LINEU PERRONE JUNIOR

**ESTUDO DE MUTAÇÕES NOS GENES HOXA1 E HOXB1 EM
PACIENTES COM SÍNDROME DE MOEBIUS**

São Paulo

2006

Lineu Perrone Junior

**Estudo de mutações nos genes HOXA1 e HOXB1 em pacientes
com síndrome de Moebius**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Andréa Mantesso

São Paulo
2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Perrone Jr L. Estudo de mutações nos genes HOXA1 e HOXB1 em pacientes com SÍNDROME de MOEBIUS [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai (in memorian), por ter me mostrado o valor do trabalho, da retidão e da família. Ser exemplo de caráter e dedicação à família.

À minha mãe (in memorian), pela minha formação (mesmo tendo ido embora tão cedo), tendo me ensinado que é importante dizer aquilo que pensamos, e que é fundamental ser uma pessoa transparente.

Aos meus irmãos, Paulo e Carlos, que mesmo tendo suas novas famílias, prosseguem me observando no início do vôo de minha vida.

"Mas os dias que estes homens passam nas montanhas, são os dias em que realmente vivem. Quando as cabeças se limpam das teias de aranha, e o sangue corre com força pelas veias. Quando os cinco sentidos recobram a vitalidade, e o homem completo se torna mais sensível, e então já pode ouvir as vozes da natureza, e ver as belezas que só estavam ao alcance dos mais ousados."

"Reinhold Messner" – Montanhista.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Andréa, por ter me ajudado durante toda essa etapa acadêmica. Peço desculpas a você pelo meu jeito difícil, que muitas vezes foi empecilho para o andamento do projeto. Obrigado por ter sido ótima professora, grande companhia, e por ser (para sempre) uma grande amiga.

Aos colegas da turma 90; a maior e melhor de todos os tempos!

Aos meus irmãos: Rogério (que faz por esporte), Mohamed, Fernando, Thiago e Everaldo. Bruno, Gabriel, Rica e Breno (muita coisa vem a partir de agora). Vocês são as pessoas imprescindíveis na minha vida.

Aos meus irmãos “de fora”: Robert, Robson e Renato. Por compartilharem as horas difíceis e as vitórias durante minha vida.

Ao Prof. Elio Shinohara, Opir Ribeiro Jr., Bruno Gaia (novamente), pela amizade e por compartilharem o mesmo gosto pela área mais linda de nossa profissão, a cirurgia bucomaxilofacial. Márcia Campos, pós-graduanda, pela amizade e pelo apoio.

A todos os meus familiares, principalmente meus tios por manterem viva a tradição de nossa família e cultura dos imigrantes italianos, que construíram nossa cidade.

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia Bucal, pelo apoio durante a pós-graduação.

Aos funcionários da biblioteca, principalmente à Agda por me ajudar a finalizar esta tese.

Aos funcionários do “Espaço Legal”, Waltinho, Kátia, Toninho, Sílvia e Janaína.

Os alunos de pós-graduação da Patologia Bucal.

Funcionários do CAPE – FOU SP. Por ajudarem durante a coleta dos dados clínicos.

Pessoal do projeto genoma humano do IB – USP.

Profa. Sofia Sugayama, por ter prestado ajuda durante o início do trabalho, e por ter me dito algo, que eu guardarei como grande lição, para sempre.

Perrone Jr L. Estudo de mutações nos genes HOXA1 e HOXB1 em pacientes com SÍNDROME de MOEBIUS [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

A Síndrome de Moebius é caracterizada principalmente pela falta de mobilidade dos músculos da face e abdução dos olhos, conferindo ao paciente um aspecto de face em máscara devido a um comprometimento na formação das estruturas neuromusculares. A sua causa primária permanece desconhecida e várias teorias foram propostas, entre elas a teoria genética. Nesse sentido, o gene HOXB1 localizado no cromossomo 17 é um possível candidato à alteração, uma vez que em modelo animal, quando esse gene está mutado, os animais exibem o fenótipo bastante semelhante aos pacientes portadores da Síndrome de Moebius, pois perdem a mobilidade da musculatura facial. Assim sendo, este projeto propõe analisar, utilizando técnicas de amplificação e seqüenciamento de DNA, possíveis mutações no gene HOXB1 e em seu parálogo HOXA1 em pacientes portadores da Síndrome de Moebius.

Palavras-chave: Síndrome de Moebius; HOXA1; HOXB1.

Perrone Jr L. Mutational analysis study of HOXA1 and HOXB1 in MOEBIUS SYNDROME patients [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The Moebius Syndrome is characterized by the absence of facial and eyes mobility due to the underdevelopment of facial nerves and muscles causing a face-like mask in the compromised patients. The primary cause still need to be identified, however, different hypothesis have been established including a possible genetic alteration. The HOXB1 gene, located in the chromosome 17 is a possible candidate, since when it was mutated in animals; the phenotype found closely resembles features of clinical profile associated with humans suffering from Moebius Syndrome. Therefore, the aim of this study was to analyze possible mutations in the HOXB1 and in its paralogue HOXA1 in patients with the Moebius Syndrome.

Keywords: Moebius Syndrome; HOXA1; HOXB1.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Família Homeobox	11
2.2 Genes HOXA1 e HOXB1 no desenvolvimento craniofacial	14
2.3 Síndrome de Moebius	20
3 PROPOSIÇÃO	29
4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Seleção dos pacientes	30
4.2 Exame Clínico	31
4.3 Extração do DNA	34
4.4 Amplificação do DNA pela técnica do PCR	35
4.5 Purificação e seqüenciamento do produto da amplificação	37
4.6 Análise genética	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Análise clínica	40
5.2 Análise genética	50
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	79
ANEXO	96

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Moebius constitui uma doença congênita, na qual os indivíduos afetados apresentam um fenótipo de paralisia dos músculos inervados pelos nervos cranianos, principalmente o nervo facial (VII) e o nervo abducente (VI). Além do eventual envolvimento de outros nervos cranianos, alterações faciais e dos membros e tórax, podem ser encontradas (ABRAMSON; COHEN; MULLIKEN, 1998). A etiologia provável desta síndrome está relacionada a eventos vasculares ocorridos no feto no primeiro trimestre de gravidez. Porém estes eventos não explicam uma porcentagem de casos nos quais não houve nenhuma intercorrência pré-natal, e em alguns em que se observa o acometimento de outros membros da família (DOTTI et al., 1989; GONZALEZ et al., 1998). Recentes estudos associaram alterações em dois genes Homeobox (HOXA1 e HOXB1) às alterações semelhantes a encontradas na síndrome. Em estudo realizado por Goddard et al. (1996), foram gerados camundongos com duas mutações diferentes no gene Hoxb-1. A primeira no *Homeodomínio* e a segunda inativando além do *Homeodomínio*, o primeiro exon. O fenótipo dos animais que apresentavam essas duas diferentes mutações e dos animais heterozigotos era indistinguível. Uma característica marcante a todos os camundongos que portavam a mutação era a paralisia dos músculos da face. A síndrome de Bosley-Salih-Alorainy (BSAS), foi descrita como um conjunto de alterações do gene HOXA1, de herança autossômica recessiva, que determina malformações, principalmente, no sistema nervoso central (TISCHFIELD et al., 2005). Este estudo busca investigar a relação de mutações nestes dois genes

Homeobox com a síndrome de Moebius, utilizando-se para isso técnicas de seqüenciamento de amplicons obtidos pela reação em cadeia da polimerase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar o entendimento, o assunto será apresentado em diferentes tópicos.

2.1 Família Homeobox

Os genes **homeobox** são os principais controladores do desenvolvimento dos embriões que agem no topo da hierarquia genética regulando aspectos da morfogênese e da diferenciação celular em animais (MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997). Esses genes foram inicialmente descobertos na mosca *Drosophila* e foram identificados como genes que quando mutantes causavam transformação na segmentação do corpo, também conhecida como transformação homeótica. Esse fenômeno consiste na alteração de um segmento do corpo, por exemplo, uma mosca com quatro asas ao invés de duas (LEWIS, 1978).

A família Homeobox codifica proteínas regulatórias que controlam o desenvolvimento dos diferentes tecidos, incluindo os tecidos orofaciais (SHARPE, 1995). Os genes pertencentes a essa família contêm uma sequência de nucleotídeos comum (*sequência Homeobox*), que codifica proteínas nucleares específicas (*proteínas Homeóticas*) as quais agem como fatores de transcrição. A *sequência Homeobox* codifica um domínio de 60 aminoácidos, conhecido como *Homeodomínio*, que é responsável pela ligação com o DNA (CILLO et al., 1999;

FORD, 1998; SCOTT; GOLDSMITH, 1993). As análises estruturais mostram que o *Homeodomínio* consiste de um motivo *Helix-turn-Helix* que se liga ao DNA através da inserção da alça de reconhecimento na porção maior do DNA e da sua parte amino-terminal na menor porção do DNA. A especificidade dessa ligação permite que uma série de genes efetores (*downstreams*) seja ativada ou reprimida (GEHRING et al., 1990). Os genes *Homeobox* são altamente conservados e ocorrem em todo reino *Metazoa*, desde esponjas até vertebrados, e também em plantas e fungos (FINNERTY, 2003).

