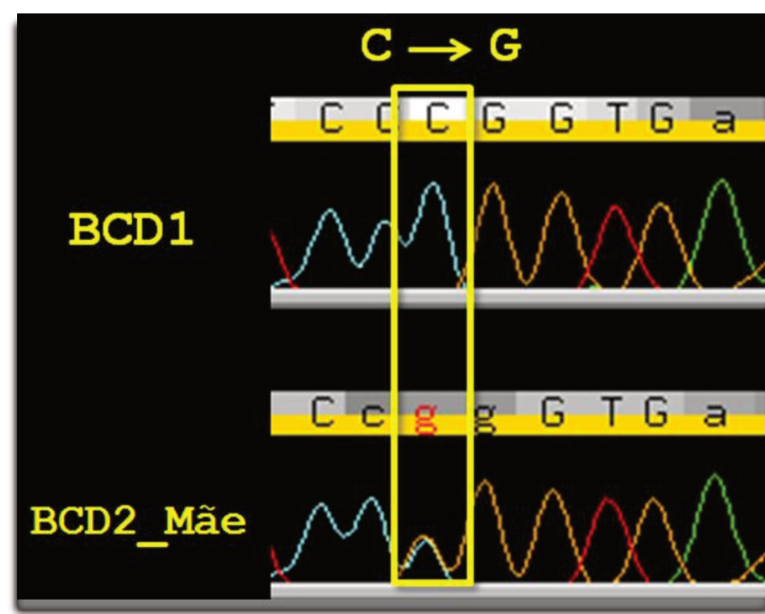


Figura 22 Alteração encontrada no exon 1 do gene *OSR2*. Troca C>G (rs4735586).

► Gene *TBX10*

O demonstrativo da amplificação de todos os fragmentos do gene *TBX10* em amostras controle encontra-se na figura 23.

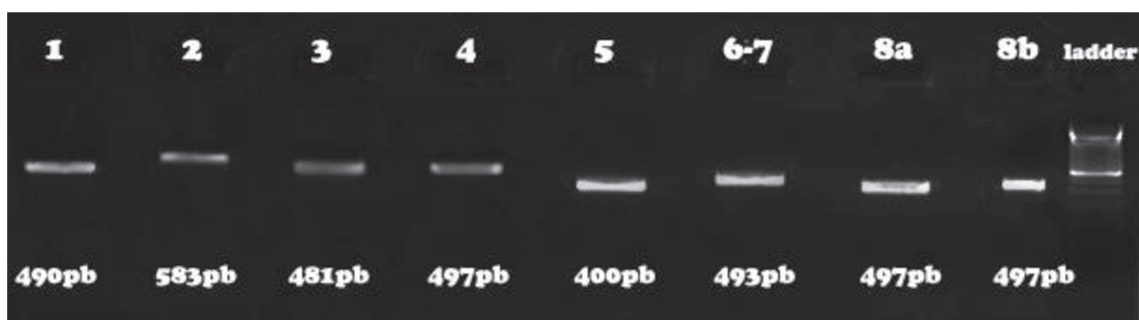


Figura 23 Demonstrativo da amplificação dos 8 fragmentos do gene *TBX10* utilizando amostras controle em gel de agarose 2%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

A análise dos sequenciamentos mostrou algumas alterações nas sequências do exon 3 e 5 (figuras 25 e 28), intron 2, 3 e 4 (figuras 24, 26 e 27) do gene *TBX10*.

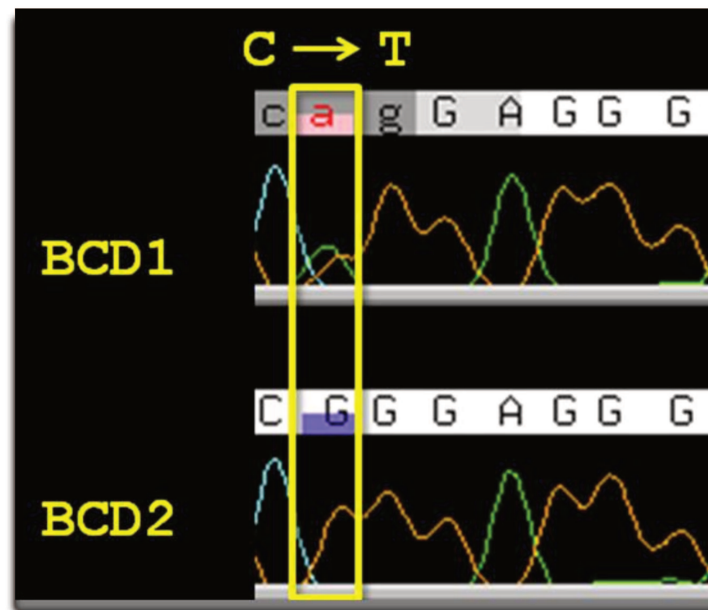


Figura 24 Alteração encontrada no intron 2 do gene *TBX10*. Troca C>T (rs12291861).

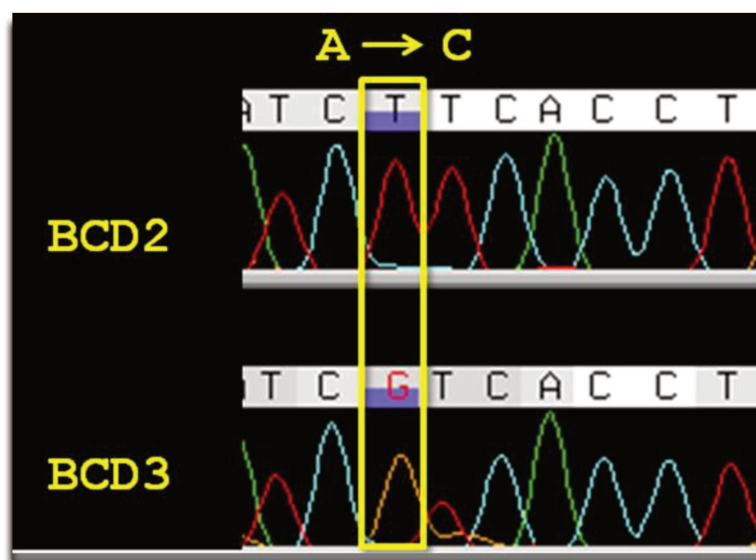


Figura 25 Alteração encontrada no exon 3 do gene *TBX10*. Troca A>C (rs3758938).

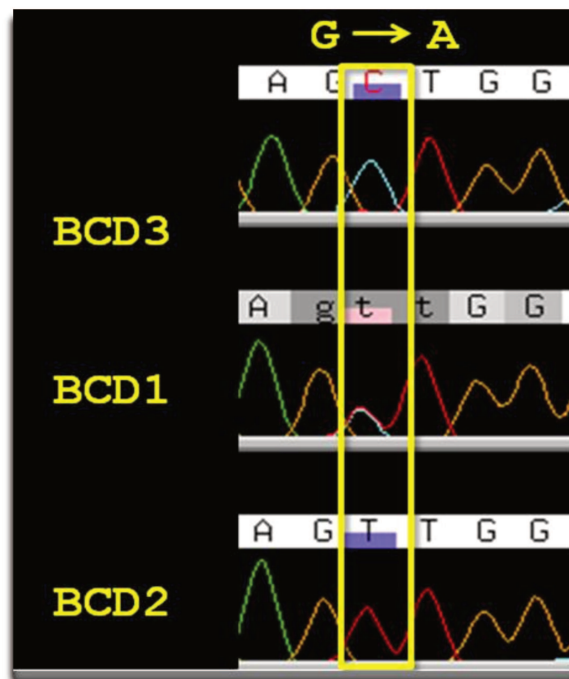


Figura 26 Alteração encontrada no intron 3 do gene *TBX10*. Troca G>A (rs2514022).

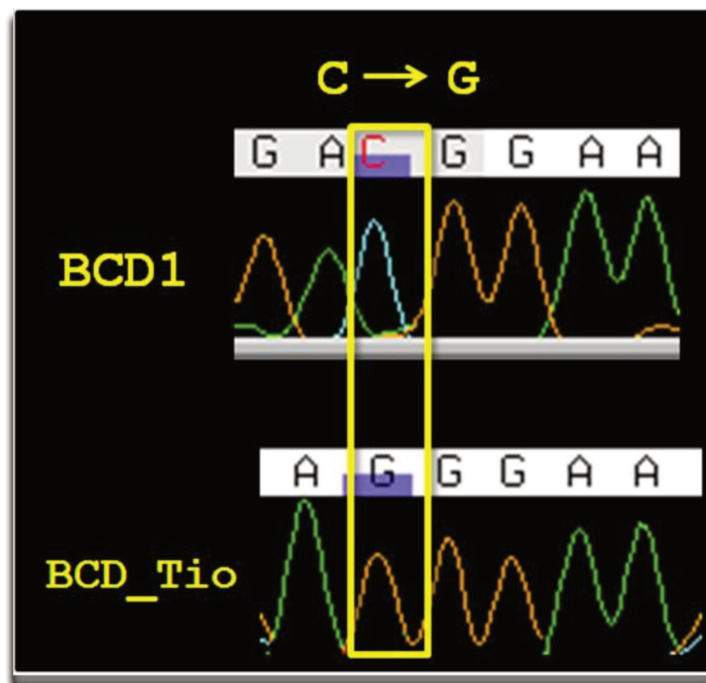


Figura 27 Alteração encontrada no intron 4 do gene *TBX10*. Troca C>G (rs12787511).

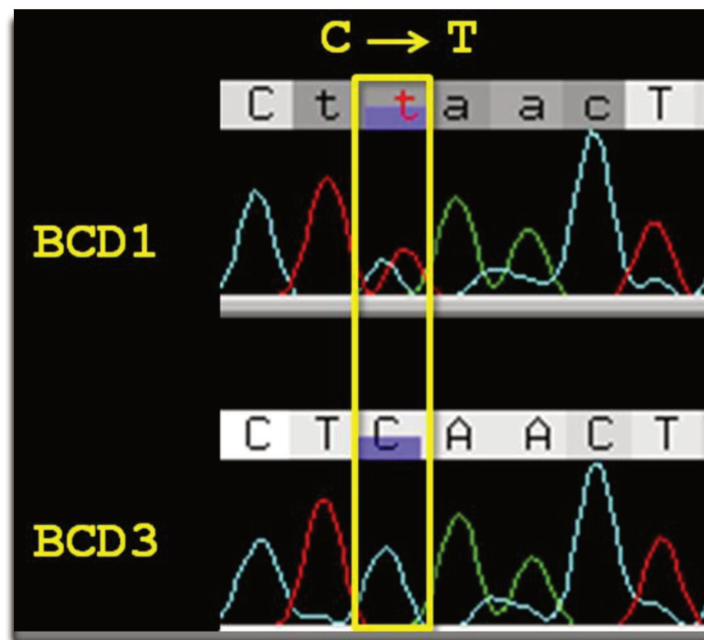


Figura 28 Alteração encontrada no exon 5 do gene *TBX10*. Troca C>T (rs11227870).

► **Gene *FOXE1***

O demonstrativo da amplificação de todos os fragmentos do gene *FOXE1* dos propósitos da BCD encontra-se na figura 29.

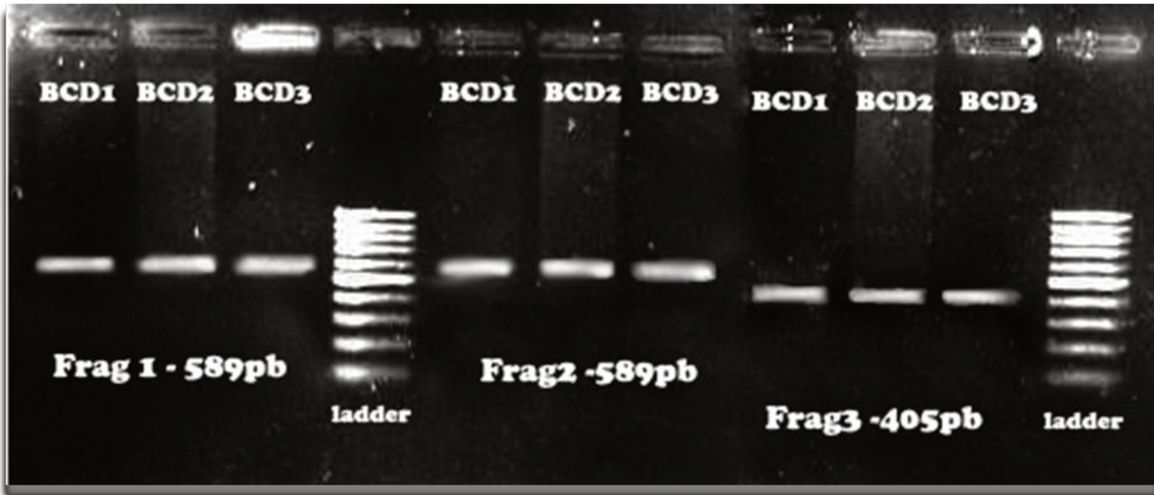


Figura 29 Demonstrativo da amplificação dos 3 fragmentos do gene *FOXE1* utilizando os três propósitos da casuística de BCD, em gel de agarose 1%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

A análise dos sequenciamentos mostrou apenas uma alteração na sequência do exon 1 do gene *FOXE1* (figura 30).

Abaixo, na tabela 13, segue o resumo de todas as alterações encontradas nos genes pesquisados.

Tabela 13 Polimorfismos encontrados nos genes pesquisados: *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10* e *FOXE1*.

Gene	Posição	SNP	Troca	Sequência
<i>IRF6</i>	Promotor	rs34743335	A>T	GGGAGGCG <u>T</u> GGCCGGGC
<i>IRF6</i>	Promotor	rs12403006	A>T	CCGGGCGG <u>A</u> TGCGAAGG
<i>IRF6</i>	Exon 5	rs2013162	C>A	GATCAGTC <u>G</u> CAGCACCA
<i>IRF6</i>	Intron 6	rs2235375	G>C	TTCTTGCT <u>C</u> GGTCTTCT
<i>IRF6</i>	Intron 7	rs2235373	G>A	GGGAATCA <u>C</u> TCTCTGGA
<i>P63</i>	Intron 8	rs6789961	A>G	AGGATGAA <u>A</u> CTTGCATT
<i>P63</i>	Intron 9	rs6790167	A>G	ATCATCTC <u>A</u> TTATCTGT
<i>P63</i>	Intron 10	rs9840359	G>C	ATGAGTGAG <u>G</u> GGTGACTT
<i>P63</i>	Intron 10	rs9840360	G>A	TGAGTGAG <u>G</u> GTGACTTT
<i>OSR2</i>	Exon 1	rs4735586	C>G	ACCTCACCC <u>G</u> GGAGTCGA
<i>TBX10</i>	Intron 2	rs12291861	C>T	CTCCCTCC <u>C</u> GCAGGAGG
<i>TBX10</i>	Exon 3	rs3758938	A>C	CCAGGTGA <u>A</u> GATCCTGG
<i>TBX10</i>	Intron 3	rs2514022	G>A	GCAGCCCA <u>G</u> CTCAGGGT
<i>TBX10</i>	Intron 4	rs12787511	C>G	GCCCTTCC <u>C</u> TCCCCACC
<i>TBX10</i>	Exon 5	rs11227870	C>T	ATCATTCT <u>C</u> AACTCTAT
<i>FOXE1</i>	Exon 1	rs3021526	C>T	AACCCCTC <u>C</u> GCCTATGC

ESTUDO DE GENES CANDIDATOS: *SHH*, *FGF8* e *PAX3*

► Gene *SHH*

O demonstrativo da amplificação de todos os fragmentos do gene *SHH* em amostras controle apresenta-se na figura 32.

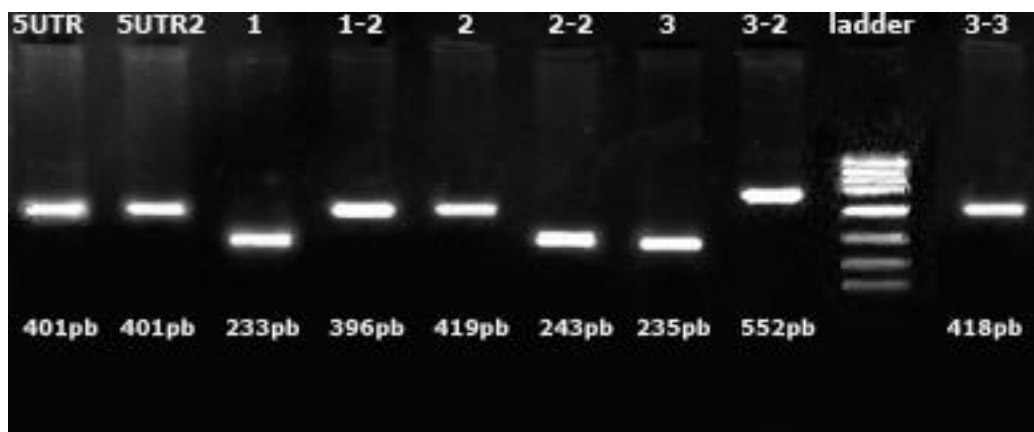


Figura 32 Demonstrativo da amplificação dos 9 fragmentos do gene *SHH* utilizando amostras controle em gel de agarose 1%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

A análise dos sequenciamentos mostrou algumas alterações nas sequências da região 5'UTR (figura 33), do exon 1 (figura 34) e intron 1 (figura 35).

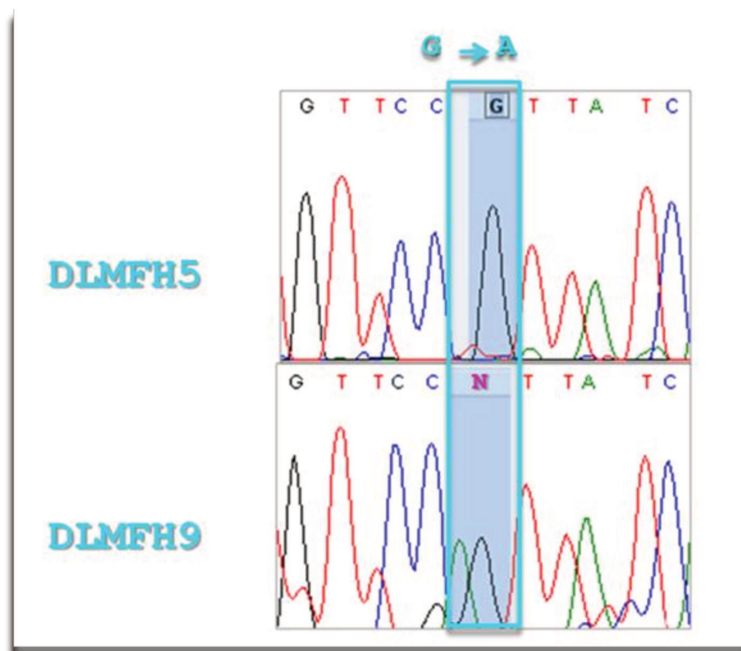


Figura 35 Alteração encontrada na região 5'UTR do gene *SHH*. Troca G>A (rs9333592)

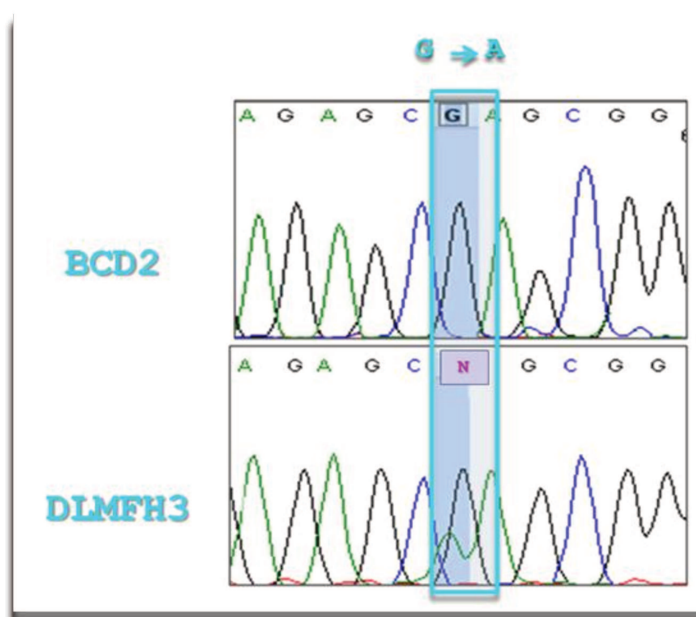


Figura 34 Alteração encontrada no exon 1 do gene *SHH*. Troca G>A (rs9333594).

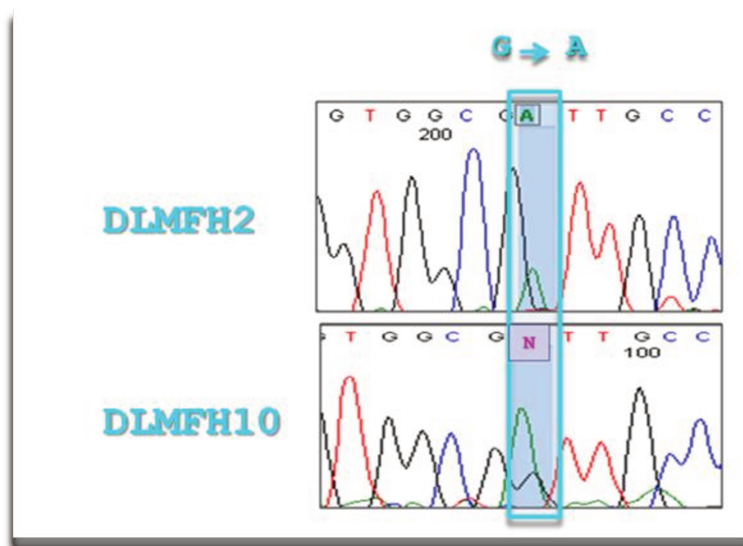


Figura 35 Alteração encontrada no intron 1-2 do gene *SHH*. Troca G>A (rs1233555).

► **Gene *FGF8***

O demonstrativo de amplificação de todos os fragmentos do gene *FGF8* usando amostras controle podem ser visualizados na figura 36.

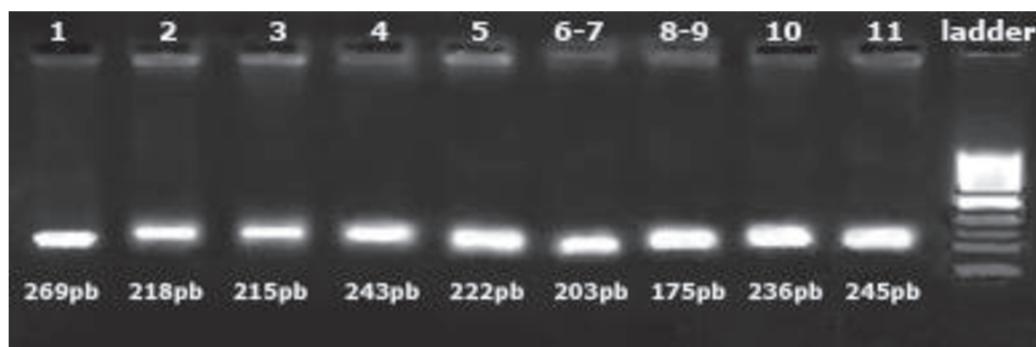


Figura 36 Demonstrativo da amplificação dos 10 fragmentos do gene *FGF8* utilizando amostras controle em gel de agarose 1%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

O sequenciamento de todos os fragmentos deste gene não mostrou qualquer alteração ou diferença entre os indivíduos analisados e indivíduos normais. O gene apresenta poucos polimorfismos e na casuística não foram encontrados nenhum deles.

► Gene *PAX3*

O demonstrativo da amplificação de todos os fragmentos do gene *PAX3* utilizando amostras controle pode ser visualizado na figura 37.

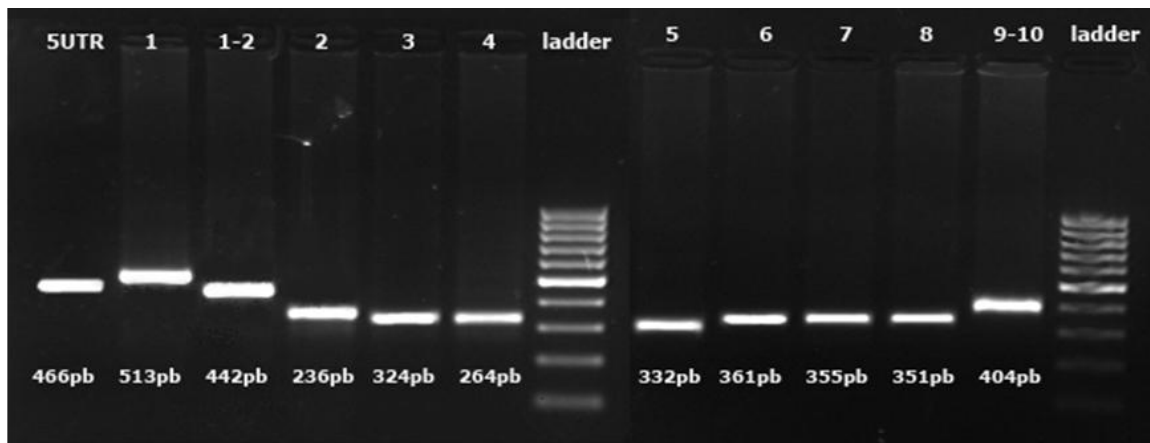


Figura 37 Demonstrativo da amplificação dos 11 fragmentos do gene *PAX3* utilizando amostras controle em gel de agarose 1%. Marcador de peso molecular (ladder) de 100pb.