Nos vertebrados, a família dos genes *Homeobox* pode ser dividida em duas subfamílias: os genes *Homeobox* agrupados, conhecidos como genes **Hox** ou Classe I; e os genes *Homeobox* não agrupados, ou divergentes.

Os camundongos e os humanos contêm pelo menos 39 genes **Hox** distribuídos em 4 grupos de ligação designados **Hox a, b, c e d**, localizados em 4 diferentes cromossomas (7p, 17q, 12p e 2p). Com base nas similaridades no DNA e nas posições que esses genes ocupam nos seus respectivos cromossomas, membros individuais desses 4 grupos de ligação são classificados em 13 famílias de genes parálogos. Esses genes codificam fatores de transcrição, pertencentes à classe de homeodomínio *Antenapedia*. Análises de mutação em camundongos demonstraram que esses genes são usados para regionalizar o embrião no seu longo eixo (CHISAKA; CAPECCHI, 1991; DAVIS et al., 1995; DAVIS; CAPECCHI, 1996; FROMENTAL-RAMAIN et al., 1996). Além disso, mutações nos genes *Hox* localizados na porção 3' afetam a formação de estruturas do embrião na porção distal, enquanto que quebras nos genes da porção 5' conferem anormalidades na região proximal (DOLLÉ et al., 1989; YOKOUCHI; SASAKI; KUROIWA, 1991).

A regionalização do embrião pelos genes Hox parece ser controlada pela ativação temporal e espacial desses genes, visto que os genes 3' são ativados antes e numa posição mais anterior que os vizinhos 5' (DUBOULE; DOLLÉ, 1989). Essa cascata de ativação genética gera ninhos de transcritos do gene Hox consecutivos ao longo do eixo embrionário. Como resultado, cada região do embrião é caracterizada pela expressão de genes Hox específicos. Esses genes ativam o programa de desenvolvimento para aquela região, promovendo mitoses e apoptoses, orquestrando dessa forma a regionalização morfológica do embrião. Assim, por meio de sua posição ordenada nos cromossomos, uma propriedade fundamental dos genes Hox, é converter uma série de eventos transcricionais temporalmente ordenados em uma série de eventos morfológicos diretos e também ordenados (GODDARD et al., 1996).

Dessa forma, os genes Hox atuam “*esculpindo*” o corpo dos animais. Por exemplo, demonstrou-se que em *Drosophila* o gene Hox *deformed* (Dfd) ativa diretamente a apoptose pela ativação do gene *reaper* (Rpr). Essa morte celular localizada é essencial para manter o limite entre duas estruturas na cabeça do embrião da mosca: o lobo maxilar e o lobo mandibular. Se não houver apoptose em uma população celular localizada, não existe a delimitação desses lobos e o resultado é a fusão do lobo maxilar com o lobo mandibular (LOHMANN et al., 2002).

2.2 Genes HOXA1 e HOXB1 no desenvolvimento craniofacial

Os genes **HOXA1** e **HOXB1** são genes parálogos que se desenvolveram a partir de um único ancestral análogo ao gene **labial** da *Drosophila* (RUDDLE et al., 1994). Eles aparecem, respectivamente, nos cromossomos 6 26.28 cM e 11 56.08 cM nos camundongos e, 7p15.3 e 17q21.3 em humanos e ambos são expressos no rombencéfalo exclusivamente durante o período de formação do tubo neural (MURPHY; HILL, 1991). O gene HOXA1 (NC_000007 – Entrez Genome) tem 2.983 pares de bases (pb) no total, ocupa a posição localizada entre as bases 26.426.220 e 26.429.202 do cromossomo e possui dois exons. O gene HOXB1 (NC_000017 – Entrez Genome) tem 1.459 pares de bases (pb) no total, ocupa a posição localizada entre as bases 5.260.092 e 5.261.550 do cromossoma e também possui dois exons.

Esses dois genes mantiveram similaridades nas suas seqüências e na sua função, na segmentação e identidade do rombencéfalo em desenvolvimento, e também das estruturas correlatas (GAVALAS et al., 1998).

No início da embriogênese (período embriônico – até a 8ª semana), o disco embrionário é composto por duas camadas: a ectoderme e a endoderme. A terceira camada embrionária (mesoderme) surge no começo da terceira semana de gestação e é resultado da proliferação de células da ectoderme, e da diferenciação de células na região caudal do embrião. Neste momento, o disco embrionário passa a ser trilaminar. Essas três camadas germinativas primárias servem como base de diferenciação para diversos tecidos e órgãos (SPERBER; WALD, 2001).

Após a gastrulação, o embrião dos vertebrados é caracterizado por séries de tecidos segmentados. A ectoderme forma o tubo neural que é subdividido em 4

regiões: o prosencéfalo, o mesencéfalo, o rombencéfalo e a corda espinhal (LUMSDEN; KEYNES, 1989). A mesoderme, sulcada pela notocorda divide-se na direção crânio-caudal em somitômeros e somitos, e a endoderme, nessa mesma direção, divide-se em porção cefálica (segmentada nas bolsas faríngeais), porção central e porção terminal do tubo digestivo primitivo (SPERBER; WALD, 2001).

No começo do seu desenvolvimento o rombencéfalo é transitoriamente subdividido em seu eixo rostrocaudal em sete ou oito segmentos metaméricos chamados rombômeros (LUMSDEN; KEYNES, 1989). Os rombômeros funcionam como compartimentos que limitam o movimento celular, e dessa forma criam centros que são capazes de desenvolvimento e diversificação genética independentes que ocorrem por interações celulares e atividade genética localizada (FRASER; KEYNES; LUMSDEN, 1990).

A segmentação e diversificação dos rombômeros conferem periodicidade ao rombencéfalo. Por exemplo, os rombômeros r2, r4 e r6, contém os pontos de saída para os pares de nervos cranianos V, VII e IX; que por sua vez inervam o 1º, 2º, e 3º arcos branquiais (LUMSDEN; KEYNES, 1989).

Essa organização segmentada do rombencéfalo também influencia profundamente o desenvolvimento craniofacial, pois funciona como fonte padronizada de células da crista neural que vão povoar os arcos branquiais. A maioria das células da crista neural que migram para o 1º, 2º, e 3º, arcos branquiais, são discretas populações de células originárias do 2º, 4º, e 6º rombômeros respectivamente (LUMSDEN; SPRAWSON; GRAHAM, 1991).

Após sua migração para os arcos branquiais, as células da crista neural então servirão como padrão para os tecidos derivados desses arcos (LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975; GAVALAS et al., 1998).

Os rombômeros e as células destes originadas podem ser distinguidos uns dos outros pelo seu padrão de expressão genética. Esses produtos genéticos (por exemplo: RNA e proteínas), podem então ser usados como marcadores moleculares para se distinguir estruturas provenientes de rombômeros daquelas regiões da crista neural. Entre os genes expressos em rombômeros específicos estão fatores de transcrição como os genes Hox. Cada rombômero e cada população da crista neural é caracterizada por uma única combinação de expressão dos genes Hox (HUNT et al., 1991b; HUNT; WILKINSON; KRUMLAUF, 1991a).

Para entender a função desses genes durante a embriogênese da face é imperativo o conhecimento das conseqüências de suas alterações.

Em se tratando dos genes parálogos Hoxa-1 e Hoxb-1, os camundongos mutantes homozigotos para Hoxa-1, mostram maior perturbação na organização do rombencéfalo quando comparados a animais mutantes somente para Hoxb-1 (GODDARD et al., 1996). Por exemplo, o 5º rombômero aparece inteiramente (CARPENTER et al., 1993) ou parcialmente (MARK et al., 1993) desenvolvido nos animais mutantes para Hoxa-1. O 4º rombômero é também defeituoso, sendo menor que o normal e a população celular que deriva deste rombômero parece estar comprometida, visto que as estruturas derivadas do 2º arco branquial são hipoplásicas (CARPENTER et al., 1993). Por outro lado, embriões mutantes somente para Hoxb-1 não mostram defeitos na organização de rombômeros, e nem exibem defeitos nos tecidos derivados da crista neural. A alteração em Hoxb-1 parece afetar somente a identidade dos neurônios especificados no 4º rombômero (GODDARD et al., 1996).