A análise dos sequenciamentos dos fragmentos mostrou algumas alterações nas sequências da região 5'UTR (figura 38), dos exons 2 (figuras 39 e 40) e 6 (figura 41).

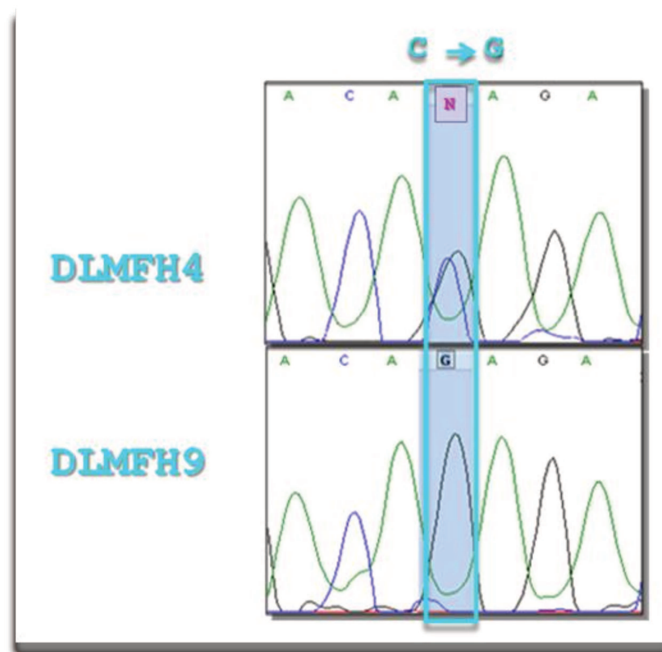


Figura 38 Alteração encontrada na região 5'UTR do gene *PAX3*. Troca C>G (rs28945090)

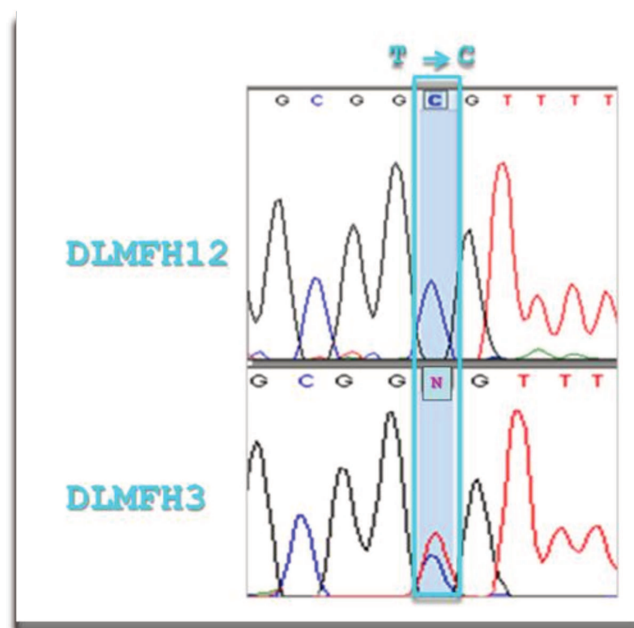


Figura 39 Alteração encontrada no exon 2 do gene *PAX3*. Troca T>C (rs28945092).

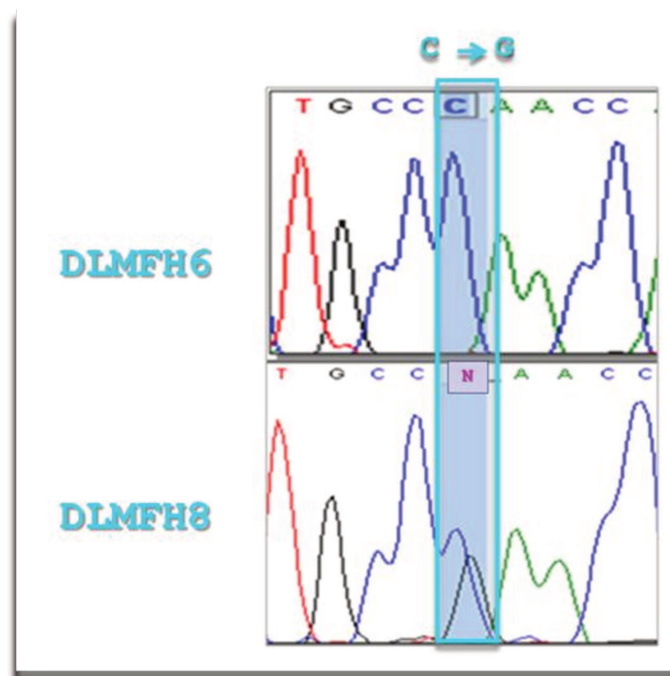


Figura 40 Alteração encontrada exon 2 do gene *PAX3*. Troca C>G (rs12623857).

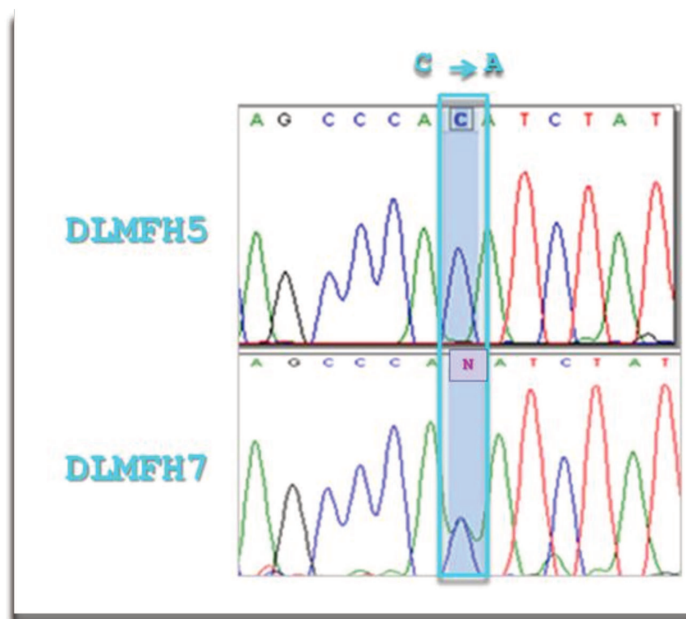


Figura 41 Alteração encontrada no exon 6 do gene *PAX3* (rs2234675)

Na tabela 14 segue o resumo dos polimorfismos encontrados nos genes pesquisados.

Tabela 14 Polimorfismos encontrados em dois dos genes pesquisados: *SHH* e *PAX3*.

Gene	Posição	SNP	Troca	Sequência
<i>SHH</i>	5'UTR	rs9333592	G>A	TGTGTTCC <u>G</u> TTATCAGC
<i>SHH</i>	Exon 1	rs9333549	G>A	GAGAGAGC <u>G</u> AGCGGGCG
<i>SHH</i>	Intron 1-2	rs1233555	G>A	GGGTGGCG <u>G</u> TTGCCCAG
<i>PAX3</i>	Promotor	rs28945090	C>G	CAAGGGGC <u>G</u> CAGCGCGG
<i>PAX3</i>	Exon2	rs28945092	T>C	CTCGGCGG <u>T</u> GTTTTTAT
<i>PAX3</i>	Exon 2	rs12623857	C>G	CCGCTGCC <u>C</u> AACCACAT
<i>PAX3</i>	Exon 6	rs2234675	C>A	CCAGCCCA <u>C</u> ATCTATTC

ESTUDO DA REGIÃO 22q11.2

A técnica de *FISH* permitiu investigar a deleção da região 22q11.2 nos indivíduos com DLMFH.

Em todos os casos, a contagem de dois sinais verdes e dois sinais vermelhos ficou acima de 90% nos núcleos e em 100% das metáfases analisadas indicando que não houve perda de um fragmento cromossômico de 120Kb (tamanho da sonda utilizada) na região 22q11.2.

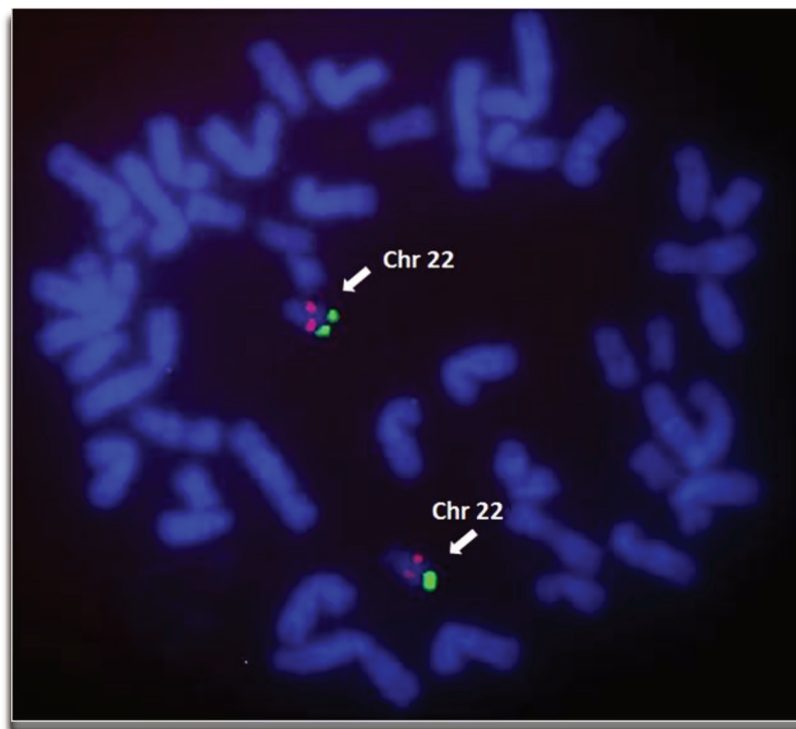


Figura 42 *FISH* da deleção 22q11.2 . Pontos verdes indicaram a região controle telomérica e os vermelhos a região 22q11.2. A presença de marcação vermelha indicou que os dois cromossomos 22 encontravam-se íntegros nessa região (retirada de Simioni, 2007).

INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS PELA TÉCNICA DE *array-CGH*

Todos os pacientes apresentaram cariótipo normal com banda G, com exceção do paciente 6 [46, XY, add (22p13)].

Perda ou ganho de material cromossômico foram detectadas em 04 pacientes, tratando-se de deleções e duplicações. As alterações identificadas variavam de tamanho e chegaram a ter até 6Mb e encontravam-se em regiões distintas do genoma.

Paciente DLMFH1

A paciente 1 com diagnóstico de DLMFH apresentou no exame dismorfológico hipertelorismo ocular, retração biparietal do crânio, epicanto, nariz com base nasal alargada e bífido, palato alto. Também apresentou hipoplasia de grandes lábios, anteriorização anal, encurtamento de membros. A avaliação neurológica mostrou um leve retardo mental, dolicocefalia, hipotonia e incoordenação motora. Exames do SNC mostraram anteriorização do lobo frontal, alargamento da comissura talâmica.

Trata-se de um caso com recorrência familiar, pois a mãe também apresenta sinais como o hipertelorismo ocular, nariz com ponte alta e discreto sulco mediano, retração biparietal, lordose acentuada, escoliose lombo-sacral, encurtamento do membro inferior esquerdo e discreta hipoplasia de grandes lábios.

O exame de cariótipo convencional não demonstrou qualquer alteração. Entretanto pela técnica de *array-CGH* foi detectada uma deleção envolvendo uma região do cromossomo 2 (2q36.1-2q36.3).

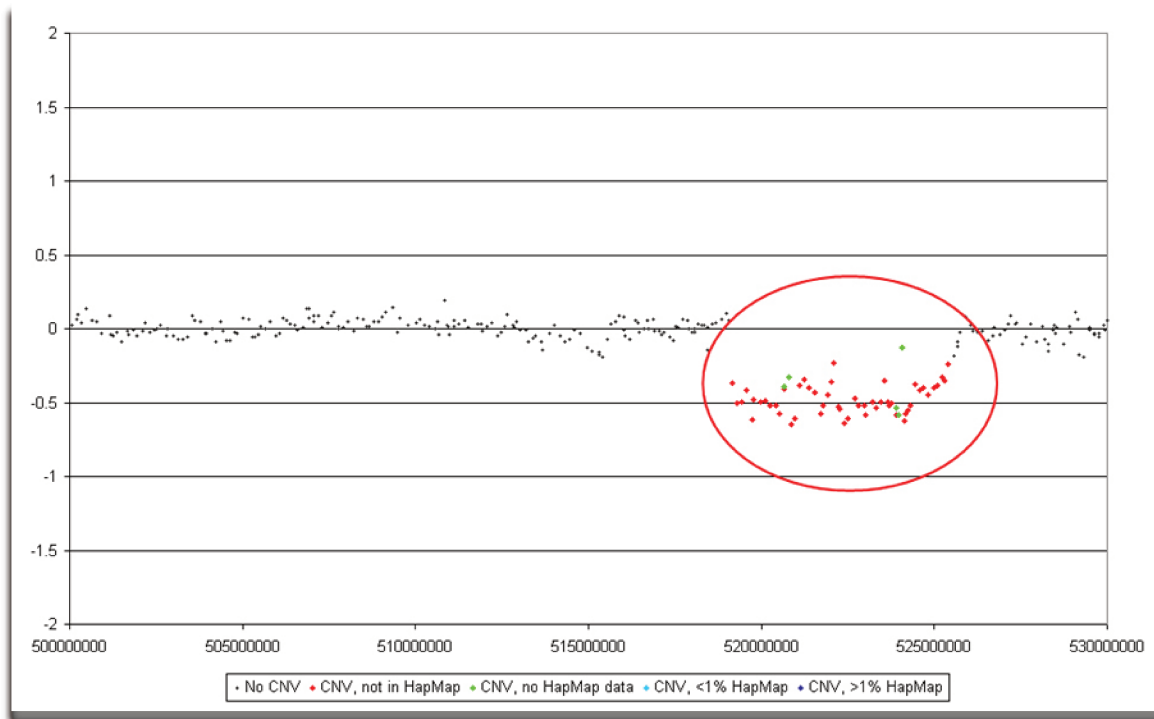


Figura 43 Perfil dos resultados do *array-CGH* do paciente DLMFH1 (ampliação do cromossomo 2). Na figura pode-se observar uma deleção nesse cromossomo (pontos em vermelho).

Para comprovar a alteração e testar o restante da família foram utilizadas duas técnicas: *FISH* e Genotipagem Automática.

Na comprovação pela técnica de *FISH* foram escolhidos dois clones dentro da região deletada: RP11-71J24 e RP11-397D2, sendo que o segundo localiza-se bem na região que contém o gene *PAX3*. Apenas o propósito e sua mãe foram testados.

A técnica comprovou a deleção, mas no caso da mãe notou-se que essa não estava presente em todas as metáfases, apenas em 10-20%, ou seja, ela era mosaico para a deleção (figura 44).

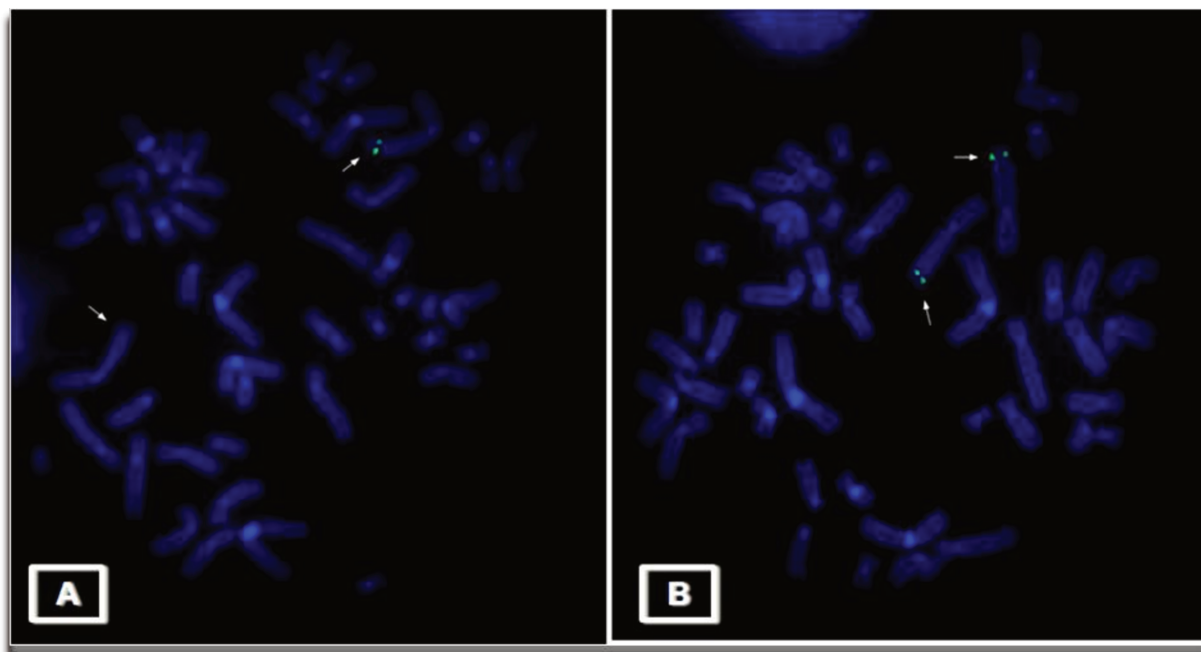


Figura 44 Resultado do *FISH* da mãe do propósito mostrando o mosaicismo. Em A temos uma metáfase com a deleção no braço longo do cromossomo 2 (hibridação do sinal verde em apenas um dos cromossomos). Em B ocorreu a hibridação em ambos os cromossomos 2.

Na confirmação por genotipagem automática foram utilizados 7 marcadores, sendo 4 deles localizados dentro da região deletada e 3 fora da região. Os resultados desse estudo estão representados na figura 45.

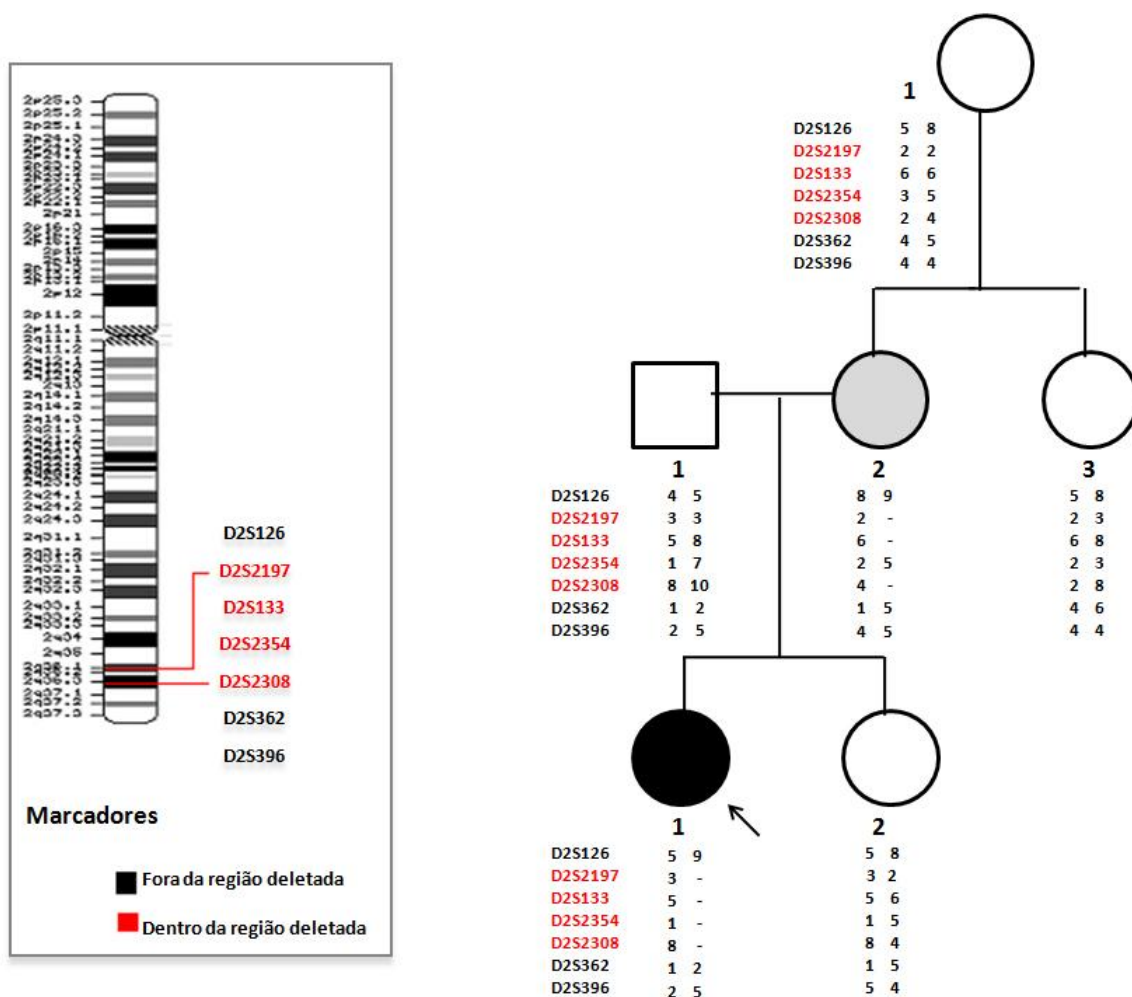


Figura 45 Heredograma da família DLMFH1 com os marcadores e respectivos haplótipos da região do cromossomo 2 deletada.

Os resultados comprovaram a deleção do propósito e o mosaicismo da mãe. Nota-se que o propósito apresentava apenas os alelos vindos do pai (D2S2197, D2S133, D2S2354 e D2S2308), dentro da região; enquanto a mãe apresentava apenas um alelo (D2S2197, D2S133 e D2S2308) ou dois alelos. Todo o restante da família não apresentava deleção na região estudada.

Paciente DLMFH2

A paciente 2 apresentou no exame dismorfológico hipertelorismo ocular, depressão frontal mediana, nariz bífido. Também apresentou excesso de pregas palmares e alteração da pigmentação da pele. A avaliação neurológica mostrou falha óssea frontal e hipotonia. Na avaliação do SNC notou-se anteriorização do lobo frontal, alteração de corpo caloso e micropoligiria perisilviana.

O exame de cariótipo convencional não demonstrou qualquer alteração. Entretanto uma deleção envolvendo uma região do cromossomo 4 (4q32.2) foi detectada pela técnica de *array-CGH*.

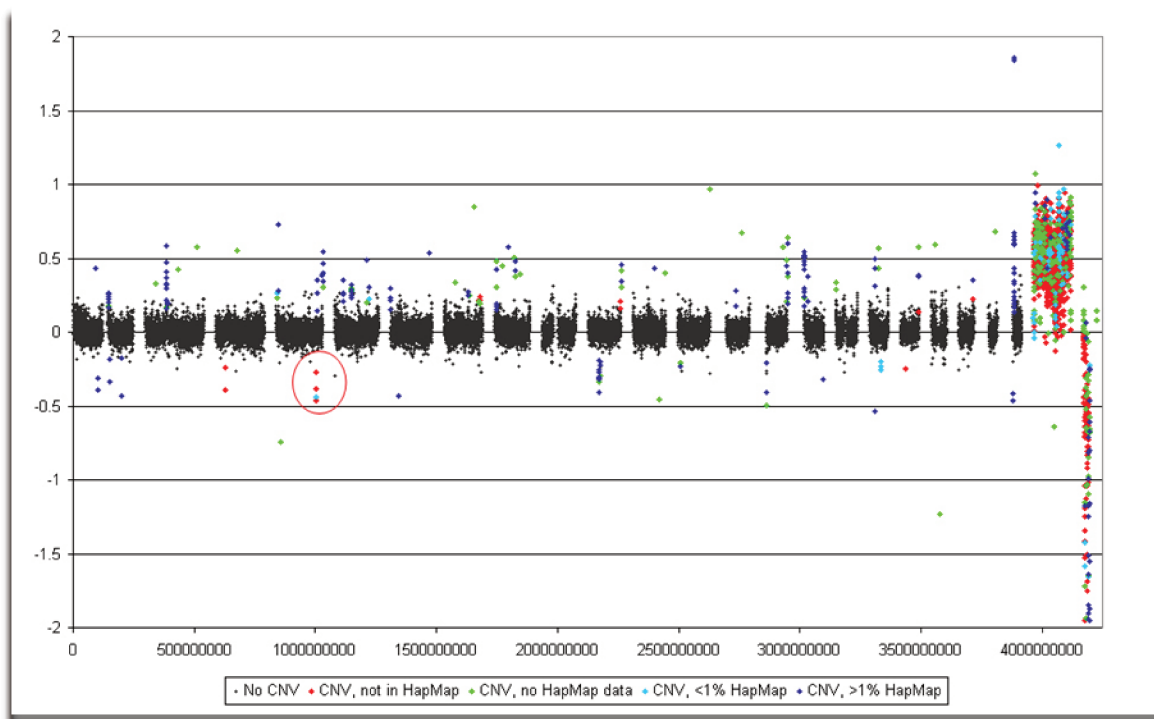


Figura 46 Perfil dos resultados do *array-CGH* do paciente 2. Na figura pode-se observar uma deleção da região 4q32.2 (pontos em vermelho).