As diferenças marcantes nos fenótipos de camundongos mutantes para Hoxa-1 e Hoxb-1 sugerem papéis separados para esses dois genes durante o

desenvolvimento do rombencéfalo, mas segundo Rossel e Capecchi (1999), os diferentes fenótipos resultantes dessas duas mutações podem ser entendidos em termos de funções similares. Em camundongos mutantes para ambos Hox (a1 e b1), ocorre exacerbação do fenótipo alterado. Dessa forma, embriões duplamente mutantes exibem não somente a perda do 5º rombômero, mas também a perda do 4º rombômero. Além disso, os tecidos do 2º arco branquial derivados da crista neural, não estão somente com o tamanho reduzido, mas também ausentes, assim como, o 2º arco branquial inteiro. A dramática extensão dos defeitos vista na organização do rombencéfalo, e na organização dos tecidos derivados dos tecidos da crista neural do 2º arco branquial, confirmam o propósito comum, e/ou uma sobreposição de funções entre esse dois genes parálogos (ROSSEL; CAPECCHI, 1999).

Ainda neste sentido, dois estudos mostram o que ocorre após perda de função dos genes Hoxa-1 e Hoxb-1 no desenvolvimento do rombencéfalo. Nesses estudos, os autores mostraram que há inabilidade de se manter e/ou especificar a maior porção do 4º rombômero em animais duplamente mutantes, e que a expressão do Hoxb-1 no 4º rombômero é parcialmente controlada pelo Hoxa-1, assim como que as expressões tanto de Hoxa-1 quanto de Hoxb-1 são controladas por retinóides. A formação das bolsas do 2º e 3º arcos branquiais e seus tecidos derivados, e a formação dos pulmões também é afetada nos animais duplamente mutantes (GAVALAS et al., 1998; STUDER et al., 1998).

A perda da organização do rombômero observada em animais mutantes para Hoxa-1, e exacerbada em mutantes duplos (Hoxa-1 e Hoxb-1), é consequência da combinação entre a perda de especificação inicial dos rombômeros, seguida pelo remodelamento por meio de apoptose das células do rombencéfalo, também sem

especificação. A partir deste ponto de vista, o papel inicial do Hoxa-1 e do Hoxb-1 durante o desenvolvimento do rombencéfalo é similar. Ambos servem para especificar a identidade do rombômero. Uma razão para as consequências mais extensas da perda do Hoxa-1 quando comparadas com a perda somente do Hoxb-1, é que o Hoxa-1 é também necessário para demarcar o limite da expressão do Hoxb-1. Como consequência, mutações no Hoxa-1 não somente eliminam a função desse gene, mas também influenciam regiões onde o Hoxb-1 é ativo, e nessas regiões o prejuízo é ainda maior (ROSSEL; CAPECCHI, 1999).

A perda da formação do segundo arco branquial e das bolsas derivadas desse arco vista em mutantes duplos para Hoxa-1/Hoxb-1 deve acontecer pela ausência do quarto rombômero (r4), de onde derivam células r4 da crista neural. A ausência de células r4 derivadas pode resultar em falha da produção do 2º arco branquial, dos tecidos derivados do segundo arco branquial e também dos tecidos derivados das bolsas dos 2º e 3º arcos braquiais. Este modelo de duplo mutante claramente exemplifica como uma falha na organização segmentada do rombencéfalo inicia uma cascata de desalinhamentos teciduais que afetam profundamente o desenvolvimento craniofacial (ROSSEL; CAPECCHI, 1999).

Em estudo realizado por Goddard et al. (1996) foram gerados camundongos com duas mutações diferentes no gene Hoxb-1. A primeira no *Homeodomínio* e a segunda inativando além do *Homeodomínio*, o primeiro exon. O fenótipo dos animais que apresentavam essas duas diferentes mutações e dos animais heterozigotos era indistinguível. Uma característica marcante a todos os camundongos que portavam a mutação era a paralisia dos músculos da face. Os animais apresentavam pouco ou nenhum movimento dos músculos da mímica e do nariz, não havia movimentos das pálpebras (fechamento) e nem dos olhos em resposta ao toque ou som. Esse

fenótipo mutante era evidenciado por uma face afilada que apresentava um comprometimento mais grave com a idade e por ptose do lábio inferior, resultando na exposição dos dentes incisivos centrais inferiores. Esses dentes inferiores também eram mais arredondados nos animais mutantes quando comparados com os controles, sugerindo que os animais mutantes apresentavam mastigação reduzida. Apesar dos animais com essas mutações serem viáveis, alguns morreram, principalmente na época do desmame e da transição para uma alimentação sólida sugerindo que sua capacidade de se alimentar era reduzida. Os autores verificaram que nos animais mutantes examinados, o núcleo motor do nervo facial não era detectável ou estava severamente reduzido. Os animais foram dissecados e comparados com os controles, e enquanto nos animais controles o padrão de desenvolvimento da porção motora do VII par de nervos cranianos (nervo facial) era normal, nos animais mutantes variava de animal para animal, apresentando sempre uma redução de 2 a 3 vezes em diâmetro, e aparentemente terminando prematuramente. Algumas ramificações estavam ausentes, incluindo o ramo que innervava o músculo orbicular da boca, os ramos marginal da mandíbula e bucal. Conseqüentemente, os músculos innervados por esses ramos apresentavam alterações. Nos animais mutantes, os músculos do complexo zigomático, o bucinador, o depressor do ângulo da boca e o digástrico estavam reduzidos em 2 vezes o seu tamanho. O músculo naso-labial não foi encontrado em um animal mutante. A massa muscular e o formato também estavam alterados nos músculos temporal e masseter, que por sua vez são innervados pelo V par de nervos cranianos (nervo trigêmeo). Isso ocorria como consequência indireta das tensões anormais dos outros músculos faciais. Segundo os autores, o fenótipo da mutação do gene *Hoxb-1* pode ser totalmente explicado com referência a um defeito na formação do VII par

de nervos cranianos e, portanto, a principal função terminal desse gene seria a especificação dos neurônios que formam o componente motor deste nervo. Nesse sentido, os autores afirmam que o fenótipo dos animais mutantes para Hoxb-1 é similar ao encontrado em pessoas portadoras da síndrome de Moebius ou de paralisia facial de Bell.

2.3 Síndrome de Moebius

O primeiro relato da síndrome de Moebius ocorreu em 1880, quando foi descrito um caso de paralisia óculo-facial congênita bilateral, não progressiva em uma criança incapaz de sorrir (VON GRAEFE, 1880), mas este quadro somente foi reconhecido como uma entidade clínica anos mais tarde, a partir da descrição de Moebius, relatando e agrupando de acordo com o nervo afetado, vários casos de paralisia facial múltipla congênita. Os casos de paralisia dos VI e VII pares de nervos cranianos foram então reconhecidos como síndrome de Moebius (MÖBIUS, 1888).

Esta síndrome faz parte de um grupo de síndromes caracterizado pela hipogênese oromandibular e de membros. As características clínicas das alterações desse grupo se sobrepõem e são marcadamente variáveis e, portanto, não é possível definir quantas entidades específicas fazem parte, e o quanto esse grupo é homogêneo ou heterogêneo (GORLIN; COHEN; LEFIN, 1990).

A síndrome de Moebius isoladamente corresponde a uma má formação que consiste na paralisia do VII par de nervos cranianos, e comumente associada à paralisia de outros pares de nervos cranianos, usualmente do VI, além de anomalias

músculo-esqueléticas (HENDERSON, 1939). Esta paralisia facial resulta em uma face classicamente descrita como face em máscara com um posicionamento centralizado das pupilas (FEDERMAN; STOOPACK, 1975). Além da diplegia facial e da paralisia do VII par de nervos cranianos, anormalidades das extremidades e do tronco também são achados essenciais (RICHARDS, 1953; BARAITSER, 1977). Entre as alterações faciais, pode-se encontrar micrognatia, microftalmia, hipoplasia auricular e fendas palatinas (ABRAMSON; COHEN; MULLIKEN, 1998).

A maioria dos pacientes não consegue abduzir os olhos para além da linha média. Estrabismo e ptose palpebral também podem estar presentes. Alguns pacientes não conseguem fechar os olhos, resultando em conjuntivite ou ulceração da córnea. A ponte nasal é usualmente alta e larga, sendo mais evidente durante a infância. Os pacientes também apresentam microstomia e rima bucal voltada para baixo, que em conjunto com a hipomobilidade do músculo orbicular da boca, favorece o escape de saliva. A língua pode ser hipoplásica uni ou bilateralmente e freqüentemente há micrognatia. Pouca mobilidade palatina, ineficiência de sucção e deglutição e problemas de fala, comumente estão presentes (REED; GRANT, 1957; VERZIJJL et al., 2003).

Os defeitos nos membros ocorrem em aproximadamente 50% dos casos. Deformidades nos pés correspondem a 30%, e os 20% restantes compreendem hipoplasia digital, sindactilia, polidactilia, ou deformidades mais graves. Clinodactilia, contraturas articulares e anomalias em costelas ocorrem menos freqüentemente. Algum grau de deficiência mental ocorre em aproximadamente 15% dos casos, e de 30% a 40% dos pacientes podem ter algum comportamento associado ao autismo (ABRAMSON; COHEN; MULLIKEN, 1998; GORLIN; COHEN; LEFIN, 1990; MILLER; STROMLAND, 1999; SUVARNA; BAGNAWAR; DESHMUKH, 2006). As anomalias

cardiovasculares e pulmonares são raramente associadas à síndrome (SUVARNA; BAGNAWAR; DESHMUKH, 2006). Alterações relacionadas à neuropatia e hipogonadismo também já foram descritas associadas à síndrome de Moebius (JENNINGS; COSTIGAN; REARDON, 2003; KAWAI et al., 1990).

A síndrome de Moebius pode ocorrer associada à síndrome de Poland, que consiste na simbraquidactilia unilateral e hipoplasia ipsilateral do músculo peitoral maior, sendo denominada de síndrome de Poland-Moebius quando em conjunto. Essas duas alterações já foram descritas em uma mesma família, na qual a mãe era portadora da síndrome de Poland e a criança nasceu com as características da síndrome de Moebius. Os autores sugerem que essas duas síndromes devem resultar de uma alteração no mesmo gene, mas não há discussão a esse respeito (ROJAS-MARTINEZ et al., 1991).

Em um estudo retrospectivo entre 1980 e 1994, Abramson, Cohen e Mulliken (1998) classificaram o fenótipo Moebius em cinco diferentes componentes anatômicos. Os autores propuseram um sistema de classificação chamado CLUFT (do inglês - C = cranial nerve, L = lower limb, U = upper limb, F = facial structure, e T = thorax) avaliando estruturas dos nervos cranianos, membros superiores e inferiores, face e tórax. Cada estrutura ou déficit funcional teve seu envolvimento graduado numa escala de 0 a 3. Para designar envolvimento bilateral de pares cranianos adotou-se a letra B após o grau de acometimento. A função dos nervos cranianos foi avaliada em uma escala começando pela paralisia do VII par progredindo até o acometimento de múltiplos pares de nervos cranianos. As anomalias dos membros foram graduadas desde anomalias de diferenciação até defeitos transversos. As deformidades faciais foram graduadas como menores (como fenda palatina) e maiores (como hipoplasia da mandíbula, olho ou ouvido). Os

defeitos no tronco foram graduados como deformidades menores progredindo até hipoplasia e aplasia de estruturas. Analisando os dados em conjunto, os autores não observaram correlação entre a extensão dos danos nos nervos cranianos e as alterações nos membros. A anomalia de tronco mais comumente observada foi a escoliose e a hipoplasia dos músculos peitorais, desenvolvimento mamário anormal e deficiência no ombro com a escápula ausente também foram comumente encontrados, confirmando uma possível sobreposição entre a síndrome de Moebius e a síndrome de Poland.

A causa primária da paralisia facial da síndrome de Moebius é bastante discutida na literatura desde sua primeira descrição e provavelmente é heterogênea (GORLIN; COHEN; LEFIN, 1990). Os argumentos têm sido centrados em torno de questionamentos se essa desordem seria primariamente degenerativa ou displásica, e também na localização exata da patologia, se nas células indiferenciadas do cérebro, nos nervos periféricos, no sistema vascular ou nos músculos da face. Além disso, a sobreposição de condições também vista em outras síndromes, como a síndrome de Poland, sugere uma origem comum para diferentes condições (PARKER; MITCHELL; HOLMES, 1981).

Uma hipótese discutida na literatura refere-se ao hipodesenvolvimento do sistema vascular durante a embriogênese, afetando a vasculogênese (diferenciação *in situ* das células endoteliais) e/ou angiogênese (desenvolvimento de novos capilares a partir dos preexistentes). Esses mecanismos vasculares incluem hemorragia, estenose ou trombose prejudicando o desenvolvimento dos vasos nos arcos branquiais. Segundo essa teoria, a síndrome de Moebius resulta de uma diminuição do suprimento sangüíneo do embrião, estando a extensão e a natureza do defeito relacionados à localização específica da insuficiência vascular. Desse

modo, a diminuição do fluxo sanguíneo no desenvolvimento poderia resultar na hipoplasia dos olhos, ouvidos e maxilares, e a ruptura concomitante da artéria subclávia seria responsável pelos defeitos nos membros observados na síndrome de Poland (BAVINCK; WEAVER, 1986). Esses mesmos autores propuseram que as outras alterações (como as vistas na síndrome de Poland) resultam de alterações vasculares em um momento mais precoce da embriogênese.

Estudos pós-mortem de pacientes portadores da síndrome de Moebius relatam agenesia ou necrose do núcleo cerebral primitivo; ausência ou hipoplasia de vários troncos de nervos cranianos e hipoplasia e ausência de músculos faciais (PITNER; EDWARDS; MCCORMICK, 1965; RAINY; FOWLER, 1903; STABILE et al., 1984; THAKKAR et al., 1977). Eletromiografias e biópsias indicam uma deficiência neural (VAN ALLEN; BLODI, 1960). Towfighi et al. (1979) ao estudar 15 pacientes propôs que o defeito responsável pela hipomobilidade dos músculos inervados pelos VI e VII pares de nervos cranianos, pode estar localizado em quatro níveis diferentes: Grupo I: defeito presente no núcleo dos nervos cranianos, relacionado com malformação congênita dos rombômeros; Grupo II: perda e degeneração neuronal secundária a um defeito periférico do nervo facial; Grupo III: diminuição do número de neurônios, devido à infecções ou insuficiência vascular; Grupo IV: miopatias sem alteração do componente nervoso. Outros estudos, utilizando-se de exames iconológicos revelaram, alterações nos núcleos motores componentes dos VI, VII e XII pares cranianos em pacientes com síndrome de Moebius (PEDRAZA et al., 2000; SANO et al., 2005; VERZIJL et al., 2005a). Testes neurofisiológicos, resultaram em duas prováveis patofisiologias diferentes para as alterações dos nervos cranianos em pacientes portadores da síndrome de Moebius, uma relacionada com uma alteração no sistema nervoso central e outra nos nervos

periféricos (CATTANEO et al., 2006). Estes dados conflitam com estudo pregresso de Verzijl, Padberg e Zwarts (2005).

Fetos de camundongos desenvolveram lesões no cérebro primitivo e nos membros similares às lesões vistas na síndrome de Moebius após a indução de hemorragia fetal por vários meios que causavam constrição uterina e espasmo arterial durante a gestação (obstrução do fluxo uterino arterial, manuseamento do útero e dos vasos, trauma abdominal, e hipertermia) (LIPSON et al., 1989). Quando casos de síndrome de Moebius foram analisados retrospectivamente, alguns desses eventos traumáticos pré-natais também foram relatados pelas mães durante o período de gestação, fazendo com que alguns autores concluam que a síndrome de Moebius possa ser causada por uma isquemia transitória ou hipóxia do embrião levando a lesões em locais específicos (GRAHAM et al., 1988; LIPSON et al., 1989; WEBSTER; LIPSON; BROWN-WOODMAN, 1987). Contudo, apesar dos animais terem desenvolvido as mesmas características o estudo supracitado (LIPSON et al., 1989) foi contestado na literatura tendo em vista que os casos analisados não foram considerados aleatórios e não foi usado um grupo controle representativo. Além disso, os eventos considerados como interferentes na circulação uterina/fetal não são mensuráveis e, portanto não podem ser considerados os mesmos que ocorrem em mulheres gestantes e por fim, a detecção e medição da isquemia uroplacentária ou fetal não é simples e muitos dos eventos usados pelos autores podem não ter causado isquemia ou hipóxia nessas regiões (ALDERMAN; MUELLER; MOORE, 1991).

A ação de teratógenos foi também associada à síndrome de Moebius. Em um estudo multicêntrico realizado no Brasil, foi constatado que os pacientes portadores dessa síndrome tinham sido expostos ao misoprostol com maior frequência (9%) que

os controles (3%). O misoprostol é um análogo da prostaglandina E1 e tem efeito abortivo quando utilizado no primeiro trimestre da gestação. Os autores afirmam que este agente teratogênico pode causar lesões no sistema vascular do feto e dessa forma, também sugerem como etiologia da síndrome, uma isquemia ou hipóxia do feto (PASTUSZAK et al., 1998).

Gonzalez et al. (1998) realizaram estudo de 42 crianças apresentando malformações congênitas. Todas as crianças foram expostas ao misoprostol entre o primeiro e o terceiro mês de gestação, e apresentaram algum tipo de malformação relacionadas com aquelas encontradas nos pacientes com síndrome de Moebius. Dentre essas crianças, 21 (50%) apresentaram ao menos o VI ou VII pares de nervos cranianos afetados. As doses do medicamento utilizadas na tentativa de aborto variam de 1 a 28 comprimidos, e algumas mães também utilizaram administração parenteral. Outros estudos também correlacionam o uso do misoprostol com malformações congênitas, associadas ou não a síndrome de Moebius (GENEST et al., 1999).