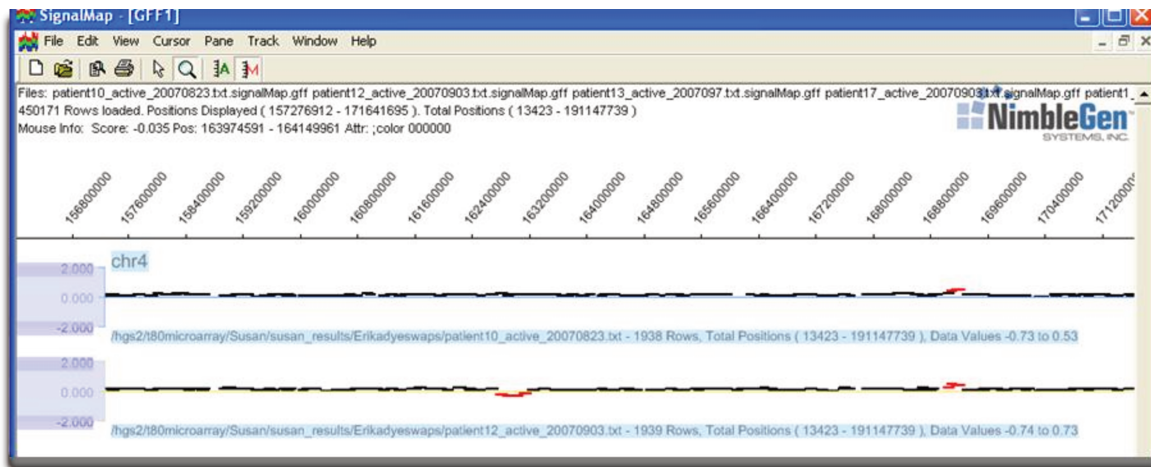


Figura 47 Aumento detalhado da região 4q32.2. Nota-se que há a deleção de alguns clones (em vermelho).

Apesar do achado, essa deleção não foi estudada mais a fundo, pois se tratava de uma região muito polimórfica, sendo, portanto improvável que fosse a causa das malformações.

Paciente DLMFH7

A paciente 7 com diagnóstico de DLMFH apresentou no exame dismorfológico: hipertelorismo ocular, estrabismo, exoftalmia, braquicefalia, assimetria craniana e facial, nariz com hipoplasia alar e assimétrico, palato ogival. Também apresentou implantação dos cabelos em "V", peito escavado, escoliose, clinodactilia discreta do 5º dedo, membros inferiores com sindactilia cutânea 2º e 3º bilateral. Apresentou convulsões tônico-clônicas generalizadas e hipoacusia. Exames do SNC mostraram anteriorização do lobo frontal, cisto hipofisário, alargamento dos forames parietais, alargamento das etmóides, hipertrofia dos cornetos nasais, agenesia do corpo caloso.

O exame de cariótipo convencional não demonstrou qualquer alteração. Entretanto uma duplicação envolvendo uma região do cromossomo 6 (6q21) foi detectada pela técnica de *array-CGH*.

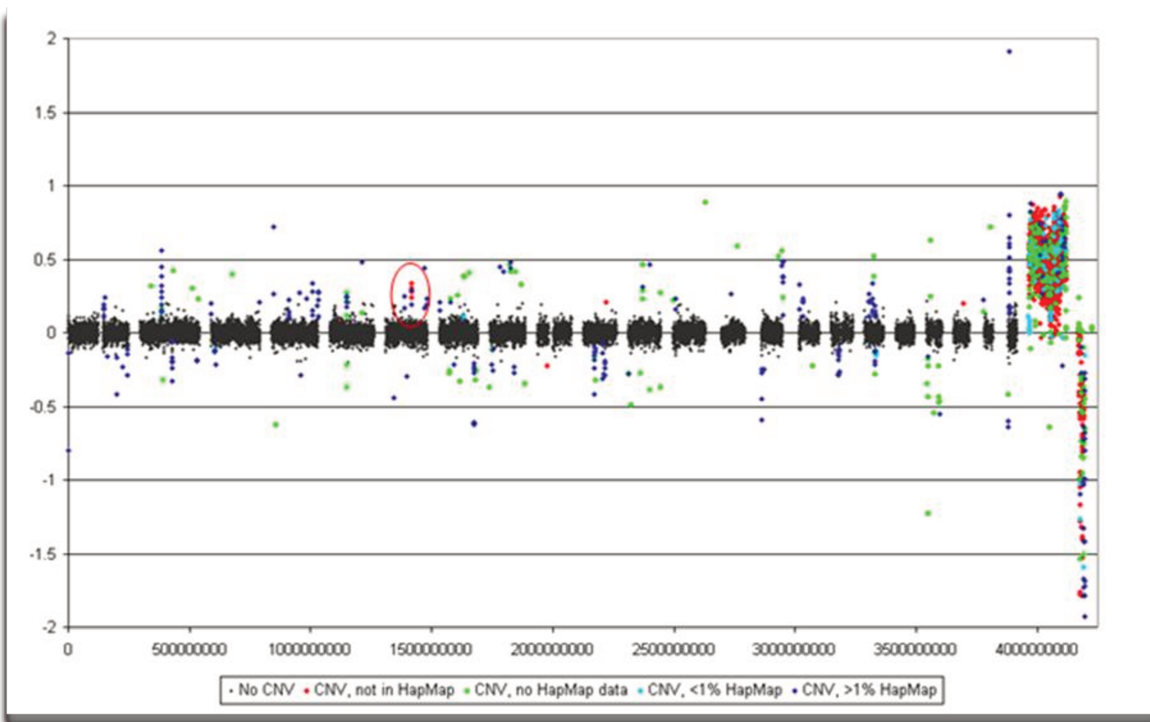


Figura 48 Perfil dos resultados do *array-CGH* do paciente 7. Na figura pode-se observar uma duplicação da região 6q21 (em vermelho).

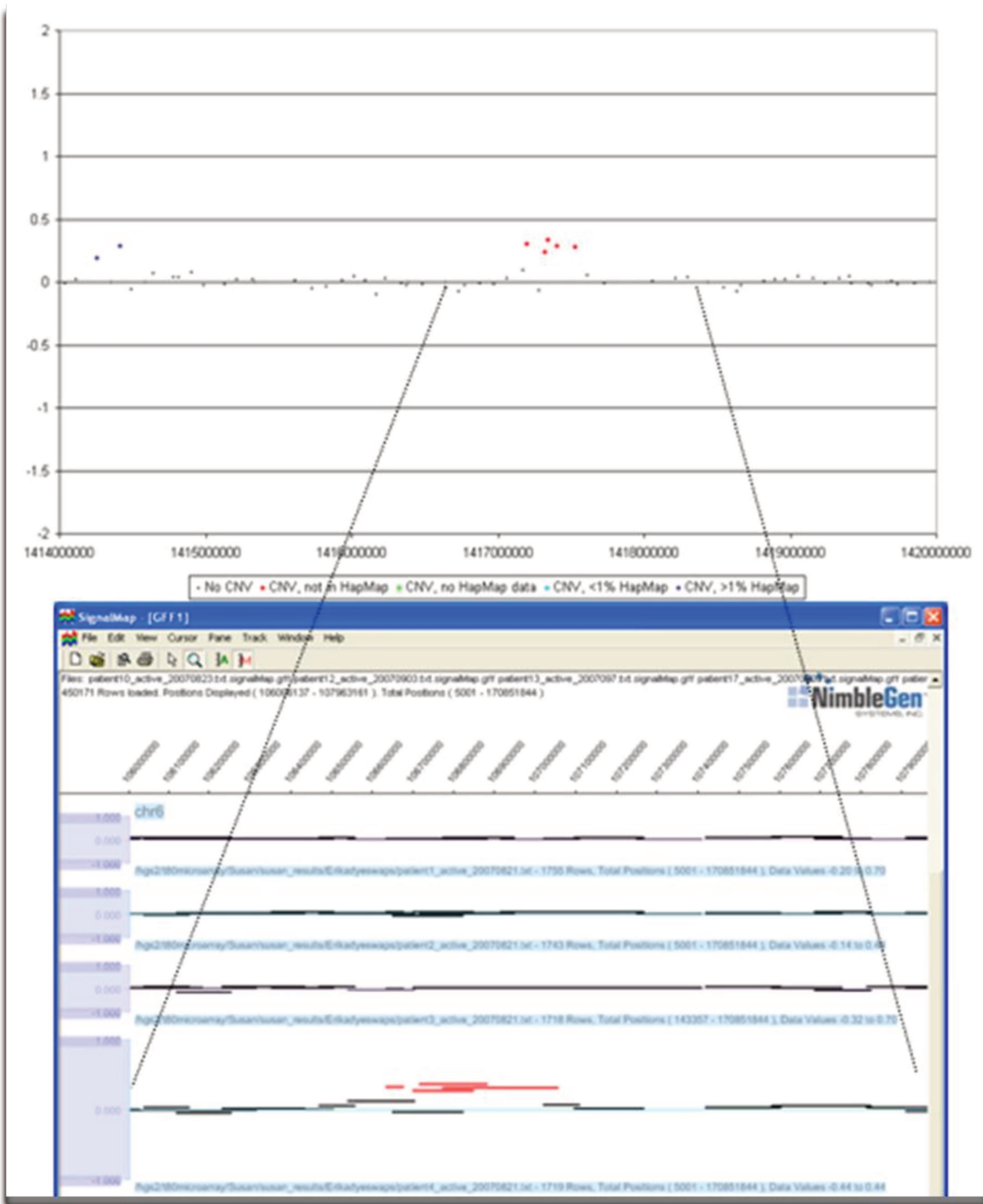


Figura 49 Aumento detalhado da região 6q21. Nota-se que há a duplicação de vários clones (em vermelho).

Apesar de ser difícil a detecção de duplicações menores que 1Mb através da técnica de *FISH*, foram escolhidos para comprovação de tal achado dois clones, sendo um dentro da região duplicada (RP3-448K1) e outro proximal (RP3-454N4) (figura 50).

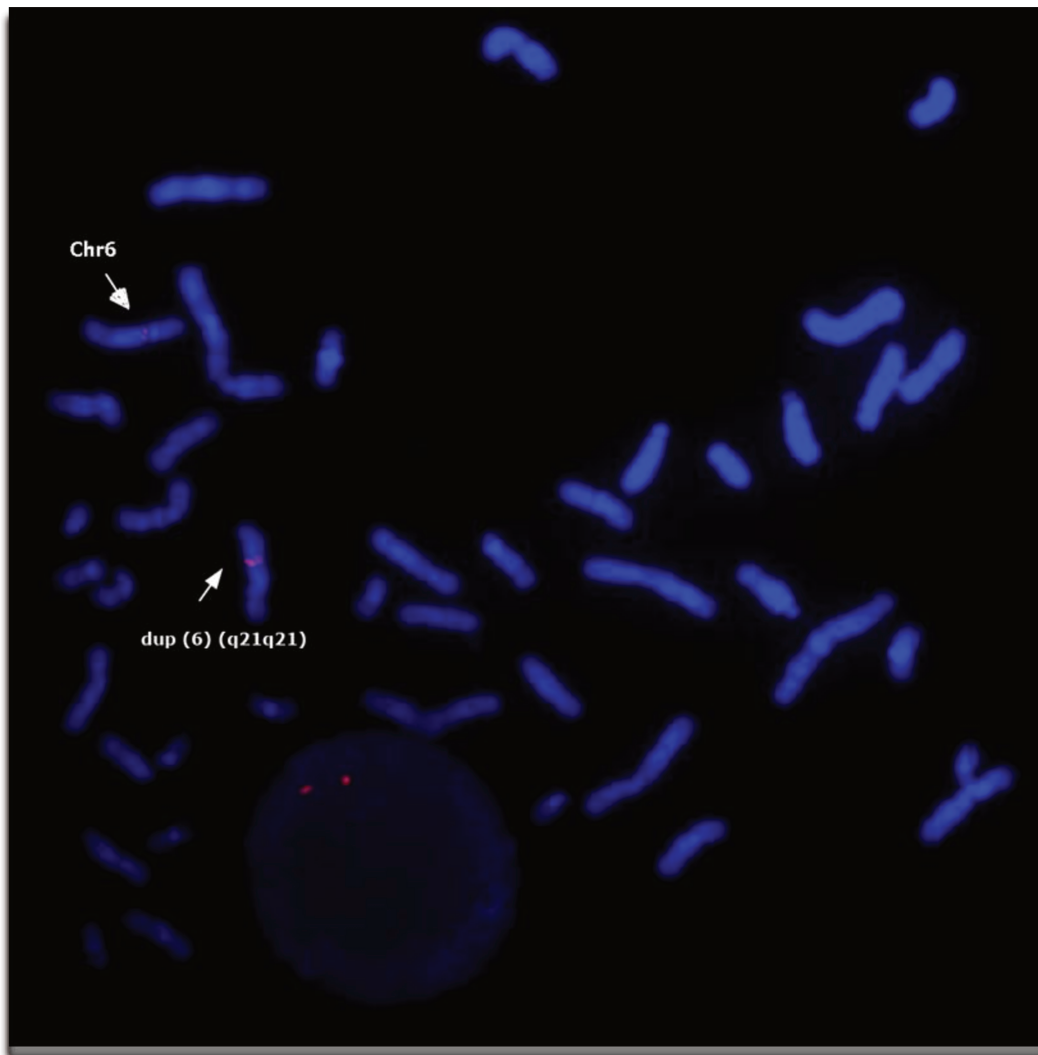


Figura 50 Resultado do *FISH* do paciente DLMFH7. Em um dos cromossomos 6 podemos notar a duplicação da região 6q21, ou seja, uma sutil duplicação dos sinais do clone RP3-448K1 marcado em vermelho. No outro cromossomo 6 a marcação é menos intensa pois não há duplicação da região e do clone .

Nas metáfases dos pais do paciente não foram notadas as mesmas alterações.

Mesmo parecendo que os clones no cromossomo 6 do paciente DLMFH7 estão duplicados, o caso ainda não pode ser concluído pois o aumento da intensidade dos sinais foi muito sutil, sendo necessários alguns outros experimentos para um diagnóstico final.

Paciente DLMFH9

A paciente 9 apresentou no exame dismorfológico: hipertelorismo, fronte ampla com retração temporal, base nasal alargada com discreto sulco mediano, palato alto, manchas café com leite, alargamento de hálux. Na avaliação neurológica apresentou dolicocefalia e hipotonia. Infelizmente não foram realizados exames para avaliar o SNC dessa paciente.

O exame de cariótipo convencional não demonstrou qualquer alteração. Entretanto uma deleção envolvendo uma região do cromossomo 7 (7p14.1) foi detectada pela técnica de *array-CGH*.

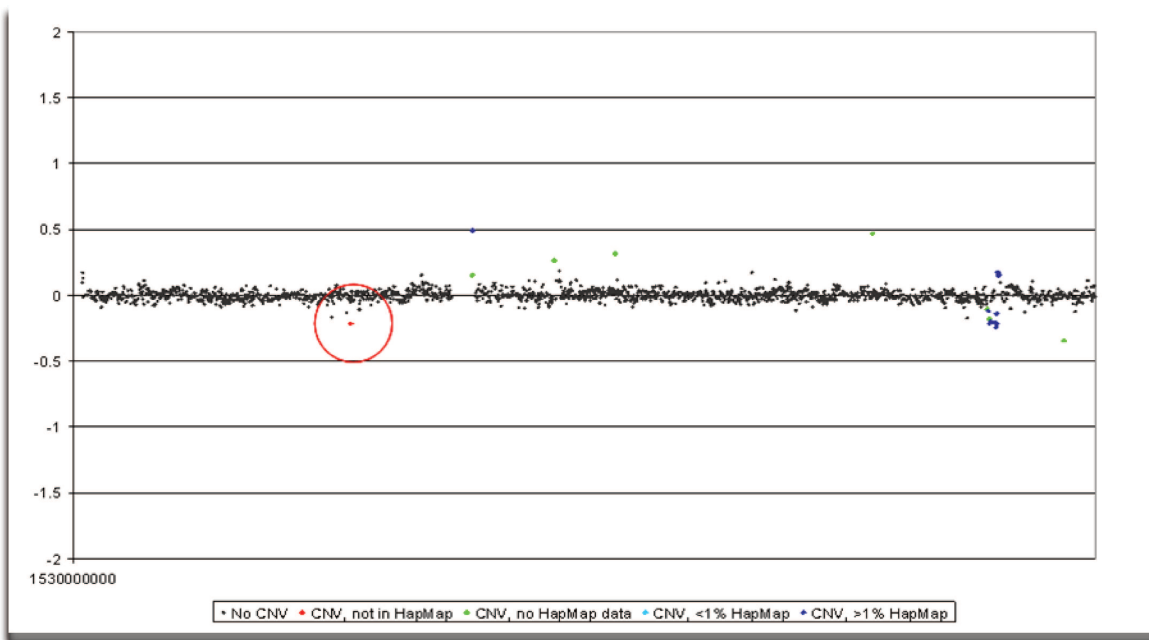


Figura 51 Perfil do cromossomo 7 do paciente 9. Na figura pode-se observar a deleção do Clone RP11-706L12.

Por ser apenas um clone, para tentar comprovar essa alteração foi utilizado outro tipo de *array* com uma maior resolução o *Agilent 244k oligonucleotide whole genome array* e os resultados não foram os mesmos, mostrando que se tratava de artefato de técnica.



Figura 52 Resultado do *array* de oligonucleotídeo na região do cromossomo 7 que supostamente possuía uma deleção. Nota-se que o clone Chr7tp-12A6 (em vermelho) pôde ser alinhado.

Paciente DLMFH10

O paciente 10, com diagnóstico de DLMFH, apresentou no exame dismorfológico: hipertelorismo ocular, discreta ptose palpebral, epicanto, estrabismo convergente, diâmetro biparietal estreito, orelhas proeminentes, base nasal alargada, ponta nasal, columela e úvula bifida, filtro longo e plano, palato alto. Apresentou também hérnia umbilical, hipospádia peniana. Na avaliação neurológica, apresentou apenas dolicocefalia e hipotonia e ainda não foi possível a avaliação do SNC.

O exame de cariótipo convencional não demonstrou qualquer alteração. Entretanto uma deleção envolvendo uma região do cromossomo 9 (9p24.1-9p24.3) e uma duplicação da região 20p13 foram detectadas pela técnica de *array-CGH*.

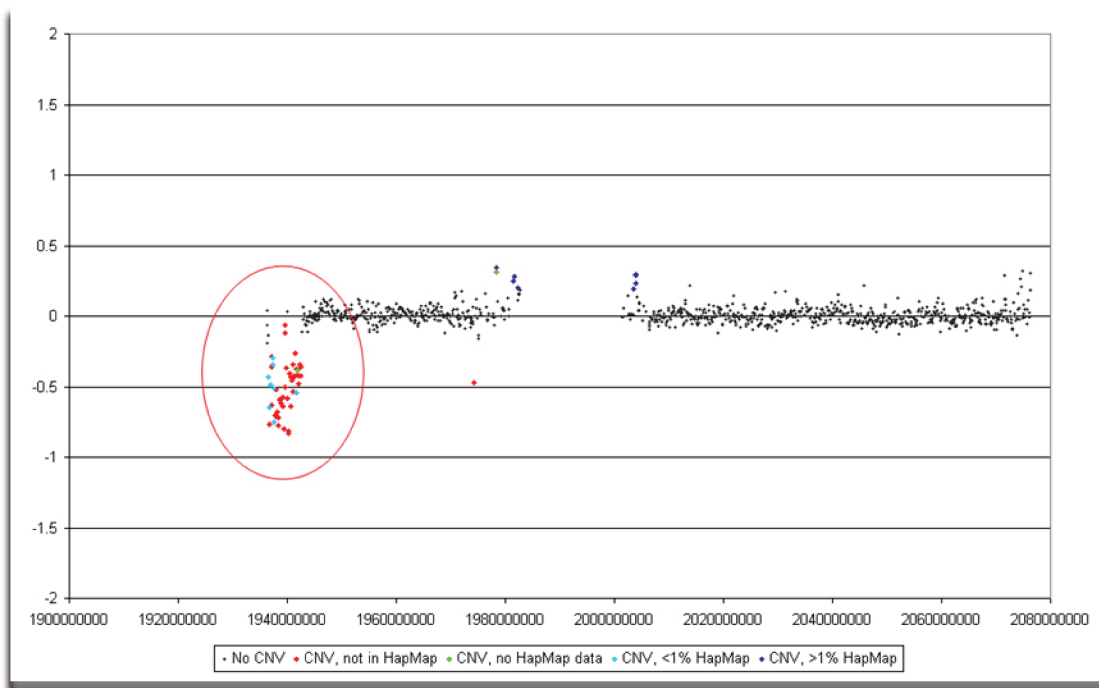


Figura 53 Aumento detalhado da região 9p24.1-9p24.3. Nota-se que há a deleção de vários clones (em vermelho).

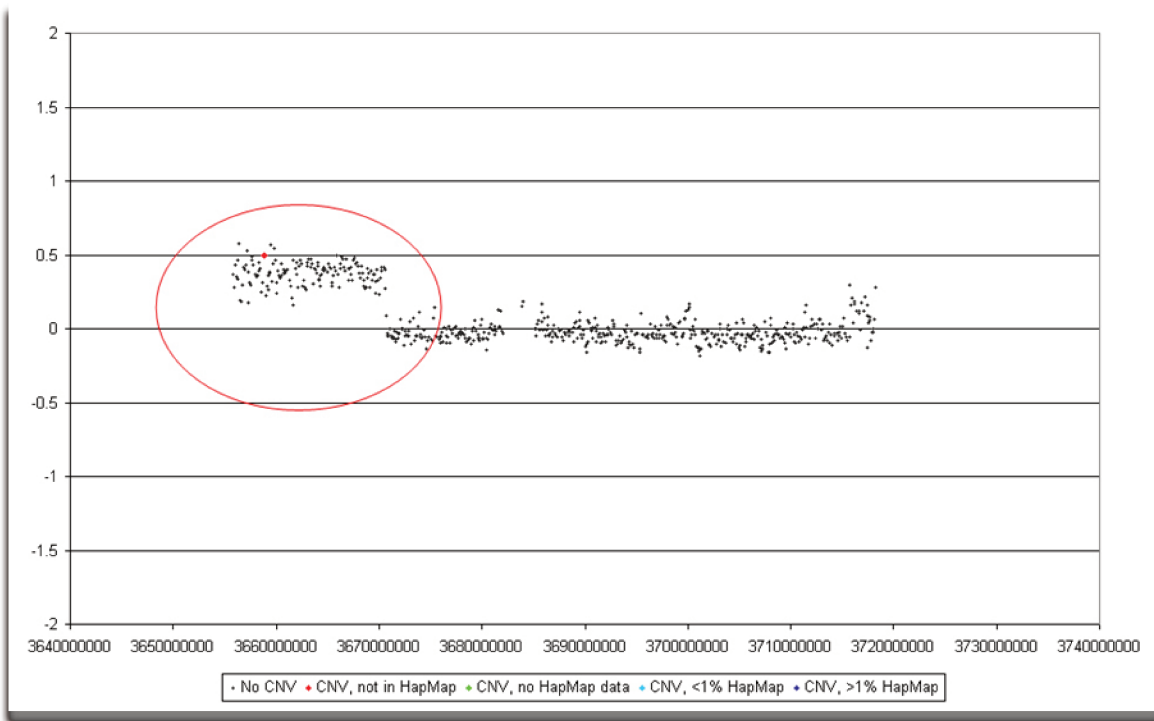


Figura 54 Aumento detalhado da região 20p13. Nota-se que há a duplicação de vários clones.

Após a descoberta dessas alterações, foi feito o cariótipo convencional dos pais e também *FISH* utilizando os clones: RP11-48M17 e RP11-125K10 para o cromossomo 9 e RP5-852M4 e RP4-686C3 para o cromossomo 20.

A mãe do paciente apresentou uma translocação recíproca envolvendo os cromossomos 9 e 20 (46,XX,t(9;20)(p24;p13)). Sendo que o paciente herdou o cromossomo derivado 9 de sua mãe.