Histórias de trauma, principalmente no primeiro mês gestacional, foram descritas como possível causa, entre elas estão acidentes de carro (TRABOULSI; MAUMENEE, 1986); choque elétrico e cirurgia (LIPSON et al., 1989). O uso de álcool e de cocaína durante a gestação também já foram descritos (LIPSON et al., 1989).

A síndrome de Moebius é usualmente esporádica, mas a literatura mostra casos de famílias apresentando herança autossômica dominante (BARAITSER, 1977, SUGARMAN; STARK, 1973; DOTTI et al., 1989). Familiares que apresentavam translocação entre o braço curto do cromossomo 1 e o braço longo do

cromossomo 13 ao exame do cariótipo, já foram descritos (ZITER; WISER; ROBINSON, 1977).

Ainda nesse sentido, alterações genéticas foram responsabilizadas pela sobreposição de alterações entre as síndromes de Poland e Moebius. A ação de um gene em caráter dominante, provavelmente autossômico foi sugerida, e sua ação supostamente pode funcionar como única causa ou como causa predisponente para uma alteração vascular (ROJAS-MARTINEZ et al., 1991). No entanto, MacDermot et al. (1991) relatam o baixo índice de recorrência familiar da síndrome. Os autores sugerem que o termo síndrome deve ser reservado ao comprometimento congênito do sexto e sétimo pares de nervos cranianos com malformação esquelética, e sugerem também um índice baseado nas malformações, que pode determinar o risco de recorrência familiar da síndrome.

Em um estudo realizado em uma família holandesa que apresentava 22 indivíduos afetados, foi mapeada uma alteração no cromossomo 3 (KREMER et al., 1996). Outros estudos genéticos mostram defeitos nos cromossomos 1, 2, 10, 11, 13, 17 e 22 (DONAHUE et al., 1993; NISHIKAWA et al., 1997; SLEE; SMART; VILJOEN, 1991; VERZIJL et al., 1999; ZITER; WISER; ROBINSON, 1977). Outras síndromes semelhantes à síndrome de Moebius foram relatadas recentemente. A disgenisia facial, foi relacionada deleção no gene TWIST, de localização 7p15.1-21.1 (HOOVER-FONG et al., 2003). Outros genes foram investigados quanto à síndrome de Moebius, entre eles o gene SOX14, PGT e GATA2, EGR2 e PLEXIN-D1, porém a possibilidade destes genes terem participação na etiologia da síndrome foi descartada (HARGRAVE et al., 2000; VAN DER ZWAAG et al., 2002; VAN DER ZWAAG et al., 2004). A síndrome de Bosley-Salih-Alorainy (BSAS), foi descrita como um conjunto de alterações do gene HOXA1, de herança autossômica recessiva, que

determina malformações, principalmente, no sistema nervoso central (TISCHFIELD et al., 2005). Ambas as síndromes se relacionam com as alterações encontradas na síndrome de Moebius.

De acordo com o supracitado, torna-se claro que a etiologia da síndrome de Moebius ainda permanece desconhecida e que existem diversos pontos a serem explorados.

3 PROPOSIÇÃO

Tendo em vista o acima exposto, propusemo-nos a investigar possíveis mutações nos genes HOXA1 e HOXB1 em pacientes portadores da síndrome de Moebius, comparando esse resultado posteriormente com as características fenotípicas e com a história pregressa dos pacientes.

4 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos pacientes

Foram utilizados no projeto 30 pacientes, atualmente em tratamento, e previamente diagnosticados como portadores da síndrome de Moebius, atendidos no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais – CAPE, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. O CAPE é um centro de referência nacional no tratamento de pacientes com necessidades especiais e realiza tratamento odontológico de pacientes portadores dessa síndrome. Os pacientes foram cuidadosamente esclarecidos sobre o projeto, tornando-se constituintes do projeto somente quando de acordo com as explicações, e após terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CONEP (Anexo - A).

Todos os pacientes foram submetidos à cuidadosa anamnese e os dados referentes ao gênero, uso de medicamentos ou drogas durante a gestação, o relato de qualquer outro tipo de intercorrência nesse período e a presença de qualquer tipo de síndrome ou malformação na família (até 3º grau de parentesco) foram armazenados para posterior consulta.

4.2 Exame Clínico

Os parâmetros avaliados ao exame clínico dos pacientes foram os mesmos levantados por Abramson, Cohen e Mulliken (1998), estabelecendo assim o sistema CLUFT de avaliação o qual encontra-se explicitado na Quadro 4.1.

Estruturas	Graduação
C (nervos cranianos)	
VII envolvimento parcial	0
VI e VII envolvimento parcial	1
VI e VII envolvimento completo	2
Outro nervo envolvido	3
Envolvimento bilateral	B
L (Extremidades inferiores)	
Normal	0
<i>Talipes equinovarus</i> , sindactilia e anquilose	1
Falanges ausentes	2
Defeitos transversos ou longitudinais	3
U (Extremidades superiores)	
Normal	0
Hipoplasia digital ou falha na diferenciação	1
Ectrodactilia	2
Falha na formação, longitudinal ou transversa	3
F (Anomalia de estruturas faciais)	
Normal	0
Fissura palatina	1
Micrognatia	2
Microtia, microftalmia, articulação anormal e outras	3
T (Tórax)	
Normal	0
Escoliose	1
Hipoplasia do peitoral	2
Deformidade na parede do peito, mama ou aplasia do peitoral	3

Quadro 4.1 - Sistema de graduação clínica CLUFT

O sistema CLUFT de avaliação gradua as 5 características anatômicas possivelmente alteradas no fenótipo moebius: Nervos cranianos, membros inferiores, membros superiores, estruturas faciais e tórax, respectivamente.

Para padronizar a avaliação clínica pelo sistema CLUFT, foi desenvolvida ficha específica (explicitada no Apêndice - B). O método de avaliação consiste em testar as funções motoras e sensitivas de todos os nervos cranianos. Os movimentos foram estimulados em cada região pelo toque, de forma verbal ou pela incidência de luz (olhos) e as respostas anotadas segundo observação direta e relato do paciente ou dos cuidadores. Nos casos de pacientes de pouca idade, ou com comprometimento neurológico que impedissem a comunicação verbal, os dados foram anotados conforme apenas o observado, ou conforme o relato dos cuidadores.

Cada um desses 5 parâmetros recebeu uma pontuação variando de 0 a 3, segundo o que consta na tabela CLUFT, de acordo com o número de estruturas comprometidas ou pelo grau de envolvimento e dessa forma, os pacientes puderam ser classificados (ex; CLUFT 1B2021 para o paciente que apresenta paralisia parcial bilateral do VII par de nervos cranianos, sindactilia, extremidades superiores normais, micrognatia e escoliose).

A função dos nervos cranianos foi avaliada em uma escala começando pela paralisia somente do VII par progredindo até o envolvimento de múltiplos pares de nervos cranianos. A avaliação dos pares cranianos também foi feita de forma independente para os terços superior, médio e inferior da face. A avaliação dos membros e tórax foi feita através de observação ocular direta e os resultados foram anotados na mesma ficha. As anomalias em membros tanto inferiores quanto superiores foram graduadas desde anomalias menores de diferenciação até defeitos bilaterais e transversos. As deformidades faciais foram graduadas desde alterações menores como fenda palatina até as alterações mais expressivas como hipoplasia da mandíbula, olho ou ouvido e por fim, os defeitos no tronco foram graduados como

deformidades menores (como por exemplo escoliose) progredindo até hipoplasia e aplasia de estruturas (como hipoplasia do músculo peitoral ou da clavícula).

O uso dessa classificação visa registrar as anomalias de acordo com a localização e severidade; possibilitando a comparação entre os pacientes e o estudo sistemático do espectro da desordem de acordo com os parâmetros propostos.

O critério para inclusão do paciente no grupo amostral foi a presença da síndrome de Moebius não importando a severidade do acometimento e o histórico de indício de envolvimento ambiental. O paciente deveria apresentar ao menos o sexto ou sétimo par de nervos cranianos afetados.

Dos 30 pacientes foi coletado amostras de esfregaco da mucosa bucal, para obtenção do DNA genômico. O DNA de 15 parentes de primeiro grau nao portadores da síndrome de moebius e o DNA de 15 indivíduos não portadores de síndrome e não aparentados com os pacientes, foi coletado da mesma forma. Todos são doadores voluntários. Esses indivíduos também foram submetidos à cuidadosa anamnese. No ultimo grupo (nao parentes e nao portadores) o levantamento da história pregressa de alterações genéticas familiares foi realizado, e caso presentes, ocasionavam a exclusão do indivíduo desse grupo. Todos os controles negativos também foram amplamente esclarecidos sobre os detalhes do projeto e somente constituíram parte da amostra após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice - A). Controles de origem etnica oriental foram excluídos, pois nenhum paciente aparentemente possuía um componente genético oriental.

4.3 Extração do DNA

Para tanto, no Laboratório de Patologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), utilizando o Kit “Puregene DNA isolation” (Gentra), foi extraído DNA genômico a partir de raspados bucais dos pacientes e dos controles negativos. Brevemente, a partir de cada indivíduo foi feito esfregaço da mucosa bucal utilizando-se escovas próprias para este uso. Em cada indivíduo foram usados 5 escovas que após o esfregaço eram colocadas em eppendorf contendo a solução de lise. Posteriormente adicionava-se 3µl de proteinase K e o material foi então incubado overnight à 55°C. No dia seguinte, foi acrescentado a esta solução 3 ul de solução inibidora de RNase para aumentar a produtividade de DNA extraído. A solução foi homogenizada e posteriormente a fração protéica foi precipitada através da adição de 200 ul de solução precipitadora em banho de gelo por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600ul de isopropanol a 100%. A esta solução adicionou-se 1ul de glicogênio e as amostras foram misturadas por inversão 50 vezes e posteriormente centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 600ul de etanol 70%. Nova centrifugação procedeu-se, mas somente por 1 minuto a 13000 rpm. Ao precipitado então, foram adicionados 50ul de solução de hidratação. As amostras foram incubadas overnight em temperatura ambiente. A quantificação do DNA obtido foi realizada por leitura em espectrofotômetro, e calculada seguindo a fórmula:

$$\text{DNA} = \frac{\text{OD.40.diluição}}{1000}$$

O DNA genômico obtido foi então armazenado em freezer a -70° C até o momento de sua utilização para reação de amplificação dos genes em estudo.

4.4 Amplificação do DNA pela técnica do PCR

A amplificação dos genes HOXA1 e B1 foi obtida pela técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) dos genes a serem estudados sendo as seqüências dos “primers” utilizadas de acordo com Ingram et al., 2000.

Hoxa-1 – sense GCAAGAATGAACTCCTTCCTG

Antisense ACCAACCAGCAGGACTGACCT

Hoxb-1 – sense GCATGGACTATAATAGGATG

Antisense TCTTGGGTGGGTTTCTCTTA

Gene Hoxa-1 - O primer sense localiza-se entre as bases 26.426.293 e 26.426.313 (NT_007819) do cromossomo 7 e entre as bases 73 e 93 do gene e o primer antisense localiza-se entre as bases 26.426.933 e 26.426.954 do cromossoma e entre as bases 713 a 734 do gene (Figura 4.1).

Gene Hoxb-1 - O primer sense localiza-se entre as bases 5.260.092 e 5.260.125 (NT_010783) do cromossomo 17 e entre as bases 5 e 23 do gene e o primer antisense localiza-se entre as bases 5.260.652 e 5.260.672 do cromossomo e entre as bases 561 a 581 do gene (Figura 4.1).

GENE HOXA1 **GENE HOXB1**

Figura 4.1 - Esquema mostrando a localização dos primers (barra verde primer sense e barra roxa primer antinsense) para amplificação dos genes HOXA1 e HOXB1, em relação aos exons e introns. A barra azul mostra o produto da amplificação e seu tamanho e a barra preta indica o tamanho do gene

A amplificação do ***HOXA1*** consistiu de início à 94° C por 3 min, 40 ciclos de: 94° C 40s, 64° C 45s, 72° C 1 min e extensão de 72° C 5 min, produzindo um fragmento de 661 bp. A amplificação do ***HOXB1*** consistiu da mesma ciclagem sendo a temperatura da annealing 58° C e produzindo um fragmento de 576bp.

Parte do produto de ambas amplificações foi corrido em gel de agarose 2% com brometo de etídeo para visualização das bandas contendo o DNA amplificado, e a outra parte do produto armazenada em freezer -20° C até o momento do seqüenciamento.

4.5 Purificação e seqüenciamento do produto da amplificação

Os produtos obtidos pela técnica da PCR foram purificados para seqüenciamento. Em um eppendorf foram adicionados a cada 5uL de amostra, 2uL da mistura de enzimas para purificação ExoSAP-IT (amersham). Este tubo foi acondicionado no termociclador e permanecendo por 1 hora a 37°C, 20 minutos a 80°C e em seguida ficou a 4°C até ser retirado. O resultado da purificação, assim como a concentração de final de ámplicons, foi verificado em gel de agarose, relacionando-se com as bandas do marcador de peso molecular.

O seqüenciamento dos amplicons foi realizado utilizando-se o equipamento MegaBACE 1000®, que é um sistema de análise de DNA com tecnologia de eletroforese capilar (Amersham Biosciences®). As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000®, utilizando-se o

APBiotect DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit[®] (com Thermo Sequenase[™] II DNA Polimerase).

Em um tubo eppendorf de 500ul foram adicionados os seguintes reagentes:

DYEnamic ET Terminator reagent premix -- 8μL
Primer (Hoxa-1 ou Hoxb-1) (5uM) -- 1μL
Produto de PCR (20ng/μL) -- 4μL
H2O ultrapura -- 7μL
Total = 20μL

As reações foram feitas no sentido 5´- 3´ e no sentido 3´- 5´.

O tubo contendo todos esses reagentes passou por um termociclador com os seguintes parâmetros de ciclagem:

95°C - 20 seg\
50°C - 15 seg |--->30 ciclos
60°C - 1 min /

Em seguida, a purificação pós-reação foi feita por precipitação com Acetato de Amônio e Etanol adicionando-se aos tubos da reação os seguintes reagentes:

2μL de Acetato de Amônio 7.5M 2,5 volumes de Etanol 100% (55μL) para uma concentração final de 70% de etanol.

Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos (ao abrigo da luz) e depois centrifugados à temperatura ambiente em microcentrífuga por 15 minutos em rotação máxima (aproximadamente 12-13.000 rpm). Removeu-se o sobrenadante por aspiração cuidadosa, lavando-se o pellet com 150μL de Etanol 70%. Nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente foi então realizada. Novamente o sobrenadante foi removido por aspiração e descartado e o pellet secado ao ar (ao abrigo da luz). Depois de seco, o pellet foi ressuspenso em 10μL de Loading Solution, vortexeado e mantido a 4°C.

Colocado o material no seqüenciador automático, as seqüências foram obtidas pelo software Sequence Analyser[®] utilizando o Base Caller Cimarron 3.12[®].

4.6 Análise genética

O arquivo contendo o eletroferograma (arquivo eletrônico com extensão .abd) foi analisado pelo software Lasergene[®] (DNASTAR INC) que é um software completo e específico para análise das seqüências. As seqüências de amplicons dos pacientes e controles negativos foram comparadas com as seqüências dos genes HOXA1 e HOXB1 selvagens cadastradas no geneBank - PubMed. A análise visou à busca por mutações como: trocas simples de nucleotídeos (Single Nucleotides Polymorphisms - SNP), inserções, translocações etc, já conhecidas e cadastradas na base de dados Pubmed, e novas alterações genéticas que até então fossem desconhecidas.

Obtidos os dados genéticos dos indivíduos testados procedeu-se a análise estatística, optando-se pelo teste exato de Fisher, feito através do software STATA 8.2[®]. (Intercooled Stata 8.2[®] for Windows[®], StataCorp LP, 2005; College Station TX – USA) correlacionando as alterações genéticas encontradas, o fenótipo dos pacientes, os eventos durante a gestação, e o uso do misoprostol.

5 RESULTADOS

5.1 Análise clínica

Todos os pacientes foram avaliados pelo método CLUFT descrito por Abramson, Cohen e Mulliken (1998), e também em relação à presença de intercorrências gestacionais, antecedentes genéticos e uso de medicamentos durante a gestação. Esses resultados encontram-se explicitados nas Tabela 5.1 e Quadro 5.1.

Desses, 14 (47%) eram do sexo feminino e 16 (53%) pacientes do sexo masculino, 12 estiveram expostos ao misoprostol durante a gestação, sendo seis no primeiro mês de gestação; 11 usaram algum medicamento que não o misoprostol, nove não relatam uso de nenhuma substância; 18 pacientes apresentaram algum tipo de intercorrência gestacional e 16 pacientes apresentam malformações ou outras síndromes na família.

Dos pacientes que relataram intercorrência gestacional, foram excluídos aqueles que afirmavam apenas estresse ou que afirmavam algum problema, mas que não souberam especificar qual. Esses últimos foram classificados como intercorrências não qualificadas. Dos pacientes que apresentaram algum tipo de intercorrência gestacional, quatro estiveram sob risco de aborto segundo informações dos cuidadores.