Os experimentos de *FISH* também confirmaram resultados encontrados no array-CGH e no cariótipo convencional (figuras 55 e 56).

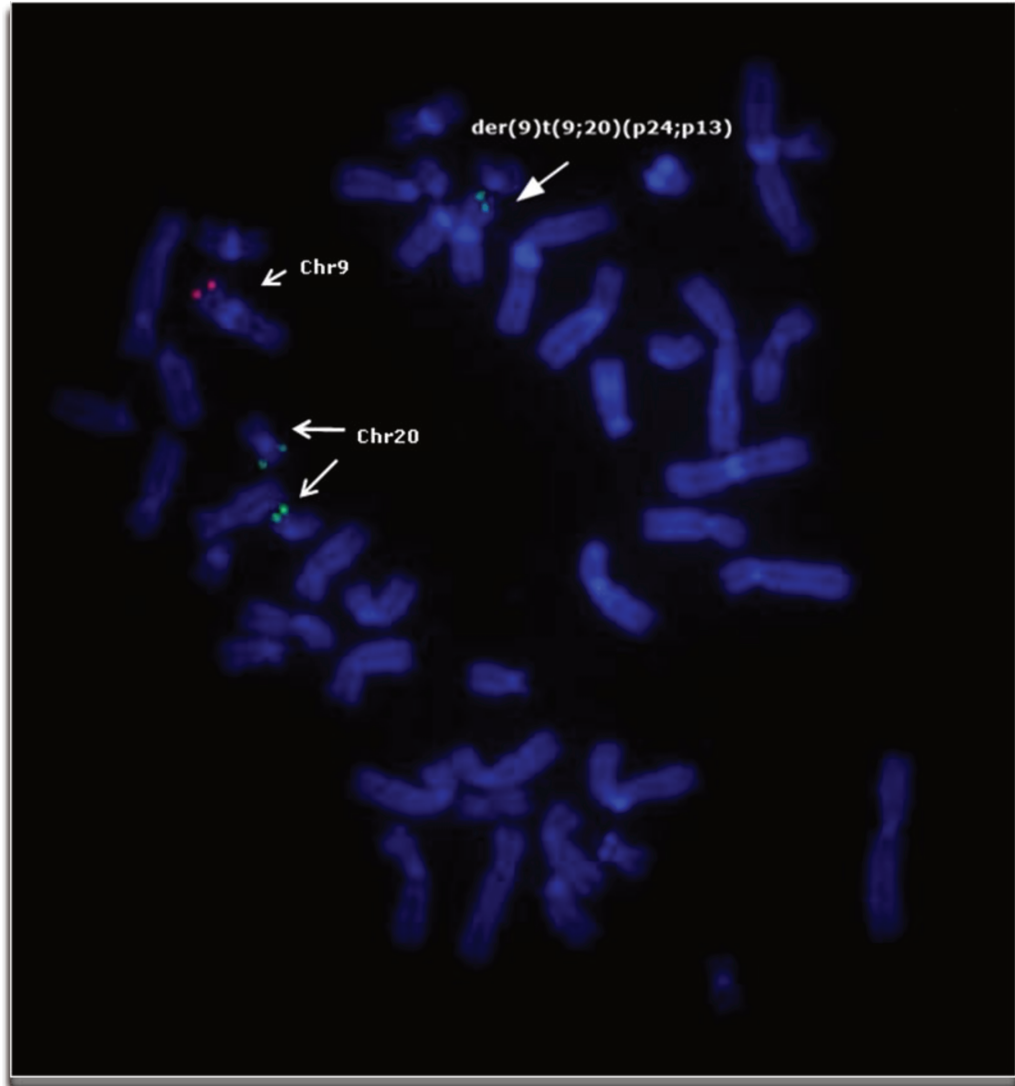


Figura 55 Resultado do *FISH* do paciente DLMFH10. Na figura pode-se notar três sinais verdes (clone para o cromossomo 20), sendo que um deles localiza-se hibridado em um dos cromossomos 9, formando um cromossomo derivado [der(9)t(9;20)(p24;p13)] e apenas um sinal vermelho (clone para o cromossomo 9), mostrando que ainda há uma perda cromossômica.

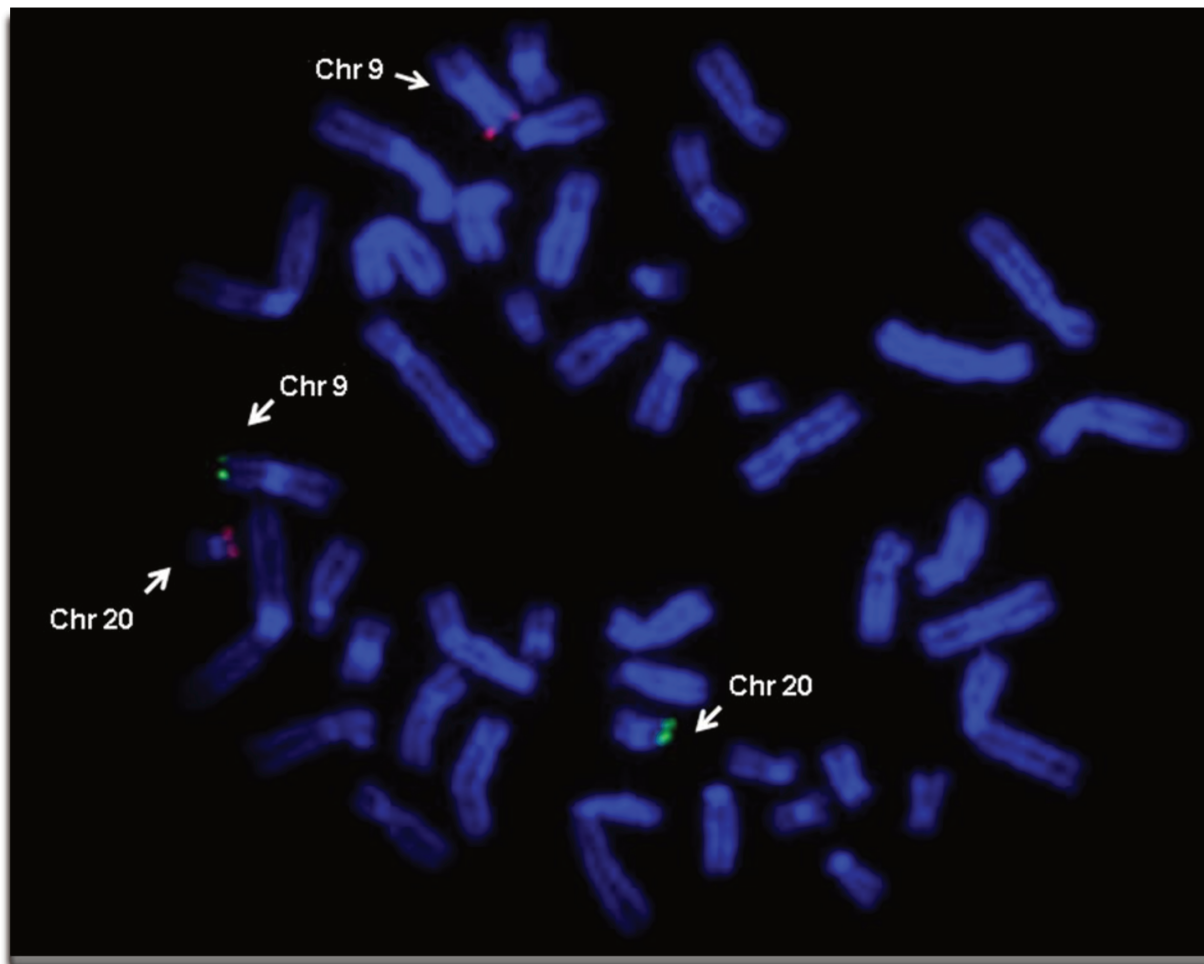


Figura 56 Resultado do *FISH* da mãe do paciente DLMFH10. Na figura pode-se notar uma troca de sinais, pois os clones marcados em vermelho localizavam-se no cromossomo 20 (sendo que na figura existe marcação em um cromossomo 9 e em um cromossomo 20) e os clones marcados em verde localizavam-se no cromossomo 9 (também marcação nos dois cromossomos diferentes), comprovando a translocação recíproca [t(9;20)(p24;p13)].

DISCUSSÃO

A especificação das diferentes estruturas e órgãos do organismo durante a embriogênese requer um rigoroso controle da expressão de inúmeros genes. Genes com função regulatória e estrutural devem atuar no momento e local apropriados, proporcionando as condições para o correto estabelecimento das diferentes linhagens celulares do organismo. A determinação e a subsequente diferenciação destas linhagens precursoras dependem de uma intrincada rede de sinalização que tem início extracelularmente, levando à ação coordenada de múltiplos genes e à ativação de uma cascata de sinalização intracelular (Ludolph e Konieczny, 1995). Por causa dessa complexidade, a base molecular que controla a embriogênese tem sido objeto de muito interesse em biologia e genética do desenvolvimento. A identificação do conjunto dos genes expressos e das vias sinalizadoras envolvidas com a formação de estruturas complexas permitirá gerar uma visão integrada do desenvolvimento embrionário. Portanto, o objetivo principal desse trabalho era colaborar com o esclarecimento desses mecanismos complexos e tentar encontrar fatores que causem distúrbios no desenvolvimento embrionário normal e aparecimento de quadros clínicos raros, como a síndrome Blefaroqueilodôntica e os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo.

Para tanto contamos com uma casuística composta por 3 casos de BCD, sendo um deles familiar e 13 pacientes com DLMFH.

CASUÍSTICA DE BCD

A BCD é uma rara condição geneticamente determinada de transmissão autossômica dominante com expressividade variável. Dentre seus principais sinais clínicos, destacam-se defeitos ectodérmicos, anomalias oculares e fissuras orofaciais. Os pacientes do presente

estudo mostraram características compatíveis com o quadro, incluindo: fenda labiopalatal, oligodontia e dentes cônicos, hipertelorismo, ectrópio de pálpebra inferior, distiquíase, euribléfaro e lagofthalmia.

CASUÍSTICA DOS DLMFH

A casuística desse trabalho foi composta por 13 pacientes com DLMFH. Há uma prevalência de mulheres afetadas, porém na literatura não há nenhum dado sobre predominância de sexo em DLMFH, principalmente devido à heterogeneidade clínica e dificuldade diagnóstica. O fato de a casuística ser composta de mais mulheres pode ter ocorrido apenas ao acaso, provavelmente pela raridade do quadro e tamanho da amostra.

Procurou-se constituir um grupo de indivíduos homogêneo, avaliados por um geneticista clínico único. Mesmo assim, observa-se que alguns indivíduos apresentam sinais extrafaciais. Um caso, inclusive, foi caracterizado como uma condição clínica nova (Gil-da-Silva Lopes et al, 2003).

Ambas casuísticas já haviam sido cuidadosamente estudadas anteriormente. Outros protocolos previamente definidos como avaliação clínica, citogenética, avaliação morfológica (RMN) e investigação funcional (eletroencefalografia e (ou) SPECT) do SNC já tinham sido desenvolvidos. A partir de correlação dos achados positivos nas diversas avaliações, foram determinados os genes embrionários possivelmente envolvidos em cada caso.

As avaliações demonstraram tanto alterações de face como alterações no SNC de modo estrutural ou funcional, apontando principalmente malformações do desenvolvimento cortical e alterações perfusionais e ainda envolvimento cerebelar em ambas casuísticas e ainda a sobreposição de sinais clínicos com outras síndromes. Os resultados obtidos nessas avaliações apontam genes relacionados ao desenvolvimento

tanto da face como do SNC, tendo sido proposto então o possível envolvimento dos genes *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10*, *FOXE1*, *FGF8*, *SHH* e *PAX3* na etiologia da BCD e *FGF8*, *SHH* e *PAX3*, na etiologia dos DLMFH. Todos esses genes participam comprovadamente do desenvolvimento embrionário e, no caso de alguns, já foram implicados em síndromes com a presença de malformações craniofaciais (Kondo et al., 2002; Celli et al., 1999; Ianakiev et al., 2000; McGrath et al., 2001; Amiel et al., 2001; van Bokhoven et al., 2001; Kantapura et al., 2003; Leoyklang et al., 2006; Clifton-Bligh et al., 1998; Belloni et al., 1996; Nanni et al., 2001; Schimmenti et al., 2003; Tassabehji et al., 1992; Asher et al., 1996).

Nesse contexto, nosso objetivo foi buscar o *loci* responsável pela BCD e fatores moleculares determinantes dos DLMFH também.

ESTUDO DE GENES CANDIDATOS: *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10*, *FOXE1*, *SHH*, *FGF8* e *PAX3* NOS PACIENTES COM BCD

A análise dos sequenciamentos dos genes *IRF6*, *P63*, *OSR2*, *TBX10*, *FOXE1*, *SHH*, *FGF8* e *PAX3* na casuística com BCD revelou muitas alterações, mostrando-se necessária a confirmação de se tratarem realmente de mutações patogênicas. Bancos de dados contendo polimorfismos já descritos na literatura, como o dbSNP do NCBI, foram pesquisados. Verificou-se que todas as alterações encontradas já tinham sido descritas anteriormente. Inclusive as alterações no gene *IRF6* já tinham sido encontradas na população brasileira em estudos anteriores (Lima, 2005), tratando-se de polimorfismos comuns da nossa população.

A cadeia polialanina do gene *FOXE1* também foi observada e comparada aos indivíduos controle descritos na literatura, pois já se demonstrou que essa cadeia é polimórfica (Macchia et al., 1999; Hishinuma et al., 2001). Entretanto há a possibilidade de que a presença de certos alelos possam predispor a alguma doença como ocorre com outros genes (Brown e Brown, 2004). Nossos sequenciamentos mostraram que os pacientes com

BCD apresentam os alelos mais comuns de cadeia polialanina, ou seja, 14/14. É interessante notar que mesmo em populações controle, dependendo da etnia, esse polimorfismo pode variar, como mostra a tabela 15.

Tabela 15 Frequência dos alelos da cadeia polialanina do *FOXE1* em populações normais de várias nacionalidades, em porcentagem (Watkins et al., 2006). Nota-se que o alelo com 14 repetições é o mais comum em todas as etnias.

Nº resíduos polialanina	Watkins et al., 2006	Watkins et al., 2006	Macchia et al., 1999	Hishinuma et al., 2001
	Neozelandeses	Eslovenos	Italianos	Japoneses
12	0.4	1.3	2	0
14	67.5	66.2	54	97
16	30	23	40	3

A exata função da cadeia polialanina é desconhecida, mas, quando ocorrem expansões dessas repetições em genes que codificam fatores de transcrição, essas podem alterar as interações proteína-DNA ou proteína-proteína desses genes ou mesmo resultarem em perda ou ganho de função gênica (Brown e Brown, 2004). Também permanece desconhecida a diferença de atividade do *FOXE1* que contém cadeias com 12, 14, 16, 17 ou 19 repetições de resíduos de alanina. Por tanto, são necessários estudos funcionais desse gene.

Mesmo não detectando mutações nesses genes, não podemos excluir totalmente o envolvimento deles com a etiologia da BCD, e regiões não amplificadas e analisadas podem ainda conter alterações patogênicas, embora isso seja pouco provável, já que quase a totalidade do gene foi pesquisada. O uso da análise de ligação seria mais bem indicado para

exclusão de genes, mas infelizmente a raridade da síndrome assim como os poucos casos familiares disponíveis não permitem a utilização dessa técnica.

Embora os resultados encontrados não sejam conclusivos, os achados preliminares poderão ser úteis em investigações futuras.

ESTUDO DE GENES CANDIDATOS: *SHH*, *FGF8* e *PAX3* NOS PACIENTES COM DLMFH

Acredita-se que os DLMFH têm início entre os dias 21 a 70 da gestação, devido à falha no desenvolvimento dos placóides nasais e inabilidade dos olhos aproximarem-se da linha média por causa da persistência do processo frontonasal (Sedano e Gorlin, 1988). Um rato modelo para os DLMFH foi proposto por McBratney et al. (2003), o 3H1 Br. O rato modelo tem uma severa retrognatia com um nariz achatado atribuído à redução da proliferação de condrócitos nas regiões esfenoidal e esenoetmoidal da base anterior do crânio. O cruzamento de dois ratos 3H1br/p produz descendentes com vários fenótipos dependendo do efeito da dosagem do gene Br nos tecidos craniofaciais da linha média. A prole pode ter aparência normal, semelhante aos pais ou ainda uma profunda fenda facial mediana. O mutante 3H1 Br/Br morre logo após o nascimento devido à inabilidade de se alimentar e apresenta uma defeituosa formação das estruturas ligadas à linha média como a base anterior do crânio, ausência de septo nasal, fenda nasal lateral e ausência de palato primário e secundário (McBratney et al., 2003).

A super expressão do gene Shh nos tecidos da linha média de galinhas pode causar alargamento da proeminência frontonasal e hipertelorismo (Hu e Helms, 1999)], levantando-se a hipótese do Br exercer seus efeitos alterando a sinalização do Shh nos estágios iniciais do desenvolvimento craniofacial (McBratney et al., 2003). O rato Br pode também apresentar deficiência de ácido retinóico (RA) resultando na diminuição da regulação do Shh, pois os DLMFH também já foram gerados em ratos RARa/g mutantes (Lohnes et al., 1994).

Entretanto, a característica do nariz plano foi mapeada perto do marcador D17Mit155 no rato e o gene responsável não pôde ser identificado. O gene murino *Zfp161*, análogo ao gene *TGIF* humano, foi considerado um dos candidatos. A proteína *Tginteracting factor (TGIF) alpha* participa da regulação do ácido retinóico. O gene *TGIF* também participa do controle do gene *SMAD2* durante o desenvolvimento embrionário.

Mutações no gene *TGIF* têm sido associadas à holoprosencefalia tipo 4. Richieri-Costa e Guion-Almeida (2004) descreveram um menino de 6 anos com fenda mediana de lábio e palato, ptose do olho direito e catarata, encefalocele esfenoetimoidal, desenvolvimento e estaturas normais e uma mutação no exon 4 do gene *TGIF*, mas não conseguiram ligar essa alteração ao fenótipo.

Transmissão autossômica dominante foi descrita em uma família que apresentava dois homens afetados com hipertelorismo, nariz bífido, pré-axial polidactilia e hemimelia tibial (Hing et al., 2004). Os autores excluíram o envolvimento do gene *GLI3* e examinaram a segregação das características clínicas nos membros da família utilizando marcadores para os genes *ALX4*, *IHH* e *SHH*. Os genes *IHH*, *Wnt-10A*, *SHH* e *C7ORF2* também foram sequenciados e não se encontraram alterações.

Portanto, ainda não foram descritas mutações em nenhum gene que poderiam ser a gênese dessas malformações.

Após uma ampla revisão da literatura, foi proposta a análise de 3 genes: *SHH*, *FGF8* e *PAX3*. A análise dos sequenciamentos revelou algumas alterações e buscamos a confirmação das alterações nos mesmos bancos de dados anteriormente pesquisados. Verificou-se que todas as alterações encontradas já tinham sido descritas anteriormente e tratava-se apenas de polimorfismos não patogênicos.

DELEÇÃO 22q11.2

Por meio de revisão e estudo de dados da literatura, este grupo de pesquisa levantou a hipótese de que alterações na região 22q11.2 pudessem ter participação ativa na gênese de parte dos casos de DLMFH.

Inicialmente, relatos do envolvimento da região 22q11 em indivíduos com fenótipo facial sugestivo de DLMFH (Stratton e Payne, 1997; Gripp et al., 1997 ; Fryns et al., 1993; Kirkpatrick et al., 1998; Schulze et al., 2001) chamaram a atenção.

Além disso, a região 22q11.2 também está relacionada as SVCF, SDG e CAFS, que apresentam dismorfismos faciais. Essas condições foram descritas associadas à microdeleção 22q11 e são exemplos de fenótipos causados por haploinsuficiência de um ou mais genes desta região (Carlson et al., 1997; Ryan et al., 1997; Devriendt et al., 1996a; Goldberg et al., 1993).

Considerando que microdeleção 22q11 foi relatada em casos de SVCF, SDG e DLMFH, seria possível que parte dos casos de DLMFH pudessem ser considerados integrantes do espectro dessas condições e associado à deleção 22q11.

Embora nesse estudo tenhamos empregado a sonda comercial 22q11.2 – SVCF/SDG , que detecta de 85 a 90% dos casos com suspeita dessa deleção (Weksberg et al., 2005) e que cobre o locus do gene *HIRA/TUPLE1*, apontado por alguns autores como candidato responsável por determinadas características vistas nas síndromes de deleção 22q11.2 (Roberts et al., 1997; Wilming et al., 1997; D’Antoni et al., 2004), a deleção 22q11.2, a deleção não foi encontrada nos indivíduos analisados. Apesar desse resultado, não podemos descartar a hipótese da localização no núcleo celular do gene *HIRA/TUPLE1* estar alterada, conforme observado por D’Antoni et al. (2004). Assim, a confirmação desta hipótese não pôde ser feita no presente trabalho, já que o método exige análise em 3D. Além disso, apesar do alto índice de detecção dos casos com suspeita de deleção 22q11.2 utilizando essa sonda, devemos considerar que a mesma é

específica para o locus do gene *HIRA/TUPLE1* e, portanto, não cobre toda a região de 3Mb comumente deletada.

Sendo assim, ainda não tínhamos conseguido chegar a qualquer fator que pudesse explicar a causa dessas duas anomalias e tornou-se necessária a mudança de estratégia. Optou-se então pela utilização de uma técnica moderna para a tentativa de elucidação da etiologia dessas malformações, a técnica de *array-CGH*.

ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

O desenvolvimento da técnica de *array-CGH* vem aprimorando o campo da citogenética molecular, pois permitiu a análise de milhares de regiões do genoma simultaneamente para a detecção de microdeleções e microduplicações (Solinas-Toldo et al., 1997; Pinkel et al., 1998; Buckley et al., 2002; Snijers et al., 2001; Vermeesch et al., 2005; Dave et al., 2007).

A técnica de *array-CGH* foi utilizada para a investigação das casuísticas e a plataforma do tipo *WGTP*, que cobre o todo o genoma (mais de 30 mil clones), no intuito de identificar ganhos ou perdas cromossômicas.

Infelizmente não foi possível a conclusão dos estudos de *array-CGH* dos pacientes com BCD, pois os DNAs encontravam-se degradados e por ser uma técnica muito sensível, os resultados não foram satisfatórios e confiáveis. Entretanto foram encontradas alterações em 4 pacientes com DLMFH. Cada uma delas foi detectada sem o conhecimento prévio da região envolvida. Os casos apresentaram tanto deleções como duplicações, sendo de tamanhos variáveis e chegando a ter mais de 6Mb.

Quando pacientes carregam alterações cromossômicas é provável que esta seja a causa da malformação, mas torna-se necessária a análise mais profunda da região envolvida. Para isso, foi utilizado o banco de dados do *Ensembl* para observar quais genes

estavam incluídos dentro de cada região e também se verificou se havia casos com as mesmas alterações já descritas no DECIPHER e ECARUCA.

A paciente 1 com DLMFH é um caso familiar e foi encontrada a deleção de mais de 50 clones cobrindo uma região de 6.2Kb no cromossomo 2 (2q36.1- 2q36.3).

Comparada à deleção distal 2q, deleção intersticial 2q36 é um evento muito raro (Schinzel, 2001), sendo que há menos de 10 casos descritos até hoje (Warter et al., 1976; Gorski et al., 1989; Kirkpatrick et al., 1992; Melnyk e Muraskas, 1993; Tachdjian et al., 2006; Jalali et al., 2008; Doco-Fenzy et al., 2008).

Nessa região, encontram-se mais de 20 genes (figura 58) e inclusive o gene *PAX3*, um dos genes inicialmente proposto como candidato aos DLMFH.