Tabela 5.1 - Classificação dos pacientes portadores da síndrome de Moebius segundo o sistema CLUFT

	C	L	U	F	T
1	1B	0	0	2	0
2	1B	3	3	2	2
3	2	3	0	1	0
4	3B	3	0	2	0
5	3	3	3	2	1
6	0	0	0	2	0
7	3B	3	3	2	0
8	3	1	0	0	0
9	3B	3	0	2	3
10	2B	0	3	2	3
11	0	3	0	2	1
12	3	0	1	2	1
13*	3B	3	0	3	3
14	1B	1	0	2	0
15	3B	0	1	2	0
16	3B	1	0	2	0
17	0	1	0	2	1
18	3	0	0	2	0
19	1	0	0	2	0
20	0	0	0	2	0
21	3B	0	0	2	1
22	1	0	3	2	0
23	3B	3	0	2	3
24	-	-	-	-	-
25	2B	3	2	2	0
26	3B	3	1	2	1
27	3B	0	0	2	0
28	2B	3	0	2	0
29	0	0	0	2	0
30[§]	2B	3	0	2	0

* Paciente neurológico

[§] Paciente com menos de 3 meses de vida ao exame

- Paciente não avaliado até o presente momento

	Intercorrência	Medicamentos (comprimidos)	Período gestacional
1	-	misoprostol (4)	3º
2	Hemorragia	antialérgico+antihermorrágico	3º
3	hemorragia+pneumonia	Antibiótico	3º
4	Piodermite	misoprol+penicilina	2º/3º
5	susto+eritema disseminado	-	4º/5º
6	acidente automobilístico (fratura de clavícula)	Analgésicos	1º
7	intercorrência não qualificada	-	-
8	Rubéola	-	4º(data do exame)
9	-	misoprostol (4)	1º
10	Gastrite	Ranitidina	2º
11	não houve movimentação do feto	Misoprostol	1º
12	Hipertensão	misoprostol (2)+anticoncepcional+antihipertensivo	1º/3º
13	-	misoprostol (8)	1º(4)/2º(4)
14	sangramentos recorrentes e tombo(fim da gestação)	misoprostol (2)+antibiótico+voltaren+laxante+analgésico	2º
15	Queda	Misoprostol	1º
16	Estresse	-	-
17	Estresse	-	-
18	gastrite+gripe+infecção urinária+ameaça de aborto(4º mês)	antibiótico+antialérgico+protetor gástrico+antiabortivos	1º/4º
19	-	misoprostol (4)	2º
20	Estresse	misoprostol (2)	2º
21	-	-	-
22	Queda+parto pre-maturo	-	5º
23	-	Analgésico	2º
24	intercorrência não qualificada	-	2º
25	cachumba+sangramento	-	2º/3º
26	corrimento vaginal durante toda gestação	misoprostol (2)	1º
27	sangramento (7ºmês)/feto em posição caudal	Neosaldina	1º/7º
28	Hipertensão	aldomet (4/dia)+ponstan(a cada 12 horas)+voltaren	1º ao 9º
29	Estresse	misoprostol (2)	1º
30	infecção urinária+sangramento	antibiótico+antialérgico	2º/5º

Quadro 5.1 - Classificação dos pacientes segundo intercorrências gestacionais e o uso de medicamentos

Vinte e nove pacientes puderam ser avaliados quanto ao acometimento dos pares cranianos. Durante a pesquisa um dos pacientes sob tratamento ortodôntico finalizou seu tratamento, não retornando até o fim desta pesquisa. Este paciente não pode ser avaliado clinicamente.

Todos pacientes avaliados apresentaram hipomobilidade da musculatura do terço superior da face, sendo que em 27 casos a paralisia apresentava-se bilateral e em dois unilateral. Constatou-se que a hipomobilidade da musculatura facial é maior no terço superior da face, diminuindo em direção ao terço inferior. No terço médio, 28 pacientes apresentaram hipomobilidade da musculatura facial, sendo que 17 apresentaram acometimento bilateral e um paciente era parcialmente acometido (apresentava alguma mobilidade mesmo no setor afetado). No terço inferior da face, 26 pacientes apresentaram hipomobilidade, sendo em 16, de forma bilateral.

A avaliação do acometimento dos nervos cranianos esta sintetizada na Quadro 5.2.

	VII			VI	V	XII	Outros pares cranianos
	S	M	I				
1	B	U	U	s	n	N	n
2	B	B	U	s	n	N	-
3	B	B	U	s	n	S	n
4	B	B	B	s	n	S	n
5	B	B	U	s	n	S	n
6	U	U	U	n	n	N	n
7	B	U	B	s	n	S	n
8	B	B	B	s	n	S	n
9	B	B	B	s	n	S	n
10	B	B	N	s	n	N	n
11	B	U	U	n	n	N	n
12	B	B	B	s	n	S	n
13*	B	B	B	s	n	S	s(III)
14	B	B	U	s	n	N	n
15	B	B	B	s	n	S	n
16	B	B	B	s	n	S	n
17	B	U	B	n	n	S	n
18	B	U	B	s**	n	S	n
19	U	U	U	s	n	N	n
20	B	U	U	n	n	S	n
21	B	B	B	s	n	N	s*** (III)
22	B	N	N	s	n	N	n
23	B	B	B	s	n	S	n
24†							
25	B	B	B	s	n	N	**** (II)
26	Bp	Bp	N	s	n	S	n
27	B	B	B	s	n	N	n
28	B	B	B	s	n	N	n
29	B	U	U	n	n	N	n
30§	B	B	B	s	n	N	n

Quadro 5.2 - Classificação dos pacientes portadores da síndrome de Moebius segundo os nervos cranianos afetados e segundo a porção da face afetada (Superior – S; Média – M e Inferior – I)

*paciente neurológico

**unilateral

***grave miopia

p: parcial (há movimentos bilaterais em alguns segmentos)

**** apresenta distúrbios de visão porém não há avaliação quanto acometimento de nervo craniano

§ Paciente com menos de 3 meses de vida ao exame

† paciente não retornou para avaliação clínica

Três pacientes (6, 20 e 29) apresentaram o menor grau de acometimento (CLUFT 00020). Pode-se observar nestes a mobilidade dos músculos da mímica no terço médio e inferior da face e um deles ainda apresentou mobilidade unilateral do terço superior. Além disso, eles apresentavam mobilidade ocular satisfatória (VI par craniano), e, apesar da atrofia lingual, sua mobilidade era efetiva (movimentos extrínsecos e intrínsecos). Esses pacientes não apresentaram nenhuma outra malformação dos membros ou tórax embora todos apresentassem micrognatia.

O paciente com acometimento mais severo (paciente 13 com CLUFT 3B3033), apresentava também comprometimento neurológico. O paciente apresentou hidrocefalia ao nascimento, não apresentava nenhuma mobilidade dos músculos da mímica, apresentava estrabismo convergente, atrofia e comprometimento total do movimento lingual. Além disso, era incapaz de equilibrar-se e possivelmente apresenta acometimento outras estruturas que não foram avaliadas, sendo necessárias investigações mais profundas. Esse paciente também apresentou *Talipes equinovarus* e déficits longitudinais de formação dos membros inferiores, clinodactilia em um dedo da mão, microftalmia e micrognatia. No tórax detectou-se hipoplasia peitoral e deformidade da caixa torácica.

As características clínicas da face e membros dos pacientes com síndrome de Moebius, em repouso e em função encontram-se representadas nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3.

Figura 5.1 - Aspectos faciais dos pacientes com síndrome de Moebius

- A - Terço médio da face com lábios entreabertos, rima labial vertida para baixo e sela nasal plana
- A' - Fendas epicantais e fechamento incompleto das pápebras
- B - Aspectos gerais da face de um paciente com síndrome de moebius

Figura 5.2 - Anomalias dos membros superior e inferior encontradas nos com síndrome de Moebius

- A - Presença de ectrodactilia, braquidactilia e clinodactilia
- B - Defeito longitudinal (encurtamento) de membro inferior
- C - Comparação de ambas as mãos de um paciente, observando-se a mão direita acometida, enquanto que a mão esquerda apresenta-se normal

Figura 5.3 - Aspectos da palatofaringe e da língua de um paciente com síndrome de Moebius

- A - Contração da musculatura do palato mole e farínge durante estímulo fonético
- B - Musculatura do palato mole em repouso, com abaixamento da úvula, observar também o dismorfismo lingual do paciente

Somente três pacientes não possuem história de intercorrências gestacionais (o estresse não foi considerado intercorrência na análise dos resultados) e nem uso de misoprostol durante a gestação e todos eles apresentaram acometimento de mais de um par craniano além do sexto e sétimo pares. Dos 12 pacientes que estiveram expostos ao misoprostol durante a gestação, 50% (seis casos) ocorreram no primeiro mês de gestação. Cinco destes pacientes apresentaram alterações em outro nervo craniano além dos VI e VII pares, sendo que em quatro desses pacientes a hipomobilidade da musculatura facial era bilateral completa. Nos demais, as alterações envolviam o VI e VII pares de forma incompleta ou apenas o sétimo par craniano também forma incompleta.

Dois dos pacientes com menor grau de acometimento estão associados ao uso de misoprostol durante a gestação (um ao primeiro mês e o outro ao segundo mês). Quanto ao paciente mais acometido, a mãe relata uso do misoprostol no 1º e 2º mês de gestação.