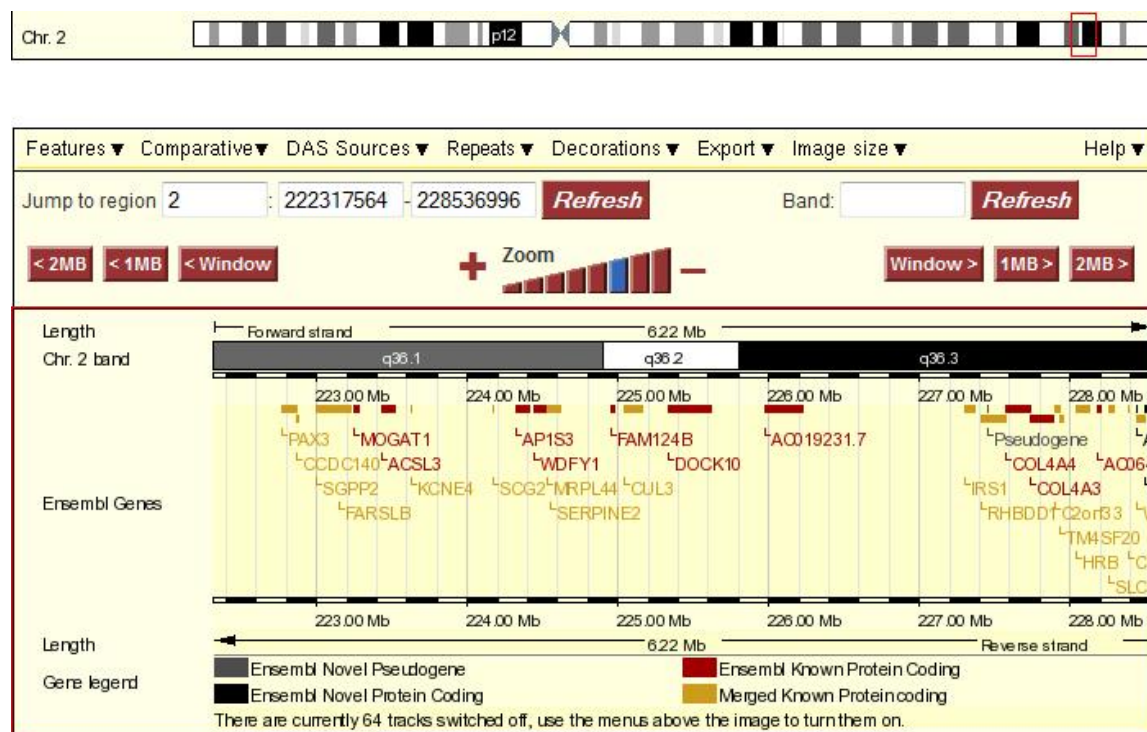


Figura 57 Representação dos genes contidos na região 2q36.1-2q36.3 deletada. Nota-se que o gene *PAX3* encontra-se deletado em um dos alelos (figura adaptada do *Ensembl Genome Browser*).

O gene *PAX3* apresenta um papel crucial no desenvolvimento embrionário, atuando nas estruturas derivadas da crista neural e musculatura esquelética (Jessell e Snaes, 2000; Thomas et al., 2004; Lamey et al., 2004).

Outros genes importantes na região e que estão ligados ao desenvolvimento do cérebro ou estruturas dele são o *EPHA4* (*Ephrin Receptor*, OMIM 602188), *KCNE4* (*Potassium Channel, Voltage-Gated, Isk-Related Subfamily, Member 4*, OMIM 607775), *SCG2* (*Secretogranin II*, OMIM 118930) e *PN1* (*Protease Nexin I*, OMIM 177010). O gene *SLC19A3* (*Solute Carrier Family 19*, OMIM 606152) está envolvido no desenvolvimento dos dendritos e axônios.

O gene *CUL3* (Cullin 3, OMIM 603136) também se encontra dentro da região, sendo um componente da ligase ubiquitina E3, essencial para a divisão mitótica (Sumara e Peter, 2007);

COL4A3 (OMIM 120131) e *COL4A4* (OMIM 120070), ambos colágeno tipo IV, formadores de fibras de colágeno, estão deletados. *COL4* é um componente da membrana basal, matriz que suporta células epiteliais e endoteliais e cobre músculos e nervos. Mutações nos genes causam duas síndromes: Alport (OMIM 203780) e Goodpasture (OMIM 233450). A primeira é caracterizada por nefropatia hereditária, frequentemente associada à surdez neurosensorial e alterações oculares (Feingold ET al., 1985; Kashtan e Michael, 1996); e a segunda é uma patologia mediada pelo sistema imunológico, na qual autoanticorpos contra a cadeia $\alpha 3$ (IV) do colágeno tipo IV ligam-se à membrana basal, alveolar e glomerular, causando glomerulonefrite progressiva e hemorragia pulmonar (Stanton e Tange, 1958; Salama et al., 2001). Apesar dos pacientes não apresentarem nenhum problema renal, deve-se notar que o colágeno também participa da formação óssea e os pacientes apresentaram ao exame dismorfológico lordose, escoliose e assimetria de membros inferiores, sendo que a mãe ainda apresenta luxação de quadril e cisto ósseo.

A presença do mosaicismismo pode explicar o quadro mais brando da mãe do propósito, sendo que as principais características clínicas são mais sutis e há um menor comprometimento nervoso e mental.

Os casos já descritos de deleção nessa mesma região apresentam sinais clínicos parecidos com do paciente 1 como: baixo peso ao nascimento, hipertelorismo ocular, sinofre, nariz com base nasal alargada e ponta bífida, fronte ampla, peito escavado, anomalias genitais, hipotonia e retardo do desenvolvimento neuromotor (ECARUCA, 2008). Recentemente Doco-Fenzy e colaboradores (2008) descreveram uma paciente com uma deleção *de novo* quase na mesma região do propósito, sendo apenas um pouco menor e o gene *PAX3* não estava deletado. A paciente apresentava sinais parecidos com o nosso propósito, mas havia ainda um aumento dos rins, múltiplos cistos renais, displasia da patela e um retardo mental severo.

A paciente 2 com DLMFH apresentou uma deleção de alguns clones na região 4q32.2, mas essa região apresenta-se polimórfica e tendo um número variável de cópias (CNVs) em <1% dos indivíduos do banco de dados do *HapMap* (Redon et al., 2006). A região do genoma e os CNVs estão representados na figura 59.

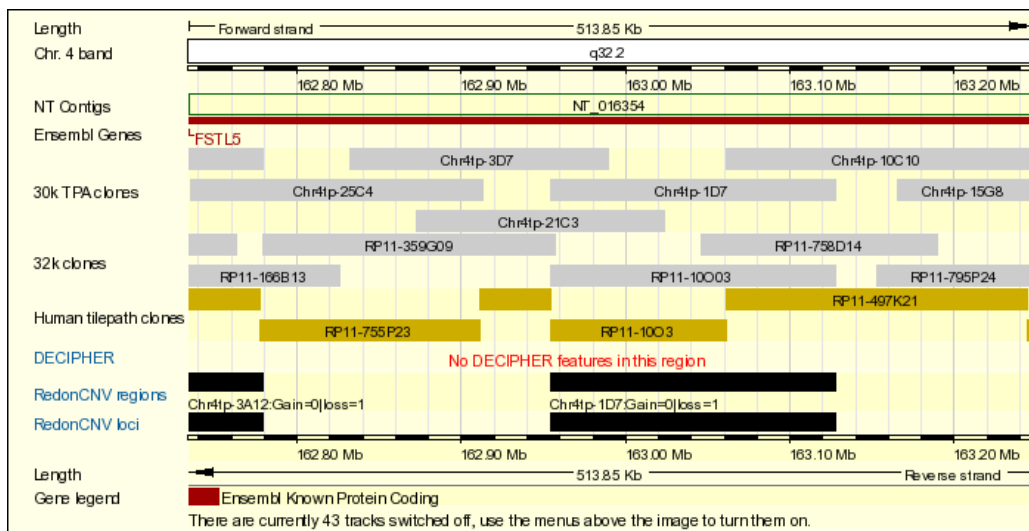


Figura 58 Região 4q32.2 deletada. Notam-se os CNVs já descritos (em preto) (figura adaptada do *Ensembl Genome Browser*).

Existe apenas um gene na região: o *FSTL5* (*Follistatin-related protein 5*). Esse gene é membro da família de proteínas que modula a folistatina. Essa família parece agir de maneira parácrina ao se ligar a fatores da morfogênese ou fatores de crescimento/diferenciação e regulam suas atividades durante o desenvolvimento (Hayette et al., 1998). Pouco se sabe a respeito do *FSTL5*, apenas o membro *FSTL3* já foi bem estudado.

O paciente 7 com DLMFH apresentou uma duplicação da região 6q21, representada na figura 60.

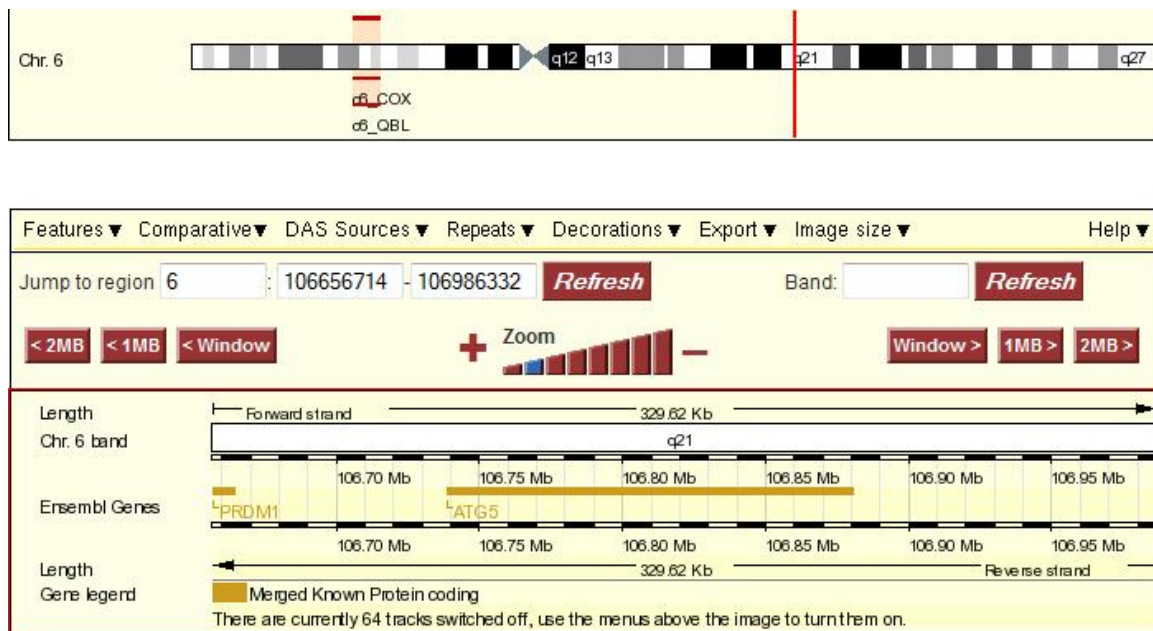


Figura 59 Representação dos genes contidos na região 6q21 duplicada (figura adaptada do *Ensembl Genome Browser*).

A duplicação tem aproximadamente 330Kb e os genes *PRDM1* (*Positive Regulatory Domain I-Binding Factor 1*; OMIM 603423) e *ATG5* (*Autophagy 5, S. Cerevisiae, homolog of*; OMIM 604261) estão duplicados.

Duplicação parcial do braço longo do cromossomo 6 é rara e foi identificada em menos de 100 casos (Zneimer et al., 1998) e causa uma síndrome conhecida (Turleau e Grouchy, 1981; Conrad et al., 1998). Entretanto a maioria dos casos resulta de uma translocação desbalanceada entre o cromossomo 6 e outro cromossomo resultando numa duplicação terminal da região 6q e uma monossomia parcial de outro cromossomo. Poucos casos de duplicação intersticial do cromossomo 6q já foram descritos (Henegariu et al., 1997; Zneimer et al., 1998; Pratt et al., 1998; Pazooki et al., 2007; Klein et al., 2007). Esses casos têm sobreposição de sinais clínicos com o nosso paciente, como hipertelorismo, base nasal alargada, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, entre outros.

O gene *PRDM* controla o padrão de expressão gênico durante a diferenciação dos linfócitos B (Huang, 1994) e regula mudanças epigenéticas necessárias para a especificação das células dos primórdios embrionários (Ohinata et al., 2005). Recentemente Robertson e colaboradores (2007) estudando modelos animais relataram que o gene tem um papel essencial na população de células multipotentes progenitoras dos membros posteriores, arcos faríngeos e campo de desenvolvimento do coração e mantém centros de sinalização nesses diversos tecidos. Além disso, sabe-se que o gene também participa de outras cascatas de sinalização no desenvolvimento embrionário interagindo com outros genes importantes como os *FGFs*, *Wnts*, *TBX*, entre outros (Mercader et al., 2006; Smith et al., 2007).

As células de mamíferos expressam altos níveis de proteína Atp5 durante a apoptose (Grande et al., 1995). Esse processo é um processo ativo de morte celular e é fundamental no desenvolvimento e homeostase dos tecidos. Além desse tipo de morte celular, demonstrou-se que o gene induz a autofagia (Kuma et al., 2004). O gene, assim como o *PRDM1* também tem papel essencial no desenvolvimento dos linfócitos B (Miller et al., 2008).

Apesar de dois genes e talvez outros fatores ainda desconhecidos estarem duplicados, ainda não foi possível uma completa correlação entre o genótipo e o fenótipo do paciente.

A paciente 9 com DLMFH apresentou uma deleção de apenas um clone (clone RP11-706L12) no cromossomo 7p14.1 e esta região contém o gene *GLI3*, ou seja, em um alelo parte desse gene estaria deletado. O gene *GLI3* tem um papel importante no desenvolvimento dos membros e cérebro (Villavicencio, Walterhouse e Iannaccone, 2000; Jacob e Briscoe, 2003; Shum et al., 2003; Motoyama, 2006; Riobo e Manning, 2007) e também está diretamente envolvido na transdução de sinal do gene *SHH* (Motoyama, 2006), podendo assim ter confirmando a hipótese inicial do envolvimento do gene *SHH* na etiologia dos DLMFH.

Mutações no gene *GLI3* causam a Síndrome Greig cephalo-poli-sindactilia (GCPS) (Vortkamp et al., 1991; Wild et al., 1997; Kalff-Suske et al., 1999), distúrbio autossômico dominante que afeta o desenvolvimento craniofacial e dos membros (Greig, 1928; Brueton et al., 1988; Debeer et al., 2003). A GCPS é caracterizada por polidactilia pré e pós axial, sindactilia, macrocefalia e hipertelorismo (Johnston et al., 2005), ou seja, apresenta sobreposição de sinais clínicos com os DLMFH.

Para comprovação dessa alteração foi feito outro tipo de *array*, o de oligonucleotídeo (oaCGH), o qual apresenta plataformas com oligos sintetizados oferecidos comercialmente pela Agilent (<http://www.agilent.com>), com uma resolução ainda maior para delimitar a região. O resultado do oaCGH foi negativo e mostrou que o clone deletado era apenas um artefato de técnica.

O paciente 10 com DLMFH apresentou uma deleção terminal no braço curto do cromossomo 9 (9p24.1-9p24.3) e uma duplicação da região 20p13, representados nas figuras 61 e 62.

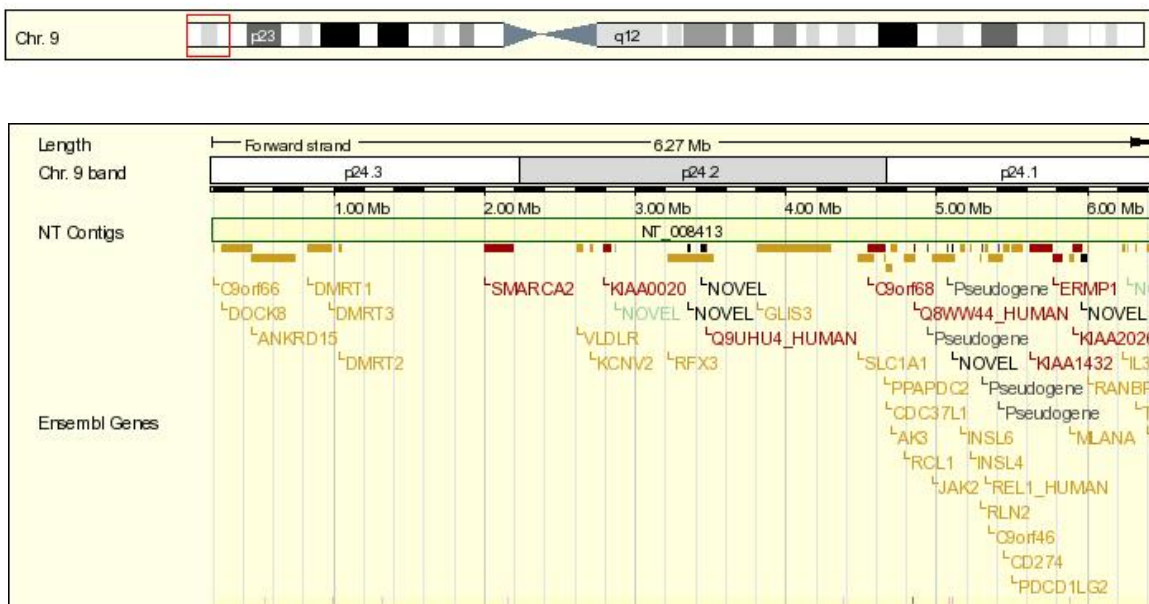


Figura 60 Representação dos genes contidos na região 9p24.1-9p24.3 (figura adaptada do *Ensembl Genome Browser*).

Após exame dos cariótipos dos pais, notou-se que a aberração cromossômica era de origem materna, pois sua mãe tinha uma translocação recíproca envolvendo os cromossomos 9 e 20.

Rearranjos envolvendo a região distal do braço curto do cromossomo 9 (9p22 a 9p24) são bem descritos e geralmente envolvem deleções ou duplicações resultando em monossomia parcial do 9p (9p-) (Huret et al., 1988; OMIM 158170) ou síndrome da trissomia parcial 9p (Young et al., 1982; Wilson et al., 1985), respectivamente. Ambas incluem retardo mental e achados craniofaciais característicos. Muitos pacientes descritos têm outros desbalanços cromossômicos além da deleção 9p (Huret et al., 1988), tornando difícil relacionar sinais clínicos característicos a bandas particulares. Sexo reverso tem sido visto em pacientes homens com rearranjos terminais em 9p24 (Hoo et al., 1989; Bennet et

al., 1993; Guioli et al., 1998) e a região crítica parece estar sublocalizada em 9p24.3 (Flejter et al., 1996).

Alguns genes dentro da região são: *DMRT1*, *DMRT2* (*Doublesex- and MAB3-related transcription factor 1 e 2*, OMIM 602424 e 604935), *KCNV2* (*Potassium Channel, Voltage-Gated, Subfamily V, Member 2*, OMIM 607604), *GLIS3* (*Glis Family Zinc Finger Protein 3*, OMIM 610192), *IL33* (*Interleukin 33*, OMIM 608678).

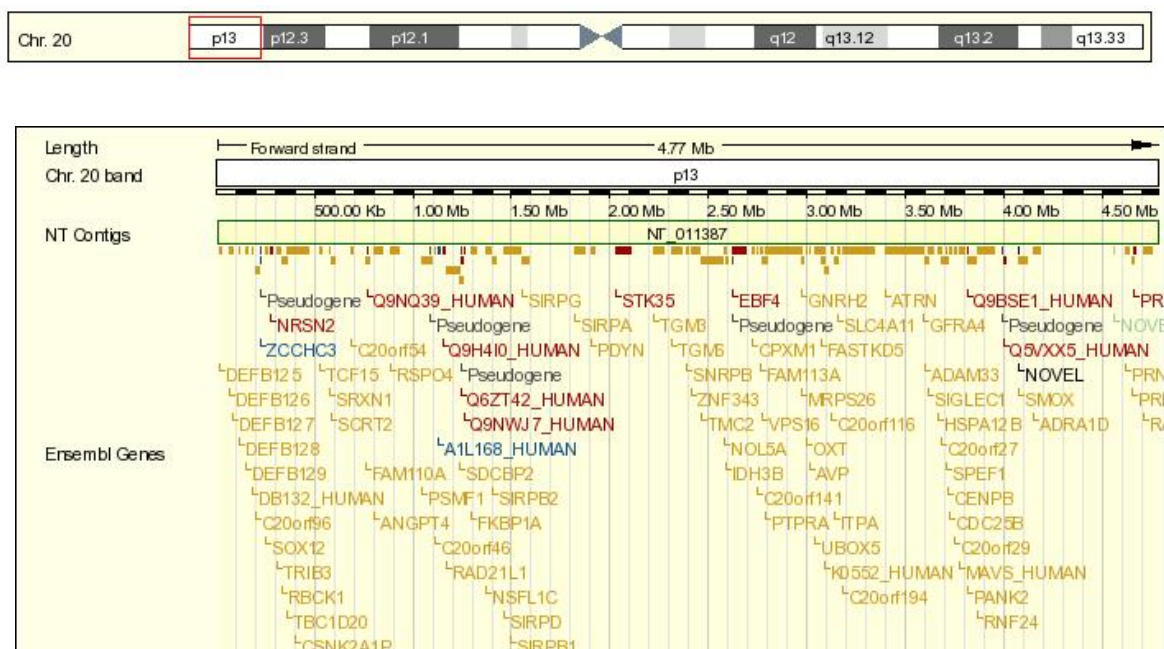


Figura 61 Representação dos genes contidos na região 20p13 (figura adaptada do *Ensembl Genome Browser*).

Trissomia do braço curto do cromossomo 20 é uma anomalia cromossômica relativamente rara e poucos casos já foram descritos (Sidwell et al., 2000; Thomas et al., 2004; Venditti et al., 2004). A maioria dos pacientes apresenta trissomia parcial da região 20p devido a rearranjos derivados de translocações herdadas dos genitores (Taylor et al., 1976; Marcus et al., 1979; Centerwall e Francke, 1983; Funderburk et al., 1983;

Oppenheimer et al., 2000; Thomas et al., 2004). Assim, a correlação entre o desbalanço genético e o fenótipo permanece difícil, pois duplicação parcial 20p é geralmente associada com uma deleção parcial de outro cromossomo, assim como acontece com nosso paciente, ocorrendo a deleção da região 9p24.1-9p24.3 e a duplicação de 20p13.

Alguns genes dentro da região são: *SOX12* (*Sry-box 12*, OMIM 601947), *AVP* (*Arginine Vasopressin*, OMIM 192340), *ADAM33* (*Disintegrin and Metalloproteinase Domain 33*, OMIM 607114), *OXT* (*Oxytocin*, OMIM 167050).

Em 1982, Hoo e colaboradores descreveram uma translocação entre 9p e 20p em portadores aparentemente balanceados. Os sinais clínicos encaixavam-se com aqueles descritos na Síndrome 9p- e sobrepõem-se aos do nosso paciente. Além de retardo mental, outras características incluem: atraso de desenvolvimento motor, trigonocefalia, ponte nasal alargada, palato alto, alterações em membros.

Além dessas alterações possivelmente deletérias, foram encontrados muitos CNVs (*Copy Number Variations*), os quais são segmentos de DNA com 1 kb ou mais presentes em número variável em comparação com um genoma referência (Feuk et al., 2006) e que aparentemente não estavam relacionados a qualquer distúrbio genético. Estes CNVs já tinham sido descritos em estudos de Redon et al. (2006) e estavam no banco de dados do Projeto HapMap, sendo comuns na população em geral.

O estudo mostrou que a técnica de *array-CGH* é uma poderosa ferramenta para a investigação de alterações cromossômicas não visíveis com a técnica de citogenética clássica e que essas alterações podem estar envolvidas na etiologia de malformações craniofaciais raras como os Defeitos de Linha Média Facial com Hipertelorismo.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. A triagem de mutações nos genes candidatos *IRF6*, *P63*, *TBX10*, *OSR2* e *FOXE1* nos pacientes com BCD não detectou alterações que pudessem ser a causa da síndrome.
2. A triagem de mutações nos genes candidatos *FGF8*, *PAX3*, *SHH* nos pacientes com BCD e DLMFH não detectou alterações relacionadas à doença.
3. Foram encontradas alterações cromossômicas em alguns pacientes, sendo essas em locais distintos do genoma. Trata-se tanto de deleções como duplicações e elas devem ser estudadas mais profundamente para associar os genótipos com os fenótipos e elucidar melhor o papel dos genes envolvidos na etiologia desses defeitos.
4. Os resultados deste estudo ainda não trouxeram esclarecimentos que permitissem mudanças no aconselhamento genético das famílias com DLMFH, mas como há casos de alterações cromossômicas e essas podem ser herdadas, torna-se necessário o teste de todos os membros envolvidos e sugerem que a abordagem de investigação deste grupo de defeitos congênitos deva ser individualizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AASE, J.M. Diagnostic dysmorphism. New York: Plenum Medical Book Company, 1990: 299p.
2. ALBERTSON, D.G.; PINKEL, D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 15;12, 2003
3. ALTMAN, D.H.; ALTMAN, N.R.; MITNICK, R.J.; SHPRINTZEN, R.J. Further delineation of brain anomalies in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet (Neuropsych Genet)* 60:174–175, 1995.
4. AMERICAN CLEFT PALATE-CRANIOFACIAL ASSOCIATION. Parameters for Evaluation and treatment of patients with cleft lip/palate or other craniofacial anomalies. Chapel Hill, 2000, 30p.
5. AMIEL, J.; BOUGEARD, G.; FRANCCANNET, C.; RACLIN, V.; MUNNICH, A.; LYONNET, S.; FREBOURG, T. TP63 gene mutation in ADULT syndrome. *Europ J Hum Genet* 9: 642-645, 2001.
6. ANTONARAKIS, S.E. BACKing up the promises. *Nat Genet* 27(3): 230-2, 2001.
7. ARAÚJO, M.; SANCHES, M.R.; SUZUKI, L.A.; GUERRA, J.R.G.; FARAH, S.B.; MELLO, M.P. Molecular analysis of CYP21 and C4 genes in Brazilian families with the classical form of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Braz J Med Biol Res* 29: 1-13, 1996.
8. ASHER, J.H., JR.; SOMMER, A.; MORRELL, R.; FRIEDMAN, T.B. Missense mutation in the paired domain of PAX3 causes craniofacial-deafness-hand syndrome. *Hum Mutat* 7: 30-35, 1996.
9. BALDINI, A. DiGeorge syndrome: the use of model organisms to dissect complex genetics. *Hum Mol Genet* 11(20): 2363–2369, 2002.
10. BALDWIN, C.T.; HOTH, C.F.; AMOS, J.A.; DA-SILVA, E.O.; MILUNSKY, A. An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* 355(6361):637-8, 1992.
11. BARKOVICH, A.J.; KUZNIECKY, R.I.; JACKSON, G.D.; GUERRINI, R.; DOBYNS, W.B. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology* 57(12):2168-2178, 2001.
12. BAUMER, A.; DUTLY, F.; BALMER, D.; RIEGEL, M.; TUKEL, T.; KRAJEWSKA-WALASEK, M.; SCHINZEL, A. A high level of unequal meiotic crossovers at the origin of the 22q11.2 and 7q11.23 deletions. *Hum Mol Genet* 7(5):887-894, 1998.
13. BLANTON, S.H.; CORTEZ, A.; STAL, S.; MULLIKEN, J.B.; FINNELL, R.H.; HECHT, J.T. Variation in IRF6 contributes to nonsyndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet A* 137(3):259-262, 2005.
14. BEJJANI, B.A.; SALEKI, R.; BALLIF, B.C.; ROREM, E.A.; SUNDIN, K.; THEISEN, A.; KASHORK, C.D.; SHAFFER, L.G. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: Is less more? *Am J Med Genet A* 134: 259–267, 2005.
15. BELLONI, E.; MUENKE, M.; ROESSLER, E.; TRAVERSO, G.; SIEGEL-BARTELT, J.; FRUMKIN, A.; et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14(3):353-356, 1996.

16. BENNETT, C.P.; DOCHERTY, Z.; ROBB, S.A.; RAMANI, P.; HAWKINS, J.R.; GRANT, D. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet* 30:518–520, 1993.
17. BENNICELLI, J.L.; FREDERICKS, W.J.; WILSON, R.B.; RAUSCHER, F.J.; BARR, F.G. Wild type PAX3 protein and the PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma contain potent, structurally distinct transcriptional activation domains. *Oncogene* 11(1):119-30, 1995.
18. BINGHAM, P.M.; ZIMMERMAN, R.A.; MCDONALD-MCGINN, D.M. Enlarged sylvian fissures in infants with interstitial deletion of chromosome 22q11. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 74:538–543, 1997.
19. BOBICK, B.E.; THORNHILL, T.M.; KULYK, W.M. Fibroblast growth factors 2, 4, and 8 exert both negative and positive effects on limb, frontonasal, and mandibular chondrogenesis via MEK-ERK activation. *J Cell Physiol* 211(1):233-43, 2007.
20. BROWN, L.Y.; BROWN, S.A. Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats. *Trends Genet* 20(1):51-8, 2004.
21. BRUETON, L.; HUSON, S. M.; WINTER, R. B.; WILLIAMSON, R. Chromosomal localisation of a developmental gene in man: direct DNA analysis demonstrates that Greig cephalopolysyndactyly maps to 7p13. *Am J Med Genet* 31: 799-804, 1988.
22. BRUNELLI, S.; FAIELLA, A.; CAPRA, V.; NIGRO, V.; SIMEONE, A.; CAMA, A.; et al. Germline mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. *Nat Genet* 12(1):94-96, 1996.
23. BUCKLEY, P.G.; MANTRIPRAGADA, K.K.; BENETKIEWICZ, M.; TAPIA-PAEZ, I.; DIAZ DE STAHL, T.; ROSENQUIST, M. et al. A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum Mol Genet* 11:3221–3229, 2002.
24. BUSH, J. O.; LAN, Y.; JIANG, R. The cleft lip and palate defects in Dancer mutant mice result from gain of function of the Tbx10 gene. *Proc Nat Acad Sci* 101: 7022-7027, 2004.
25. CARRÉ, A.; CASTANET, M.; SURA-TRUEBA, S.; SZINNAI, G.; VAN VLIET, G.; TROCHET, D.; et al. Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet* 122(5):467-476, 2007.
26. CARLSON, C.; SIROTKIN, H.; PANDITA, R.; GOLDBERG, R.; MCKIE, J.; WADEY, R.; et al. Molecular definition of 22q11 deletions in 151 velo-cardio-facial syndrome patients. *Am J Hum Genet* 61(3):620-629, 1997.
27. CARINCI, F.; PEZZETTI, F.; SCAPOLI, L.; MARTINELLI, M.; CARINCI, P.; TOGNON, M. Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate. A review of international studies and data regarding the italian population. *Cleft Palate-Craniofac J*, 37(1): 35-40, 2000.
28. CASAL-ANDREWS, M; JHONSTON, D; FLETCHER, J; MULLIKEM, J.B.; STAL, S.; HECHT, J.T. Cleft lip with or without cleft palate: effect of family history on reproductive planning, surgical timing, and parental stress. *Cleft Palate-Craniofac J* 35(1):52-57, 1997.
29. CASTANET, M.; PARK, S.M.; SMITH, A.; BOST, M.; LEGER, J.; LYONNET, S.; et al. A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Molec Genet* 11: 2051-2059, 2002.
30. CELLI, J.; DUIJF, P.; HAMEL, B.C.; BAMSHAD, M.; KRAMER, B.; SMITS, A.P.; et al, Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 99(2):143-153, 1999.

31. CENTERWALL, W.; FRANCKE, U. Familial trisomy 20p. Five cases and two carriers in three generations. *Ann Ge'ne't* 20: 77-83, 1983.
32. CHADWICK, B. P.; OBERMAYR, F.; FRISCHAUF, A.M. FKHL15, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. *Genomics* 41: 390-396, 1997.
33. CHALEPAKIS, G.; JONES, F.S.; EDELMAN, G.M.; GRUSS, P. Pax-3 contains domains for transcription activation and transcription inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26):12745-12749, 1994.
34. CHEN, H. An approach to work-up of dysmorphic patients: clinical, cytogenetic, and molecular aspects. *Keio J Med* 43(2):98-107, 1994.
35. CHIANG, C.; LITINGTUNG, Y.; LEE, E.; YOUNG, K.E.; CORDEN, J.L.; WESTPHAL, H.; BEACHY, P.A. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383(6599):407-413, 1996.
36. CHONG, S.S; CHEAH, F.S; JABS, E.W. Genes Implicated in Lip and Palate Development. In: WYSZYNSKI, D.F. *Cleft Lip and Palate from Origin to Treatment*. New York: Oxford University Press, 2002. p127-158.
37. CHOW, E.; ZIPURSKY, R.B.; MIKULIS, D. MRI findings in adults with 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *Schizophr Res* 138:189, 1999.
38. CLIFTON-BLIGH, R. J.; WENTWORTH, J. M.; HEINZ, P.; CRISP, M. S.; JOHN, R.; LAZARUS, J. H.; LUDGATE, M.; CHATTERJEE, V. K. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nature Genet* 19: 399-401, 1998.
39. COHEN, M.M.Jr; SEDANO, H.O.; GORLIN, R.J.; JIRASEK, J.E. Frontonasal dysplasia (median cleft face syndrome): Comments on etiology and pathogenesis. In: *Birth Defects*. OAS, White Plains, 1971. 7, p.117-119.
40. COHEN, M.M.Jr; GORLIN, R.J.; FRASER, F.C. Craniofacial disorders. In Rimoin, d.I.; connor, j.m. e PYERITZ, R.E. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 3th ed. New York: Crurchill livingston, 1997. I, tomo III, 1121-1148.
41. COHEN, M.M.Jr. Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic, and clinical perspectives. *Am J Med Genet* 115: 245-268, 2002.
42. COHN, M.J.; IZPISUA-BELMONTE, J.C.; ABUD, H.; HEATH, J.K.; TICKLE, C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80(5):739-746, 1995.
43. CONRAD, B.A., HIGGINS, R.R., PIERPONT, M.E. Duplication 6q22/qter: definition of the phenotype. *Am J Med Genet* 78: 123-136, 1998.
44. CORREA, A.; EDMONDS, L. In: WYSZYNSKI, D.F. (Edit). *Cleft Lip and Palate from Origin to Treatment*. New York: Oxford University Press, 2002. p.117-126.
45. CREUZET, S.; COULY, G.; VINCENTI, C.; Le DOUARIN, N.M. Negative effects of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development* 129: 4301-4313, 2002.
46. CROSSLEY, P.H. e MARTIN, G.R. The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121(2):439-451, 1995.

47. D'ANTONI, S.; MATTINA, T.; DI MARE, P.; FEDERICO, C.; MOTTA, S.; SACCONI, S. Altered replication timing of the Hira/Tuple1 locus in the DiGeorge and Velocardiofacial syndromes. *Gene* 333, 111-119, 2004.
48. DATTANI, M.T.; MARTINEZ-BARBERA, J.-P.; THOMAS, P.Q.; BRICKMAN, J.M.; GUPTA, R.; MÅRTENSSON, I.-L.; et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nature Genet* 19: 125-133, 1998.
49. DAVE, B.J.; SANGER, W.G. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Semin Pediatr Neurol* 14(1):2-6, 2007.
50. DE FELICE, M.; OVITT, C.; BIFFALI, E.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; ARRA, C.; ANASTASSIADIS, K.; et al. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nature Genet* 19: 395-398, 1998.
51. DEBEER, P.; DE RAVEL, T.J.; DEVRIENDT, K.; FRYNS, J.P.; HUYSMANS, C.; VAN DE VEN W.J. Human homologues of Osr1 and Osr2 are not involved in a syndrome with distal limb deficiencies, oral abnormalities, and renal defects. *Am J Med Genet*. 111(4):455-456, 2002.
52. DEBEER, P.; PEETERS, H.; DRIESS, S.; DE SMET, L.; FREESE, K.; MATTHIJS, G.; BORNHOLDT, D. et al. Variable phenotype in Greig cephalopolysyndactyly syndrome: clinical and radiological findings in 4 independent families and 3 sporadic cases with identified GLI3 mutations. *Am J Med Genet* 120A: 49-58, 2003.
53. DeMYER, W. The median cleft face syndrome. Differential diagnosis of cranium bifidum occultum, hypertelorism, and median cleft nose, lip, and palate. *Neurology* 17: 961-971, 1967.
54. DEOL, M.S.; LANE, P.W. A new gene affecting the morphogenesis of the vestibular part of the inner ear in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 16: 543-558, 1996.
55. DEVRIENDT, K.; EYSKENS, B.; SWILLEN, A.; DUMOULIN, M.; GEWILLIG, M.; FRYNS, J.P. The incidence of a deletion in chromosome 22Q11 in sporadic and familial conotruncal heart disease. *Eur J Pediatr* 155(8):721, 1996a.
56. DEVRIENDT, K.; VAN THIENEN, M.N.; SWILLEN, A.; FRYNS, J.P. Cerebellar hypoplasia in a patient with velo-cardio-facial syndrome. *Dev Med Child Neurol* 38:949-953, 1996b.
57. DEVRIENDT, K.; FRYNS, J.P.; MORTIER, G.; VAN THIENEN, M.N.; KEYMOLEN, K. The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet* 35: 789-790, 1998.
58. DOCO-FENZY, M.; LANDAIS, E.; ANDRIEUX, J.; SCHNEIDER, A.; DELEMER, B.; SULMONT, V. et al. Deletion 2q36.2q36.3 with multiple renal cysts and severe mental retardation. *Eur J Med Genet* Sep 6, 2008.
59. DROUIN, J. Les molécules du développement. *Med Sci* 12: 143-145, 1996.
60. EDELMANN, L.; PANDITA, R.K.; MORROW, B.E. Low-copy repeats mediate the common 3Mb deletion in patients with the velocardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 64(4): 1076-1086, 1999.
61. DUBOULE, D. The vertebrate limb: a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution. *Bioessays* 14(6):375-384, 1992.
62. Echelard, Y.; Epstein, D. J.; St-Jacques, B.; Shen, L.; Mohler, J.; McMahon, J. A.; McMahon, A. P. : Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-1430, 1993.

63. EICHBERGER, T.; REGL, G.; IKRAM, M.S.; NEILL, G.W.; PHILPOTT, M.P.; ABERGER, F.; FRISCHAUF, A.M. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2 is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*, 122(5):1180-7, 2004.
64. ERTZER, R.; MULLER, F.; HADZHIEV, Y.; RATHNAM, S.; FISCHER, N.; RASTEGAR, S.; STRAHLE, U. Cooperation of sonic hedgehog enhancers in midline expression. *Dev Biol* 301(2):578-589, 2007.
65. FAIELLA, A.; BRUNELLI, S.; GRANATA, T.; D'INCERTI, L.; CARDINI, R.; LENTI, C. et al. A number of schizencephaly patients including 2 brothers are heterozygous for germline mutations in the homeobox gene EMX2. *Eur J Hum Genet* 5(4):186-190, 1997.
66. FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1):6-13, 1983.
67. FEINGOLD, J.; BOIS, E.; CHOMPRET, A.; BROYER, M.; GUBLER, M.C.; GRÜNFELD, J.P. Genetic heterogeneity of Alport syndrome. *Kidney Int* 27(4):672-677, 1985.
68. FEUK, L.; MARSHALL, C.R.; WINTLE, R.F.; SCHERER, S.W. Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet* 15;15 Spec No 1:R57-66, 2006.
69. FIEGLER, H.; REDON, R.; CARTER, N.P. Construction and use of spotted large-insert clone DNA microarrays for the detection of genomic copy number changes. *Nat Protoc* (3):577-587, 2007.
70. FIRNBERG, N.; NEUBUSER, A. FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region. *Dev Biol* 247(2):237-250, 2002.
71. FLEJTER, W.L.; GORSKI, J.L.; LLOYD, M. A gene involved in sex reversal maps to chromosome 9p. *Am J Hum Genet* 61(2):182-187, 1996.
72. FONTAINE, G.; WALBAUM, R.; POUPARD, B.; BONTE, C.; DHELLEMMES, P.; MAQUET, E.; YTHIER, H.; STEVENARD, C. Fronto-nasal dysplasia (apropos of 4 cases). *J Genet Hum* 31 Suppl 5:351-365, 1983.
73. FOX, J.W.; WALSH, C.A. Periventricular heterotopia and the genetics of neuronal migration in the cerebral cortex. *Am J Med Genet* 65:19-24, 1999.
74. FRANCIS-WEST, P.; LADHER, R.; BARLOW, A.; GRAVESON, A. Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 75: 3-28, 1998.
75. FRYBURG, J.S.; PERSING, J.A.; LIN, K.Y. Frontonasal dysplasia in two successive generations. *Am J Med Genet* 46:712-714, 1993.
76. FRYNS, J.P.; KLECZKOWSKA, A.; VAN DER BERGHE, H. Frontonasal malformation and reciprocal translocation t (15;22) (q22;q13). *Clin Genet* 44:46-47, 1993.
77. FUNDERBURK, S.J.; SPARKES, R.S.; SPARKES, M.C. Trisomy 20p due to a paternal reciprocal translocation. *Ann Génét* 26: 94-97, 1983.
78. GREIG, D. M. Oxycephaly. *Edinburgh Med J* 33: 189-218, 1928.
79. GIFFONI, S.D.; GONÇALVES, V.M.G.; ZANARDI, V.A.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L. Angular analysis of corpus callosum in 18 patients with Frontonasal Dysplasia. *Arch Neuropsychiatr* 62:195-198, 2004.
80. GIFFONI, S.D. Estudos de neuroimagem quantitativa em indivíduos com anomalias craniofaciais. Campinas, 2005 (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).

81. GIFFONI, S.D.; GONÇALVES, V.M.G.; ZANARDI, V.A.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L. Cerebellar involvement in midline facial defects with ocular hypertelorism. *Cleft Palate Craniofac J* 43(4):466-470, 2006.
82. GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L. A Malformação Frontonasal: estudo genético-clínico de 31 pacientes não portadores de quadros sindrômicos já definidos. Campinas, 1997 (Tese - Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).
83. GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L.; GUION-ALMEIDA, M.L.; DE OLIVEIRA RODINI, E.S. (2003): Blepharocheilodontic (BCD) syndrome: expanding the phenotype? *Am J Med Genet*, 21A(3):266-70.
84. GIL-DA-SILVA-LOPES, V.L.; MACIEL-GUERRA, A.T. A Clinical Study of 31 individuals with Midline Facial Defects with Hypertelorism and a guideline for follow-up. *Arq Neuropsiquiatr* 65(2B):396-401, 2007.
85. GOLDBERG, R.; MOTZKIN, B.; MARION, R.; SCAMBLER, P.J.; SHPRINTZEN, R.J. Velo-cardio-facial syndrome: a review of 120 patients. *Am J Med Genet* 45(3):313-9, 1993.
86. GOLLOP, T.R. Estudo genético-clínico das disostoses mandibulofacial e frontofacionasal. São Paulo, 1981 (Tese - Doutorado em Ciências - Universidade de São Paulo).
87. GORLIN, R.; COHEN Jr, M.M.; LEVIN, L.S. *Syndromes of the Head and Neck*. 3th ed. New York: Oxford University Press, 1990. p977.
88. GORLIN, R.J.; ZELLWEGER, H.; CURTIS, M.W.; WIEDEMANN, H.R.; WARBURG, M.; MAJEWSKI, F.; et al. Blepharo-cheilo-dontic (BCD) syndrome. *Am J Med Genet* 65:109-112, 1996.
89. GORSKI, J.L.; KIYNE, M.; UHLMANN, W.; LOEFFLER, K.; GLOVER, T.W. Interstitial deletion of 2(q33q36) in a child with congenital abnormalities. *J Med Genet* 26(3):204-205, 1989.
90. GOULDING, M.D.; CHALEPAKIS, G.; DEUTSCH, U.; ERSELIUS, J.R.; GRUSS, P. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J*, 10: 1135-1147, 1991.
91. GRAND, R. J. A.; MILNER, A. E.; MUSTOE, T.; JOHNSON, G. D.; OWEN, D.; GRANT, M. L.; GREGORY, C.D. A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. *Exp. Cell Res* 218: 439-451, 1995.
92. GRESHOCK, J.; NAYLOR, T.L.; MARGOLIN, A.; DISKIN, S.; CLEAVER, S.H.; FUTREAL, P.A. et al. 1-Mb resolution array-based comparative genomic hybridization using a BAC clone set optimized for cancer gene analysis. *Genome Res*. 14: 179-187, 2004.
93. GRIPP, K.W.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; DRISCOLL, D.A.; REED, L.A.; EMANUEL, B.S.; ZACKAI, E.H. Nasal dimple as part of the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet* 69(3):290-292, 1997.
94. GUIOLI, S.; SCHMITT, K.; CRITCHER, R.; BOUZYK, M.; SPURR, N.K.; OGATA, T.; HOO, J.J.; PINSKY, L.; GIMELLI, G.; PASZTOR, L.; GOODFELLOW, P.N. Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal: refining the localization of a sex-determining gene to the tip of the chromosome. *Am J Hum Genet* 63: 905-908, 1998.
95. GUION-ALMEIDA, M.L.; RICHERI-COSTA, A.; COHEN Jr, M.M. Frontonasal Dysplasia: analysis of 21 cases and literature review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25: 91-97, 1996.

96. GUION-ALMEIDA, M.L.; RODINI, E.S.O.; KOKITSU-NAKATA, N.M.; BOLOGNA-AMANTINI, D. Blepharo-cheilo-dontic (BCD) syndrome: report on four new patients. *Am J Med Genet*, 76:133-136, 1998.
97. GUION-ALMEIDA, M.L. Hipertelorismo e defeitos de linha média facial: Estudo genético-clínico de uma amostra de pacientes. Campinas, 2000 (Tese – Doutorado – Universidade Estadual de Campinas).
98. GUTTMACHER, A.E.; JENKINS, J.; UHLMANN, W.R. Genomic medicine: who will practice it? A call to open arms. *Am J Med Genet*. 106(3):216-222, 2001.
99. GUYURON, B.; BEHMAND, R.A.; MICHELOW, B. Blepharolabioanal syndrome. *J Craniofac Surg* 6(5):392-394, 1995.
100. HALFORD, S.; WADEY, R.; ROBERTS, C.; DAW, S.C.; WHITING, J.A.; O'DONNELL, H. et al. Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum Mol Genet* 2(12):2099-2107, 1993.
101. HAYETTE, S.; GADOUX, M.; MARTEL, S.; BERTRAND, S.; TIGAUD, I.; MAGAUD, J.-P.; RIMOKH, R. FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders. *Oncogene* 16: 2949-2954, 1998.
102. HEIKINHEIMO, M.; LAWSHE, A.; SHACKLEFORD, G.M.; WILSON, D.B.; MACARTHUR, C.A. Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech Dev* 48(2):129-138, 1994.
103. HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; VANCE, G.H. Mild "duplication 6q syndrome": a case with partial trisomy 6(q23.3q25.3). *Am J Med Genet* 68: 450-454, 1997.
104. HING, A.V.; SYED, N.; CUNNINGHAM, M.L. Familial acromelic frontonasal dysostosis: autosomal dominant inheritance with reduced penetrance. *Am J Med Genet A* 128A(4):374-382, 2004.
105. HISHINUMA, T.; NAKAMURA, H.; SAWAI, T.; MITOMO, T.; INOUE, H.; MATSUMOTO, F.; MIZUGAKI, M. Analysis of urinary prostacyclin and thromboxane/prostacyclin ratio in patients with rheumatoid arthritis using gas chromatography/selected ion monitoring. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65(2):85-90, 2001.
106. HONG, S.E.; SHUGART, Y.Y.; HUANG, D.T.; SHAHWAN, S.A.; GRANT, P.E.; HOURIHANE, J.O. et al. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* 26(1): 93-96, 2000.
107. HOO, J. J.; FISCHER, A.; FUHRMANN, W. Familial tiny 9p/20p translocation: 9p24 the critical segment for monosomy 9p syndrome. *Ann Genet* 25: 249-252, 1982.
108. HOWELL, B.W.; HAWKES, R.; SORIANO, P.; COOPER J.A. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 389: 733-737, 1997.
109. HU, D.; HELMS, J.A. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development* 126: 4873-4884, 1999.
110. HUANG, S. Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF1. *Cell* 78: 9, 1994.
111. HURET, J. L.; LEONARD, C.; FORESTIER, B.; RETHORE, M. O.; LEJEUNE, J. Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *J Med Genet*. 25: 741-749, 1988.

112. IANAKIEV, P.; KILPATRICK, M. W.; TOUDJARSKA, I.; BASEL, D.; BEIGHTON, P.; TSIPOURAS, P. Split-hand/split-foot malformation is caused by mutations in the p63 gene on 3q27. *Am J Hum Genet* 67: 59-66, 2000.
113. ISHIKIRIYAMA, S. Gene for Waardenburg syndrome type I is located at 2q35, not at 2q37.3. *Am J Med Genet* 46: 608, 1993.
114. ISHKANIAN, A.S.; MALLOFF, C.A.; WATSON, S.K.; DELEEUW, R.J.; CHI, B.; COE, B.P.; et al. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 36: 299–303, 2004.
115. JACOB, J.; BRISCOE, J. Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* 4(8):761-765, 2003.
116. JALALI, A.; ALDINGER, K.A.; CHARY, A.; MCLONE, D.G.; BOWMAN, R.M.; LE, L.C. et al. Linkage to chromosome 2q36.1 in autosomal dominant Dandy-Walker malformation with occipital cephalocele and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet* 123(3):237-245, 2008.
117. JESSELL, T.M.; SANES, J.R. Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol* 10(5):599-611, 2000.
118. JOHNSTON, J.J.; OLIVOS-GLANDER, I.; KILLORAN, C.; ELSON, E.; TURNER, J.T.; PETERS, K.F.; ABBOTT, M.H. Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet* 76(4):609-622, 2005.
119. KALFF-SUSKE, M.; WILD, A.; TOPP, J.; WESSLING, M.; JACOBSEN, E.M.; BORNHOLDT, D.; ENGEL, H. et al. Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum Mol Genet* 8(9):1769-77, 1999.
120. KANTAPUTRA, P.N.; HAMADA, T.; KUMCHAI, T.; MCGRATH, J.A. Heterozygous mutation in the SAM domain of p63 underlies Rapp-Hodgkin ectodermal dysplasia. *J Dent Res* 82: 433-437, 2003.
121. KARLIN, S.; BURGE, C. Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(4): 1560-1565, 1996.
122. KASHTAN, C.E.; MICHAEL, A.F. Alport syndrome: from bedside to genome to bedside. *Am J Kidney Dis* 22(5):627-640, 1993.
123. KAWAI, S.; YAMAUCHI, M.; WAKISAKA, S.; OOSHIMA, T.; AMANO, A. Zinc-finger transcription factor odd-skipped related 2 is one of the regulators in osteoblast proliferation and bone formation. *J Bone Miner Res* 22(9):1362-1372, 2007.
124. KIRKPATRICK, S.J.; KENT, C.M.; LAXOVA, R.; SEKHON, G.S. Waardenburg syndrome type I in a child with deletion (2) (q35q36.2) *Am J Med Genet* 44(5):699-700, 1992.
125. KIRKPATRICK, S.J.; PAULI, R.M. Frontonasal Malformation and Deletion of 22q11. *Am J Med Genet* 75:443–444, 1998.
126. KLEIN, O.D.; COTTER, P.D.; MOORE, M.W.; ZANKO, A.; GILATS, M.; EPSTEIN, C.J.; CONTE, F.; RAUEN, K.A. Interstitial deletions of chromosome 6q: genotype-phenotype correlation utilizing array CGH. *Clin Genet* 71(3):260-266, 2007.
127. KONDO, S.; SCHUTTE, B.C.; RICHARDSON, R.J.; BJORK, B.C.; KNIGHT, A.S.; MURRAY, J.C.; et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32(2):285-289, 2002.

128. KOSTER, M.I.; ROOP, D.R. p63 and epithelial appendage development. *Differentiation* 72(8):364-370, 2004.
129. KRUMLAUF, R.; MARSHALL, H.; STUDER, M.; NONCHEV, S.; SHAM, M.H.; LUMSDEN, A. Hox homeobox genes and regionalisation of the nervous system. *J Neurobiol* 24: 1328-1340, 1993.
130. KUMA, A.; HATANO, M.; MATSUI, M.; YAMAMOTO, A.; NAKAYA, H.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y.; TOKUHISA, T.; MIZUSHIMA, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432: 1032-1036, 2004.
131. LAMEY, T.M.; KOENDERS, A.; ZIMAN, M. Pax genes in myogenesis: alternate transcripts add complexity. *Histol Histopathol* 19(4):1289-1300, 2004.
132. LAN, Y.; KINGSLEY, P.D.; CHO, E.S.; JIANG, R. *Osr2*, a new mouse gene related to *Drosophila* odd-skipped, exhibits dynamic expression patterns during craniofacial, limb, and kidney development. *Mech Dev* 107: 175-179, 2001.
133. LAN, Y.; OVITT, C.E.; CHO, E.S.; MALTBY, K.M.; WANG, Q.; JIANG, R. Odd-skipped related 2 (*Osr2*) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis. *Development* 131(13): 3207-3216, 2004.
134. LAURENT, M. Gènes, cerveau et développement. *Med Sci*, 12: 996-1000, 1996.
135. LAW, D. J.; GARVEY, N.; AGULNIK, S. I.; PERLROTH, V.; HAHN, O. M.; RHINEHART, R. E.; et al. *TBX10*, a member of the *Tbx1*-subfamily of conserved developmental genes, is located at human chromosome 11q13 and proximal mouse chromosome 19. *Mammalian Genome* 9: 397-399, 1998.
136. LEOYKLANG, P.; SIRIWAN, P.; SHOTELERSUK, V. A mutation of the p63 gene in non-syndromic cleft lip. *J Med Genet* 43(6): e28, 2006.
137. LIGON, A.H.; BEAUDET, A.L.; SHAFFER, L.G. Simultaneous, multilocus FISH analysis for detection of microdeletions in the diagnostic evaluation of developmental delay and mental retardation. *Am J Hum Genet* 61: 51-59, 1997.
138. LIMA, R.L.L.F. Triagem de mutações no gene *IRF6* em portadores da síndrome de Van der Woude. Botucatu, 2005 (Tese - Doutorado - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho).
139. Lo NIGRO, C.; CHONG, C.S.; SMITH, A.C.; DOBYNS, W.B.; CARROZZO, R.; LEDBETTER, D.H. Point mutations and an intragenic deletion in *LIS1*, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 6(2): 157-164, 1997.
140. LOHNES, D.; MARK, M.; MENDELSON, C.; DOLLÉ, P.; DIERICH, A.; GORRY, P.; GANSMULLER, A.; CHAMBON, P. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120(10):2723-2748, 1994.
141. LORENZI, M.V.; LONG, J.E.; MIKI, T.; AARONSON, S.A. Expression cloning, developmental expression and chromosomal localization of fibroblast growth factor-8. *Oncogene* 10(10):2051-2055, 1995.
142. LUCITO, R.; HEALY, J.; ALEXANDER, J.; REINER, A.; ESPOSITO, D.; CHI, M.; et al. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res* 13: 2291-2305, 2003.

143. LUDOLPH, D.C.; KONIECZNY, S.F. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *FASEB J* 9(15):1595-1604, 1995.
144. LYNCH, D.R.; MCDONALD-MCGINN, D.M.; ZACKAI, E.H.; EMANUEL, B.S.; DRISCOLL, D.A.; WHITAKER, L.A.; FISCHBEK, K.H. Cerebellar atrophy in a patient with velocardiofacial syndrome. *J Med Genet* 32:561-563, 1995.
145. MACCHIA, P.E.; MATTEI, M.G.; LAPI, P.; FENZI, G.; DI LAURO, R. Cloning, chromosomal localization and identification of polymorphisms in the human thyroid transcription factor 2 gene (TTF2). *Biochimie* 81(5):433-440, 1999.
146. MARCUS, E.S.; FULLER, B.; RICCARDI, V.M. Triplication of chromosome arm 20p due to inherited translocation and secondary nondisjunction. *Am J Med Genet* 4:47-50, 1979.
147. MARIGO, V.; ROBERTS, D. J.; LEE, S. M. K.; TSUKUROV, O.; LEVI, T.; GASTIER, J. M. et al. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28: 44-51, 1995.
148. MARTÍNEZ, B.R.; MONASTERIO, L.A.; PINHEIRO, M.; FREIRE-MAIA, N. Cleft lip/palate oligodontia-syndactyly-hair alterations, a new syndrome: Review of the conditions combining ectodermal dysplasia and cleft lip/palate. *Am J Med Genet*, 27:23-31, 1987.
149. MARTÍNEZ-FRÍAS, M.L. Primary midline developmental field I. *Am J Med Genet*, 56: 374-381, 1995.
150. MARTINHAGO, C.D.; RAMOS, E.S. Blepharo-cheilo-dontic (BCD) syndrome with agenesis of thyroid broadens the phenotype and extends the discussion about the genes. *Am J Med Genet* 130(4):437-8, 2004.
151. MCBRATNEY, B.M.; MARGARYAN, E.; MA, W.; URBAN, Z.; LOZANOFF, S. Frontonasal dysplasia in 3H1 Br/Br mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 271(2):291-302, 2003.
152. MCGRATH, J.A.; DUIJF, P.H.G.; DOETSCH, V.; IRVINE, A.D.; DE WAAL, R.; VANMOLKOT, K.R.J. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum. Molec. Genet* 10: 221-229, 2001.
153. McMAHON, A.P.; BRADLEY, A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62:1073-1085, 1990.
154. MEGUID, N.A. Frontonasal dysplasia, lipoma of the corpus callosum and tetralogy of Fallot. *Clin Genet* 44(2):95-97, 1993.
155. MELNYK, A.R.; MURASKAS, J. Interstitial deletion of chromosome 2 region in a malformed infant. *Am J Med Genet* 45(1):49-51, 1993.
156. MERCADER, N.; FISCHER, S.; NEUMANN, C.J. Prdm1 acts downstream of a sequential RA, Wnt and Fgf signaling cascade during zebrafish forelimb induction. *Development* 133(15):2805-2815, 2006.
157. MEYERS, E.N., MARTIN, G.R. Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science* 285(5426):403-406, 1999.
158. MILLER, B.C.; ZHAO, Z.; STEPHENSON, L.M.; CADWELL, K.; PUA, H.H.; LEE, H.K.; et al. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy* 4(3):309-314, 2008.
159. MILLS, A.A.; ZHENG, B.; WANG, X.J.; VOGEL, H.; ROOP, D.R.; BRADLEY, A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398(6729):708-713, 1999.

160. MITNICK, R.J.; BELLO, J.A.; SHPRINTZEN, R.J. Brain anomalies in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet* 54:100–106, 1994.
161. MOHAMMED, S.N.; SWAN, M.C.; WALL, S.A.; WILKIE, A.O. Monozygotic twins discordant for frontonasal malformation. *Am J Med Genet A* 130A(4):384-388, 2004.
162. MOSSEY, P.A.; LITTLE, J. Epidemiology of Oral Clefts: an International Perspective. In: WYSZYNSKI, D.F. (Edit). *Cleft Lip and Palate from Origin to Treatment*. New York: Oxford University Press, 2002. p.117-126.
163. MOTOYAMA, J. Essential roles of Gli3 and sonic hedgehog in pattern formation and developmental anomalies caused by their dysfunction. *Congenit Anom (Kyoto)*. 46(3):123-128, 2006.
164. MURRAY, J.C.; DAACK-HIRSCH, S.; BUETOW, K.H.; MUNGER, R.; ESPINA, L.; PAGLINA, W.A.N.; et al. Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J*. 34(1):7-10, 1997.
165. NAIDICH, T.P.; OSBORN, R.E.; BAUER, B.; NAIDICH, M.J. Median cleft face syndrome: MR and CT data from 11 children. *J Comp Assist Tomogr* 12:57-64, 1988.
166. NANNI, L.; MING, J.E.; DU, Y.; HALL, R.K.; ALDRED, M.; BANKIER, A.; MUENKE, M. SHH mutation is associated with solitary median maxillary central incisor: a study of 13 patients and review of the literature. *Am J Med Genet* 102: 1-10, 2001.
167. NICKERSON, D.A.; TOBE, V.O.; TAYLOR, S.L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res* 25(14):2745-2751, 1997.
168. NISWANDER, L. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet*. 4(2):133-143, 2003.
169. OHINATA, Y.; PAYER, B.; O'CARROLL, D.; ANCELIN, K.; ONO, Y.; SANO, M.; et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436: 207-213, 2005.
170. OPITZ, J.M. The developmental field concept in clinical genetics. *J Pediatr*, 101: 805-809, 1982.
171. OPITZ, J.M.; GILBERT, E.F. CNS anomalies and the midline as a "developmental field". *Am J Med Genet* 12:443-455, 1982.
172. OPITZ, J.M. Blastogenesis and the "primary field" in human development. *Birth Defects* 29(1): 3-37, 1993.
173. OPITZ, J.M.; GILBERT, S.F. Developmental field theory and the molecular analysis of morphogenesis: a comment on dr. Slavkin's observations. *Am J Med Genet*, 47: 687-688, 1993.
174. OPPENHEIMER, S.; DIGNAN, P.; SOUKUP, S. Partial trisomy 20p: Familial occurrence. *Am J Med Genet* 95:316–319, 2000.
175. ORNITZ, D.M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2(3):REVIEWS3005, 2001.
176. OSADA, M.; OHBA, M.; KAWAHARA, C.; ISHIOKA, C.; KANAMARU, R.; KATOH, I.; et al. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 4(7):839-843, 1998.
177. PALMINI, A.; ANDERMANN, E.; ANDERMANN, F. Prenatal events and genetic factors in epileptic patients with neuronal migration disorders. *Epilepsia* 35(5): 965-973, 1994.

178. PAPAIOANNOU, V.E.; SILVER, L.M. The T-box gene family. *Bioessays* 20(1):9-19, 1998.
179. PAPAIOANNOU, V.E. Embryonic stem cells and mouse models of human syndromes: examples from the T-box gene family. *Reprod Biomed Online Suppl* 1:68-71, 2002.
180. PAZOOKI, M.; LEBBAR, A.; ROUBERGUES, A.; BAVEREL, F.; LETESSIER, D.; DUPONT, J.M. Pure familial 6q21q22.1 duplication in two generations. *Eur J Med Genet* 50(1):60-65, 2007.
181. PINKEL, D.; SEGRAVES, R.; SUDAR, D.; CLARK, S.; POOLE, I.; KOWBEL, D.; et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20: 207-211, 1998.
182. POLLACK, J.R.; PEROU, C.M.; ALIZADEH, A.A.; EISEN, M.B.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.F.; JEFFREY, S.S.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23: 41-46, 1999.
183. PRATT, V.M.; ROBERSON, J.R.; WEISS, L.; VAN DYKE, D.L. Duplication 6q21q23 in two unrelated patients. *Am J Med Genet* 80: 112-114, 1998.
184. PRESCOTT, N.J.; LEES, M.M.; WINTER, R.M.; MALCOLM, S. Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Hum Genet* 106(3):345-350, 2000.
185. REDON, R.; ISHIKAWA, S.; FITCH, K.R.; FEUK, L.; PERRY, G.H.; ANDREWS, T.D.; FIEGLER, H.; et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 23; 444(7118):444-454, 2006.
186. REINER, O.; CARROZZO, R.; SHEN, Y.; WEHNER, T.M.; FAUSTINELLA, F.; DOBYNS, W.B. et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 19: 717-721. 1993.
187. RICHIERI-COSTA, A.; GUION-ALMEIDA, M.L. The Syndrome of Frontonasal Dysplasia, Callosal Agenesis, Basal Encephalocele, and Eye Anomalies - Phenotypic and Aetiological Considerations. *Int J Med Sci* 1(1):34-42, 2004.
188. RICHMAN, J.M.; LEE, S.H. About face: signals and genes controlling jaw patterning and identity in vertebrates. *Bioessays* 25(6):554-568, 2003.
189. RIOBO, N.A.; MANNING, D.R. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J* 403(3):369-379, 2007.
190. ROBERTS, C.; DAW, S.C.M.; HALFORD, S.; SCAMBLER, P.J. Cloning and developmental expression analysis of chick Hira (Chira), a candidate gene for DiGeorge syndrome. *Hum Molec Genet* 6: 237-245, 1997.
191. ROBERTSON, E.J.; CHARATSI, I.; JOYNER, C.J.; KOONCE, C.H.; MORGAN, M.; ISLAM, A.; et al. Blimp1 regulates development of the posterior forelimb, caudal pharyngeal arches, heart and sensory vibrissae in mice. *Development* 134(24):4335-4345, 2007.
192. ROSASCO, S.A.; MASA, J.L. Frontonasal syndrome. *Brit J Plast Surg*, 21: 244-249, 1968.
193. ROESSLER, E.; BELLONI, E.; GAUDENZ, K.; JAY, P.; BERTA, P.; SCHERER, S.W.; TSUI, L.C.; MUENKE, M. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14(3):357-360, 1996.

194. ROESSLER, E.; BELLONI, E.; GAUDENZ, K.; VARGAS, F.; SCHERER, S.W.; TSUI, L.C.; MUENKE, M. Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 6(11):1847-1853, 1997.
195. RYAN, A.K.; GOODSHIPB, J.A.; WILSON, D.I.; PHILIP, N.; LEVY, A.; SEIDEL, H.; et al. Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet* 34: 798– 804, 1997.
196. SALAMA, A.D.; LEVY, J.B.; LIGHTSTONE, L.; PUSEY, C.D. Goodpasture's disease. *Lancet* 358(9285):917-920, 2001.
197. SCAMBLER, P.J. The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet* 9(16):2421-2426, 2000.
198. SHAIKH, T.H.; KURAHASHI, H.; SAITTA, S.C.; O'HARE, A.M.; HU, P.; ROE, B.A.; ET al. Chromosome 22-specific low copy repeats and the 22q11.2 deletion syndrome: genomic organization and deletion endpoint analysis. *Hum Mol Genet* 9:489–501, 2000.
199. SCHMALE, H.; BAMBERGER, C. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 15(11):1363-1367, 1997.
200. SCAPOLI, L.; PALMIERI, A.; MARTINELLI, M.; PEZZETTI, F.; CARINCI, P.; TOGNON, M.; CARINCI, F. Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *Am J Hum Genet*, 76(1):180-183, 2005.
201. SCHIMMENTI, L.A.; DE LA CRUZ, J.; LEWIS, R.A.; KARKERA, J.D.; MANLIGAS, G.S.; ROESSLER, E.; MUENKE, M. Novel mutation in Sonic hedgehog in non-syndromic colobomatous microphthalmia. *Am J Med Genet* 116A: 215-221, 2003.
202. SCHINZEL, A. Catalogue of Unbalanced Chromosomes Aberrations in Man. 2^a ed, Berlin; New York: de gruyter, 2001.
203. SCHNEIDER, R.A.; HU D.; RUBENSTEIN J.L.; MADEN M.; HELMS J.A. Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. *Development* 128(14):2755-2767, 2001.
204. SCHULZE, B.R.B.; TARIVERDIAN, G.; KOMPOSCH, G.; STELLZIG, A. Misclassification Risk of Patients with Bilateral Cleft Lip and Palate and Manifestations of Median Facial Dysplasia: A New Variant of Del(22q11.2) Syndrome? *American Journal of Medical Genetics* 99:280-285, 2001.
205. SEDANO, H.O.; COHEN Jr, M.M.; JIRASEK, J.E.; GORLIN, R.J. Frontonasal dysplasia. *J Pediatr* 76: 906-913, 1970.
206. SEDANO, H.O.; GORLIN, R.J. Frontonasal Malformation as a field defect and in syndromic associations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65: 704-710, 1988.
207. SENOO, M.; SEKI, N.; OHIRA, M.; SUGANO, S.; WATANABE, M.; INUZUKA, S.; et al. A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun* 248(3):603-607, 1998.
208. SEQUEIRA, M.J.; MORGAN, J.M.; FUHRER, D.; WHEELER, M.H.; JASANI, B.; LUDGATE, M. Thyroid transcription factor-2 gene expression in benign and malignant thyroid lesions. *Thyroid* 11(11):995-1001, 2001.
209. SEVILLA, C.; JULIAN-REYNIER, C.; EISINGER, F.; STOPPA-LYONNET, D.; BRESSAC-DE PAILLERETS, B.; SOBOL, H.; et al. Impact of gene patents on the cost-effective delivery of care: the case of BRCA1 genetic Testing. *Int J Technol Assess Health Care* 19:287-300, 2003.

210. SHAW-SMITH, C.; REDON, R.; RICKMAN, L.; RIO, M.; WILLATT, L.; FIEGLER, H.; CARTER, N.P.; et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 41: 241–248, 2004.
211. SHUM, L.; COLEMAN, C.M.; HATAKEYAMA, Y.; TUAN, R.S. Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2):102-122, 2003.
212. SIDWELL, R.U.; PINSON, M.P.; GIBBONS, B.; BYATT, S.A.; SVENNEVIK, E.C.; HASTINGS, R.J.; FLYNN, D.M. Pure trisomy 20 p resulting from isochromosome formation and whole arm translocation. *J Med Genet* 37:454–458, 2000.
213. SIMIONI, M. Investigação da região 22q11.2 em Defeitos de Linha Média Facial com hipertelorismo. Campinas, 2008 (Tese – Mestrado – Universidade Estadual de Campinas).
214. SLACK, J. Role of fibroblast growth factors as inducing agents in early embryonic development. *Mol Reprod Dev* 39(1):118-124, 1994.
215. SLAVKIN, H.C. Regulatory issues during early craniofacial development: a summary. *Cleft Palate Craniofac J* 27(2): 101-109, 1990.
216. SMITH, J. Brachyury and the T-box genes. *Curr Opin Genet Dev* 7(4):474-480, 1997.
217. SMITH, J.; THEODORIS, C.; DAVIDSON, E. H. A gene regulatory network subcircuit drives a dynamic pattern of gene expression. *Science* 318: 794-797, 2007.
218. SNIJDERS, A.M.; NOWAK, N.; SEGRAVES, R.; BLACKWOOD, S.; BROWN, N.; CONROY, J. et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29: 263–264, 2001.
219. SOLINAS-TOLDO, S.; LAMPEL, S.; STILGENBAUER, S.; NICKOLENKO, J.; BENNER, A.; DOHNER, H.; CREMER, T.; LICHTER, P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399–407, 1997.
220. SPERBER, G.H.; MACHIN, G.A. The enigma of cephalogenesis. *Cleft Palate Craniofac J*, 31: 91-96, 1994.
221. SPRANGER, J.B.K.; HALL, J.G.; LENZ, W.; LOWRY, R.B.; OPITZ, J.M.; PINSKY, L.; SCHWARSZACHER, H.G.; SMITH, D.W. Errors of morphogenesis: concepts and terms. *J Pediatr* 100: 160-165, 1982.
222. STANTON, M.C.; TANGE, J.D. Goodpasture's syndrome (pulmonary haemorrhage associated with glomerulonephritis). *Australas Ann Med* 7(2):132-144, 1958.
223. STEVENS, C.A.; QUMSIYEH, M.B. Syndromal frontonasal dysostosis in a child with a complex translocation involving chromosomes 3, 7, and 11. *Am J Med Genet* 55(4):494-497, 1995.
224. STRATTON, R.F.; PAYNE, R.M. Frontonasal malformation with tetralogy of Fallot associated with a submicroscopic deletion of 22q11. *Am J Med Genet* 69(3):287-289, 1997.
225. SUMARA, I.; PETER, M. A Cul3-based E3 ligase regulates mitosis and is required to maintain the spindle assembly checkpoint in human cells. *Cell Cycle* 15;6(24):3004-3010, 2007.
226. SWILLEN, A.; VOGELS, A.; DEVRIENDT, K.; FRYNS, J.P. Chromosome 22q11 Deletion Syndrome: Update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am J Med Genet* 97:128-135, 2000.

227. TACHDJIAN, G.; ABOURA, A.; BRISSET, S.; DOMMERGUES, M.; GAJDOS, V.; LABRUNE, P. Early and rapid prenatal diagnosis of monosomy 2q36.1 in trophoblast cells. *Fetal Diagn Ther* 21(5):428-432, 2006.
228. TAKANASHI, J.; BARKOVICH, A.J. The changing MR imaging appearance of polymicrogyria: a consequence of myelination. *Am J Neuroradiol* 24(5):788-793, 2003.
229. TANAKA, A.; MIYAMOTO, K.; MINAMINO, N.; TAKEDA, M.; SATO, B.; MATSUO, H.; MATSUMOTO, K. Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(19):8928-8932, 1992.
230. TASSABEHJI, M.; READ, A.P.; NEWTON, V.E.; HARRIS, R.; BALLING, R.; GRUSS, P.; STRACHAN, T. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355(6361):635-636, 1992.
231. TAYLOR, K.M.; WOLFINGER, H.L.; BROWN, M.G.; CHADWICK, D.L.; FRANCKE, U. Partial Trisomy 20p derived from a t(18;20) translocation. *Hum Genet* 34:155-162, 1976.
232. THOMAS, M.K.; RASTALSKY, N.; LEE, J.H.; HABENER, J.F. Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49(12):2039-2047, 2000.
233. THOMAS, M.; LAZIC, S.; BEAZLEY, L.; ZIMAN, M. Expression profiles suggest a role for Pax7 in the establishment of tectal polarity and map refinement. *Exp Brain Res* 156(3):263-273, 2004.
234. THOMAS, M.A.; DUNCAN, A.M.V.; BARDIN, C.; DER KALOUSTIAN, V.M. Lissencephaly with der(17)t(17;20) (p13.3;p12.2) mat. *Am J Med Genet Part A* 124A:292-295, 2004.
235. THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. – Thompson & Thompson: *Genética Médica: 6ª edição*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 387p.
236. TOMKOVA, K.; TOMKA, M.; ZAJAC, V. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasma* 55(3):177-181, 2008.
237. TONACCHERA, M.; BANCO, M.; LAPPI, P.; DI COSMO, C.; PERRI, A.; MONTANELLI, L. Genetic analysis of TTF-2 gene in children with congenital hypothyroidism and cleft palate, congenital hypothyroidism, or isolated cleft palate. *Thyroid* 14(8):584-588, 2004.
238. TORRES, F.R.; LOPES-CENDES, I. Aspectos genéticos das malformações do desenvolvimento cortical. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*, 8: 163-170, 2002.
239. TORIELLO, H.V.; RADECKI, L.L.; SHARDA, J.; LOOYENGA, D.; MANN, R. Frontonasal “dysplasia” cerebral anomalies and polydactyly: a report of a new syndrome and discussion from a developmental field perspective. *Am J Med Genet Suppl.* 2: 89-96, 1986.
240. TRASLER, D.G.; KEMP, D.; TRASLER, T.A. Increased susceptibility to 6-aminonicotinamide-induced cleft lip of heterozygote *Dancer* mice. *Teratology* 29: 101-104, 1984.
241. TRINK, B.; OKAMI, K.; WU, L.; SRIURANPONG, V.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. A new human p53 homologue. *Nat Med* 4(7):747-748, 1998.
242. TRUEBA, S. S.; AUGÉ, J.; MATTEI, G.; ETCHEVERS, H.; MARTINOVIC, J.; CZERNICHOV, P.; et al. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J. Clin. Endocr. Metab* 90: 455-462, 2005.
243. TSUKAMOTO, K.; TOHMA, T.; OHTA, T.; YAMAKAWA, K.; FUKUSHIMA, Y.; NAKAMURA, Y.; NIIKAWA, N. Cloning and characterization of the inversion breakpoint at

chromosome 2q35 in a patient with Waardenburg syndrome type I. *Hum Mol Genet* 1(5):315-7, 1992.

244. TURLEAU, C.; DE GROUCHY, J. Trisomy 6qter. *Clin. Genet.* 19:202-206, 1981.

245. VAN BOKHOVEN, H.; HAMEL, B.C.; BAMSHAD, M.; SANGIORGI, E.; GURRIERI, F.; DUIJF, P.H.; et al. p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 69(3):481-492, 2001.

246. VARGAS, F.R.; ROESSLER, E.; GAUDENZ, K.; BELLONI, E.; WHITEHEAD, A.S.; MUENKE, M.; et al. Analysis of the human Sonic Hedgehog coding and promoter regions in sacral agenesis, triphalangeal thumb, and mirror polydactyly. *Hum Genet*, 102(4):387-92, 1998.

247. VATAJA, R.; ELOMA, A.E. Midline brain anomalies and schizophrenia in people with CATCH 22 syndrome. *Br J Psychiatry* 172: 518–520, 1998.

248. VENDITTI, C.P.; HUNT, P.; DONNENFELD, A.; ZACKAI, E.; SPINNER, N.B. Mosaic paternal uniparental (iso) disomy for chromosome 20 associated with multiple anomalies. *Am J Med Genet Part A* 124A:274–279, 2004.

249. VENZA, M.; VISALLI, M.; VENZA, I.; TORINO, C.; SALADINO, R.; TETI, D. FOXE1 gene mutation screening by multiplex PCR/DHPLC in CHARGE syndrome and syndromic and non-syndromic cleft palate. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 836(1-2):39-46, 2006.

250. VERMEESCH, J.R.; MELOTTE, C.; FROYEN, G.; VAN VOOREN, S.; DUTTA, B.; MAAS, N. et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 53(3): 413-422, 2005.

251. VIEILLE-GROSJEAN, I.; HUNT, P.; GULISANO, M.; BONCINELLI, E.; THOROGOOD, P. Branchial HOX gene expression and human craniofacial development. *Dev Biol* 183: 49-60, 1997.

252. VIEIRA, A.R.; AVILA, J.R.; DAACK-HIRSCH, S.; DRAGAN, E.; FELIX, T.M.; MURRAY, J.C. et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet*, 1(6):e64, 2005.

253. VILLAVICENCIO, E.H.; WALTERHOUSE, D.O.; IANNACCONE, P.M. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 67(5): 1047-1054, 2000.

254. VISSERS, L.E.; VAN RAVENSWAAL, C.M.; ADMIRAAL, R.; HURST, J.A.; DE VRIES, B.B.; JANSSEN, I.M.; ET al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 36: 955–957, 2004.

255. VORTKAMP, A.; GESSLER, M.; GRZESCHIK, K.-H. GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352: 539-540, 1991.

256. WANG, J; SHACKLEFORD, G.M. Murine Wnt10a and Wnt10b: cloning and expression in developing limbs, face and skin of embryos and in adults. *Oncogene* 3;13(7):1537-1544, 1996.

257. WARKANY, J.; BOFINGER, M.K.; BENTON, C. Median facial cleft syndrome in half-sisters. Dilemmas in genetic counseling. *Teratology* 8(3):273-285, 1973.

258. WARTER, S.; LAUSECKER, C.; PENNERATH, A. A girl with a deletion (2) (q34q36): cytogenetic and clinical observations. *Hum Genet* 32(2):225-227, 1976.

259. WATKINS, W.J.; HARRIS, S.E.; CRAVEN, M.J.; VINCENT, A.L.; WINSHIP, I.M.; GERSAK, K.; SHELLING, A.N. An investigation into FOXE1 polyalanine tract length in premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 12(3):145-149, 2006.
260. WEKSBERG, R.; HUGHES, S.; MOLDOVAN, L.; BASSETT, A.S.; CHOW, E.W.C.; SQUIRE, J.A. A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics* 6:180, 2005.
261. WHITE, R.A.; DOWLER, L.L.; ANGELONI, S.V.; PASZTOR, L.M.; MACARTHUR, C.A. Assignment of FGF8 to human chromosome 10q25-q26: mutations in FGF8 may be responsible for some types of acrocephalosyndactyly linked to this region. *Genomics* 30(1):109-111, 1995.
262. WILD, A.; KALFF-SUSKE, M.; VORTKAMP, A.; BORNHOLDT, D.; KONIG, R.; GRZESCHIK, K.H. Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet* 6(11):1979-1984, 1997.
263. WILKIE, A.O. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):187-203, 2005.
264. WILMING, L.G.; SNOEREN, C.A.S.; VAN RIJSWIJK, A.; GROSVELD, F.; MEIJERS, C. The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients. *Hum Molec Genet* 6: 247-258, 1997.
265. WILSON, G.N.; RAJ, A.; BAKER, D. The phenotypic and cytogenetic spectrum of partial trisomy 9. *Am J Med Genet* 20(2):277-282, 1985.
266. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global strategies to reduce the health-care burden of craniofacial anomalies. Geneva: WHO, 2002.
267. WU, E.; VARGEVIK, K.; SLAVOTINEK, A.M. Subtypes of frontonasal dysplasia are useful in determining clinical prognosis. *Am J Med Genet A* 143A(24):3069-3078, 2007.
268. YAMAGISHI, C.; YAMAGISHI, H.; MAEDA, J.; TSUCHIHASHI, T.; IVEY, K.; HU, T.; SRIVASTAVA, D. Sonic hedgehog is essential for first pharyngeal arch development. *Pediatr Res* 59(3):349-354, 2006.
269. YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLET, E.; FLEMING, M.D.; DOTSCH, V.; et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2(3):305-316, 1998.
270. YANG, A.; SCHWEITZER, R.; SUN, D.; KAGHAD, M.; WALKER, N.; BRONSON, R.T.; et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398(6729):714-718, 1999.
271. YOSHIURA, K.; LEYSENS, N.J.; CHANG, J.; WARD, D.; MURRAY, J.C.; MUENKE, M. Genomic structure, sequence, and mapping of human FGF8 with no evidence for its role in craniosynostosis/limb defect syndromes. *Am J Med Genet* 72(3):354-362, 1997.
272. YOUNG, R.S.; REED, T.; HODES, M.E.; PALMER, C.G. The dermatoglyphic and clinical features of the 9p trisomy and partial 9p monosomy syndromes. *Hum Genet* 62(1):31-39, 1982.
273. ZANNINI, M.; AVANTAGGIATO, V.; BIFFALI, E.; ARNONE, M.I.; SATO, K.; PISCHETOLA, M.; et al. TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing

thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. EMBO J 16(11):3185-3197, 1997.

274. ZNEIMER, S.M., ZIEL, B., BACHMAN, R., Partial trisomy of chromosome 6q: an interstitial duplication of the long arm. Am J Med Genet 80:133-135, 1998.

Anexo I Parecer do Comitê de Ética da FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 27/09/05

(PARECER PROJETO 488/2002 – Registro CONEP 7016)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDIA FACIAL COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui a investigação molecular em Defeitos de Linha Média facial com Hipertelorismo, utilizando técnicas de citogenética e biologia molecular, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo II Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONCORDÂNCIA

Divulgação de Informações Clínicas e Divulgação de Imagens

Eu, _____, portador do RG no. _____, responsável por _____, autorizo o Departamento de Genética Médica / UNICAMP a divulgar informações clínicas e divulgar imagens realizadas por meio de fotografias, slides e vídeos, quer anteriores ou posteriores a essa autorização. Este material poderá ser utilizado para fins didáticos, de pesquisa, publicações científicas, eventos científicos, sem identificação nominal.

Campinas, ____/____ de ____

Assinatura: _____

Título do projeto: ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA

QUAL O OBJETIVO DESSE ESTUDO?

Existem alterações descritas de defeitos de formação e função do cérebro em pessoas que têm alterações do crânio e face. Assim, esse estudo que verificar como o cérebro é (pela exame de ressonância nuclear magnética - RNM), como é a circulação do sangue nele (pela Tomografia de Emissão de Fóton Único - SPECT) e como estão seus impulsos elétricos (com a realização do eletroencefalograma – EEG).

Dessa maneira, conheceremos melhor essas condições clínicas, as quais poderão ser compartilhadas com outros profissionais da saúde.

COMO ESSE ESTUDO SERÁ FEITO?

Com exceção do SPECT, o restante da investigação já é realizada de rotina, para as alterações do crânio e face.

Também será coletado sangue para guardar o DNA para estudos futuros dessas alterações. De todo modo, antes de qualquer estudo, será solicitada a aprovação do Comitê de Ética e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, antes de iniciarem. De qualquer maneira, qualquer coisa que seja feita você será informado. Para isso, é importante manter o endereço e telefone de contato atualizado.

Caso os responsáveis desistam do acompanhamento neste serviço ou não sejam encontrados para fornecer autorização específica, fica desde já permitida a utilização deste material, desde que o estudo seja aprovado pelos órgãos competentes (Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). Em qualquer situação, os resultados ficarão à disposição, com os médicos responsáveis por este estudo.

EXISTE RISCO OU DESCONFORTO?

Para realização da RNM, as crianças menores de 5 anos e aquelas de difícil controle necessitarão receber um calmante. Normalmente, isso já é realizado. Durante todo o exame, sempre haverá um dos médicos responsáveis por este estudo.

A anestesia pode, em alguns casos, fazer o coração bater mais rápido, dificuldade para respirar, aumento de saliva na boca e agitação. Todos esses são sintomas temporários.

Para a realização do SPECT, nos casos em que for necessário, poderá ser utilizado anestesia. Para isso, será necessária uma consulta com o anestesista, que é chamado de visita pré-anestésica, que também é rotina nesses casos.

A coleta de sangue será realizada por profissional habilitado e com material adequado, mas existe possibilidade de formação de manchas roxas.

QUAIS AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESSE ESTUDO?

Com esse estudo, poderemos saber mais sobre o cérebro e detectar alterações e se for necessário, tomar medidas de prevenção.

De modo geral, não existe nenhuma vantagem direta com a participação nesse estudo e é pouco provável que o diagnóstico ou tratamento sejam modificados.

Essa investigação, junto com aos exames moleculares que possam vir a ser realizados com o DNA extraído do sangue, poderá contribuir, no futuro, para uma melhor orientação genética da minha família ou de outras. É importante lembrar que estudos moleculares só serão feitos após os estudos neurológicos e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA

QUEM TERÁ ACESSO AOS RESULTADOS?

Os exames de que já fazem parte da investigação de alterações de crânio e face farão parte do prontuário médico do indivíduo participante e serão submetidos aos regulamentos do HC - UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Aos indivíduos que são acompanhados em outros hospitais, será fornecido relatório médico com os exames realizados.

Os resultados dos exames estarão disponíveis em no prontuário do indivíduo participante e serão fornecidos ao paciente ou seu(s) responsável(is), em consulta previamente agendada no Ambulatório de Anomalias Craniofaciais que funciona toda Sexta-feira das 13:00 às 17:00 no 2º andar do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tel. (0XX19) 3788 8908.

Se os resultados, fotografias ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação em revistas científicas, nenhuma identificação será utilizada.

Sempre que os resultados obtidos tenham relevância médica ou sejam importantes para o aconselhamento genético meu ou de minha família, eles serão comunicados à família. Para tanto, caso não haja retorno médico programado, será enviada correspondência referente à data de consulta para receber informações quanto aos resultados desses exames.

Esses resultados não poderão ser informados por telefone, correspondência ou para outras pessoas, ainda que autorizados pelos responsáveis. Por essa razão, é importante manter o endereço de correspondência atualizado.

COM QUEM POSSO ESCLARECER MINHAS DÚVIDAS?

Qualquer profissional envolvido no projeto poderá prestar esclarecimentos mas, de preferência, as dúvidas poderão ser esclarecidas com a Dra. Vera Lucia Gil da Silva Lopes ou o Dr Silvyo David Araújo Giffoni, durante consulta ou a pelo tel (0XX19) 3788-8908.

A secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (0XX19) 3788-7232 Também poderá ser contatada, em caso de informações ou reclamações.

A PARTICIPAÇÃO É OBRIGATÓRIA?:

De jeito nenhum! Só participarão os interessados. Mesmo assim, se, durante o estudo não houver mais interesse, a participação poderá ser interrompida.

De maneira nenhuma os cuidados médicos rotineiros neste hospital serão interrompidos ou modificados, atualmente ou no futuro.

É importante dizer, também, que, se os profissionais responsáveis considerarem apropriado, a participação do paciente poderá ser suspensa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: **ESTUDOS DE NEUROIMAGEM QUANTITATIVA EM INDIVÍDUOS COM DEFEITOS DE LINHA MÉDICA COM HIPERTELORISMO E OUTRAS ANOMALIAS CRÂNIO-FACIAIS RARAS E FORMAÇÃO DE BANCO DE DNA**

Eu confirmo que o (a) Dr.(a): _____

me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais o indivíduo que participará do estudo, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo

Família No. _____ Registro no Hospital de Origem: _____

Nome do paciente: _____

Nome do responsável: _____

Idade: _____ Parentesco: _____ R.G.: _____

Endereço e telefone para contato: _____

Assinatura do participante ou responsável

data

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____

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

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador ou associado

data

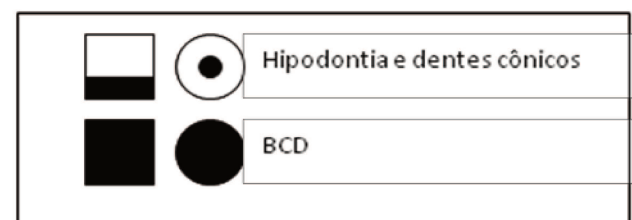
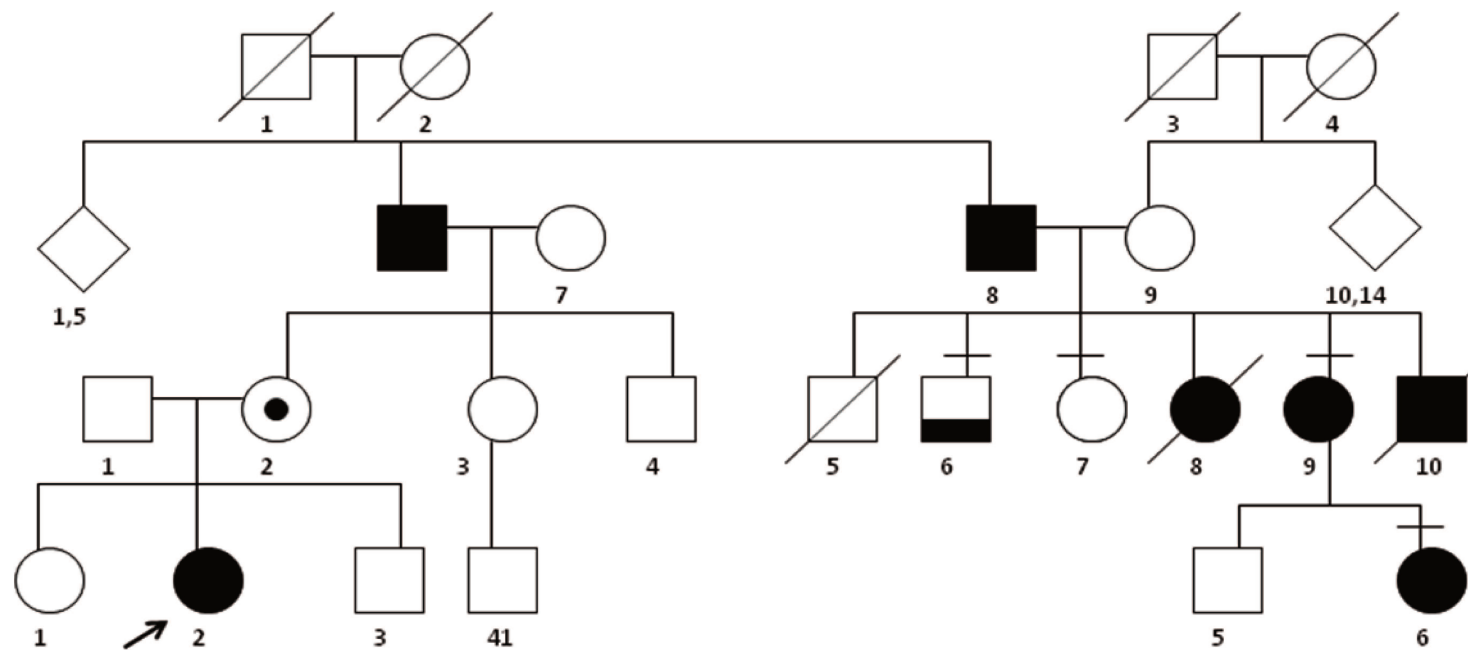
Anexo III Pacientes BCD e características clínicas

Pacientes	Sinais Clínicos
BCD1^a	Orelhas dismórficas com implantação baixa, hipertelorismo ocular, euribléfaro, lagoftalmia, ectrópio de pálpebra inferior, epicanto inverso, obstrução do canal nasolacrimal, nariz com ponte nasal larga e achatada, hipoplasia maxilar, filtro curto, fenda lábiopalatal, lábio inferior proeminente e invertido e aumento de pregas palmares. Cabelos curtos, finos e esparços, sobrancelhas anormais, distiquíase, oligodontia dos dentes permanentes e decíduos.
BCD1 - Mãe	Orelhas com implantação baixas, face alongada com prognatismo, sobrancelhas esparças, hipertelorismo ocular, epicanto de pálpebra inferior, ectrópico, euribléfaro, lagoftalmia, hipoplasia maxilar, filtro curto, fenda lábiopalatal bilateral, dentição irregular incompleta e cônica.
BCD1 - Tio	Clinicamente normal exceto pela presença de dentição imcompleta e cônica
BCD1 - Tia	Clinicamente normal.
BCD2	Hipertelorismo, euribléfaro, lagoftalmia, ectrópio de pálpebra inferior, obstrução do canal nasolacrimal, hipoplasia maxilar e malar, fenda lábiopalatal, fronte ampla e dentes cônicos.
BCD2 - Mãe	Clinicamente normal exceto por apresentar hipoplasia malar.
BCD2 - Pai	Clinicamente normal.
BCD3^b	Hipertelorismo, euribléfaro, lagoftalmia, ectrópio de pálpebra inferior, fenda lábiopalatal bilateral, fronte proeminente, oligodontia e agenesia de tireóide.

a descrito por Gil-da-Silva-Lopes et al (2003)

b descrito por Martinhago e Ramos (2004)

Anexo IV Heredograma da Família BCD1



Anexo V Dados Clínicos pacientes DLMFH

Caso	Sexo	Diagnóstico	Aspectos faciais	Outros achados	Avaliação neurológica	Avaliação do SNC
1	F	DLMFH, recorrência familiar	Hipertelorismo ocular, retração biparietal do crânio, epicanto, nariz com base nasal alargada e bífido, palato alto	Retardo mental leve, hipoplasia de grandes lábios, anteriorização anal, encurtamento de membros	Dolicofelia, hipotonia, descoordenação motora	Anteriorização do lobo frontal, alargamento da comissura talâmica
2	F	DLMFH	Hipertelorismo ocular, depressão frontal mediana, nariz bífido	Excesso de pregas palmares, alteração da pigmentação da pele	Falha óssea frontal, hipotonia,	Anteriorização do lobo frontal, alteração de corpo caloso, micropoligiria perisilviana
3	F	DLMFH	Hipertelorismo ocular, proeminência frontal, nariz com ponta levemente alargada, palato alto e estreito	Linfoedema de membros, zigodactilia de 2º e 3º dedos da mão	Dolicofelia, hipotonia, falha óssea frontal, descoordenação motora, marcha com base alargada, epilepsia	Anteriorização do lobo frontal, hipocampo esquerdo arredondado, displasia cortical, polimicrogria, alteração de corpo caloso, ventriculocle
4	F	DLMFH	Hipertelorismo ocular, proeminência frontal, epicanto, coloboma ocular, nariz bífido com sulco mediano, palato alto	Anteriorização anal, clinodactilia do 5º dedo, fovea coccígea	Dolicofelia, hipotonia	Anteriorização do lobo frontal com poucos giros, encefalocle frontal bilateral
5	M	DLMFH	Hipertelorismo ocular, telecanto, hipoplasia malar e maxilar, fenda labial mediana	Alteração da pigmentação da pele	Dolicofelia, hipotonia	Anteriorização do lobo frontal, ventriculocle esfenoidal, alteração de corpo caloso, astrocitoma

6	M	DLMFH;	Hipertelorismo ocular, depressão frontal mediana, nariz com base nasal alargada, palato alto	Implantação dos cabelos em "V", camptodactilia, distância aumentada entre hálux e 2º artelhos	Dolicofelia, hipotonia, hipoacusia	Anteriorização do lobo frontal, alteração de corpo caloso
		46, XY, add (22p13)				
7	F	DLMFH	Hipertelorismo, estrabismo, exoftalmia, braquicefalia, assimetria craniana e facial, nariz com hipoplasia alar e assimétrico, palato ogival	Implantação dos cabelos em "V", peito escavado, escoliose, clinodactilia discretado 5º dedo, membros inferiores com sindactilia cutânea 2º e 3º bilateral	Convulsões tônico-clônicas generalizadas, hipoacusia	Anteriorização do lobo frontal, cisto hipofisário, alargamento dos forames parietais, alargamento das etmóides, hipertrofia dos cornetos nasais, agenesia do corpo caloso
8	F	DLMFH	Hipertelorismo, occipital plano, crânio assimétrico, base nasal larga e ponta bífida, palato alto	Implantação dos cabelos na fronte baixa, orelhas inclinadas para trás	Dolicocefalia, hipotonia	Disgenesia de corpo caloso, heterotopia nodular do lobo frontal esquerdo, assimetria cerebelar
9	F	DLMFH	Hipertelorismo, fronte ampla com retração temporal, base nasal larga com discreto sulco mediano, palato alto	Manchas café com leite, alargamento de hálux	Dolicocefalia, hipotonia	Não avaliado
10	M	DLMFH	Hipertelorismo, discreta ptose palpebral, epicanto, estrabismo convergente, diâmetro biparietal estreito, base nasal alargada, ponta nasal, columela e úvula bífida, filtro longo e plano, palato alto,	Orelhas proeminentes, hérnia umbilical, hipospadia peniana	Dolicocefalia, hipotonia	Não avaliado

11	F	DLMFH	Hipertelorismo, telecanto, nariz com narinas separadas, palato alto, aplasia osso frontal, encefalocele espeno-etmoidal	Implantação dos cabelos em "V", orelhas com implantação baixa, inclinadas para trás, 2 orelhas com anti-hélices (dupla), dismórficas, cúbito valgo, pele com lesões cicatrizadas de espinhas, crises epiléticas	Dolicofelia, hipotonia	Lipoma de corpo caloso, encefalocele etmoidal
12	F	DLMFH	Hipertelorismo, pregas epicânticas e sobrelhas levemente arqueadas base nasal bem alargada e levemente alta, nariz bífido e narinas não lateralizadas, micrognatia , boca com palato alto, freio lingual curto e filtro curto	Implantação dos cabelos em "V", orelhas de implantação baixa e inclinadas para trás, membros superiores com hipoplasia de metacarpianos 5º leve	Dolicofelia, hipotonia	Hiperostose esfenoidal, anomalia de Chiari, alargamento do 4 ventrículo
13	F	DLMFH	Hipertelorismo, pregas epicânticas, fendas palpebrais oblíquas para baixo, estrabismo convergente, lacrimejamento, nariz bífido, micrognatia e retrognatismo, palato alto, estreito e em "V", 2º denteição falha, dentes acavalgados, pescoço levemente curto	Implantação dos cabelos em "V", orelhas de implantação no limite inferior, membros superiores hipoplasia de metacarpianos 3º e 4º, cifose, encurtamento de 4º e 5º metacarpos, pés com calcanhar afilado e dorso largo e plano, hérnia inguinal, diástase dos músculos retos abdominais , hisurtismo	Dolicofelia, hipotonia, dificuldade de aprendizagem, hiperatividade, pouca concentração, dificuldade de articulação na fala	Atrofia frontoparietal bilateral, alargamento ventricular, atrofia subcortical difusa, hidrocefalia compensatória, hipoplasia de corpo caloso, sinais de redução do supra tentório e infra tentório Atrofia frontoparietal bilateral, alargamento ventricular, atrofia subcortical difusa, hidrocefalia compensatória, hipoplasia de corpo caloso, sinais de redução do supra tentório e infra tentório