Dos 16 pacientes que apresentam malformações ou história de síndromes na família, três relatavam parentes com características semelhantes à síndrome de Moebius. Um deles tem irmão com *Talipes equinovarus* (paciente 11), o outro (paciente 9) apresenta tio portador de paralisia facial (hipomobilidade facial e estrabismo) e o último (paciente 28) possui prima de 2º grau aparentemente também portadora da síndrome. É importante salientar que em diversos pacientes foi encontrada história de malformações ou síndromes em outros indivíduos da família. Essas alterações encontram-se explicitadas no Quadro 5.3.

A análise estatística mostrou que a presença ou não de intercorrências gestacionais, ou o uso de misoprostol durante a gravidez não esta relacionada ao

acometimento dos nervos cranianos ou a presença de malformações dos membros inferiores, face e tórax. Como excessão, o estudo revelou ser relevante a presença de alterações brandas nos membros inferiores (hipoplasia digital ou falha na diferenciação) e o fato de 100% das mães destes pacientes terem usado misoprostol durante a gravidez. Por outro lado, alterações mais severas dos membros superiores (falha na formação do membro) estão relacionadas em 80% dos casos as mães que não fizeram uso de misoprostol e nem tiveram intercorrências durante a gestação (p-valor $p=0,02$) (Tabela Ap.D1, contida no Apêndice D).

Paciente	Grau de parentesco	Tipo de Alteração Reportada
2	Primo 1º grau	S. Cornélia de Lange
4	Tio 1º grau/Prima 3º grau	S. Down / Cegueira congênita
6	Primo 1º grau	S. Down
7	Primo 1º grau	S. Down
8	Tio 1º grau/Tio 3º grau/Primo 3º grau	S.Down / S.Down / Neurofibromatose
9	Tio 1º grau	Ausência de úvula, hipomobilidade de lábio superior e face, e estrabismo(semelhança a S.Moebius)
11	Irmão	<i>Talipes equinovarus</i>
12	Prima 2º grau	Paralisia motora/ OBS:outros parentes apresentam deficiência visual não esclarecida
14	Tio 2º/Primo 3º(gêmeo)	S. de Ondine Diferença de tamanho em membro inferior
15	Primo 1º grau	Paralisia de membros inferiores
16	Primo 1º grau/2Primos 1ºgrau/Prima 1º grau	Sindactilia / Hipoxia no parto, problemas motores / S. X frágil
18	Tio 2º grau/Prima 3º grau	Deformidade física e problemas de fala / Síndrome não esclarecida
20	Primas 1º grau/Primo distante/Parente distante	Malformações em tórax e coração em uma delas; a outra apresenta malformação em tórax e membros inferiores / alteração de fala e posição do pescoço / S. Down
22	Tia 2ºgrau/Prima 2º grau	Fenda palatina / S.Down
28	Primo 1º grau / Prima 2º grau	Membros curtos e refluxo exofágico / suspeita de possuir S.Moebius
29	Tia 1º grau	Deficiência visual

Quadro 5.3 - Classificação dos pacientes segundo a presença de malformações ou síndromes em outros indivíduos da família respectivamente

5.2 Análise genética

A amplificação do DNA genômico dos pacientes e dos controles mostrou 661 bp para o gene **HOXA1** e 576 bp para o gene **HOXB1**.

As figuras 5.4 e 5.5 mostram a amplificação dos genes HOXA1 e HOXB1 nos pacientes com síndrome de Moebius, nos indivíduos não portadores da síndrome e aparentados com os pacientes e nos indivíduos não portadores da síndrome e não aparentados com os pacientes.

Todas as amostras foram seqüenciadas. Os resultados foram analisados comparando-se as seqüências obtidas com as disponibilizadas no banco de dados GeneBank, revelando homologia superior a 95%, segundo análise por software (DNASTAR – Lasergene 7[®] for Windows[®], DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2006).

Em nossas amostras foram encontrados polimorfismo no gene HOXA1 (Figura 5.6) e três no gene HOXB1, além de uma inserção de 9pb neste último gene. Todos esses polimorfismos estão descritos e são encontrados na base de dados Pubmed, no link SNP (Single Nucleotide Polymorphism). O gene Hoxb1 ainda apresenta um polimorfismo próximo à inserção de 9pb, porém a presença da inserção não permite que este polimorfismo seja investigado, pois quando em heterozigose, faz com que o eletroferograma saia de fase (Figura 5.6).

Os polimorfismos encontrados são: para o gene HOXA1, que possui duas variantes (Pubmed – Nucleotide), há uma troca na base 218 (A/G), resultando numa substituição de aminoácidos (glutamato por alanina na variante 1 e arginina por serina

na variante 2); para o gene HOXB1 identificamos três trocas simples de nucleotídeos, uma na base 243 (C/T) não resultando em uma troca de aminoácidos (determinando, ambos, o aminoácido serina), uma na base 315 (A por T) resultando em troca de aminoácidos (glutamina por histidina), e uma troca na base 456 (G por A) não resultando em troca de aminoácidos (determinando, ambos, o aminoácido alanina). A Inserção de 9pb após a base 70 acrescentou duas repetições contendo três aminoácidos (Histidina-Serina-Alanina) à homeoproteína. Por último, pudemos identificar um polimorfismo na base 70, anterior à inserção de 9pb, porém o fato da inserção fazer com que a leitura da sequência saia de fase, não nos permitiu aprofundarmo-nos em seu estudo. Os polimorfismos para pacientes, parentes e controles encontram-se respectivamente nos quadros Ap.C1, Ap.C2 e Ap.C3, apresentados no Apêndice C.

Figura 5.4 - Expressão do gene HOXA1 em pacientes portadores da síndrome de Moebius, em Parentes consanguíneos não portadores da síndrome, e indivíduos não portadores e não aparentados.

A - Portadores da síndrome de Moebius (pacientes de 1 a 30)

B - Parentes dosangüíneos (om respectiva numeração referente ao paciente)

C - Não portadores e não aparentados

Figura 5.5 - Expressão do gene HOXB1 em pacientes portadores da síndrome de Moebius, em Parentes consanguíneos não portadores da síndrome, e indivíduos não portadores e não aparentados.

A - Portadores da síndrome de Moebius (pacientes de 1 a 30)

B - Parentes dosangüíneos (om respectiva numeração referente ao paciente)

C - Não portadores e não aparentados

Figura 5.6 - Eletroferogramas de alterações em HOXA1 e HOXB1

A - Polimorfismo A218G em HOXA1. A' mostra presença do polimorfismo em heterozigose. A'' contém amostra selvagem e A''' o polimorfismo em homozigose

B - Alteração de HOXB1. B' com amostra selvagem e B'' presença da inserção de 9pb, com eletroferograma fora de fase.

Analisando a diferença dos polimorfismos apresentados pelos pacientes e o apresentado pelos indivíduos não portadores da síndrome (parente e controles), observamos que há uma diferença significativa para o polimorfismo A315T (gene HOXB1), com $p = 0,02$ (Tabela Ap.D2, contida no Apêndice D). Os nucleotídeos AA foram apresentados em maior número pelos dois grupos de indivíduos, sendo que os pacientes apresentaram 86,7%, e 56,7 para indivíduos não acometidos. 40% dos não acometidos apresentaram os nucleotídeos AT, enquanto que apenas 13,3% dos pacientes apresentam este polimorfismo. Uma pessoa não acometida apresenta as bases TT, o qual não foi apresentado por nenhum dos pacientes.

A análise estatística dos polimorfismos mostrou ser relevante a diferença entre os grupos de pacientes e controles em relação aos polimorfismos C243T, A315T e G456A (Tabela Ap.D3, contida no Apêndice D), todos pertencentes ao gene HOXB1. Nesta análise consideramos como controle os indivíduos que não são portadores da síndrome de Moebius e nem aparentados. Para o polimorfismo C243T 73.3% dos pacientes apresentam nucleotídeos CC enquanto 40% dos controles apresentaram esses mesmos nucleotídeos ($p = 0,03$). Dos controles, 46,7% apresentaram nucleotídeos CT enquanto que apenas 26,7% dos pacientes apresentaram esses nucleotídeos. O número de indivíduos portadores de TT foi insignificante nas duas amostras (nenhum dos pacientes e apenas 13,3% dos controles).

Quanto ao polimorfismo A315T, 86,7% dos pacientes apresentam nucleotídeos AA, enquanto que 46,7% dos controles apresentam esses nucleotídeos ($p = 0,01$). AT e AA estão em igualdade no grupo controle (aproximadamente 46,7%), porém o número de ocorrências de AT em pacientes é insignificante frente aos outros dados

computados. Apenas um indivíduo do grupo controle apresenta nucleotídeos TT e nenhum paciente apresentou esses nucleotídeos.

A análise do polimorfismo G456A mostrou que 66,7% dos pacientes apresentam nucleotídeos GG, sendo que dos controles, 33,3% apresentaram esses nucleotídeos ($p = 0,02$). Para os controles foi mais prevalente o polimorfismo GA, o qual apresentou incidência em 46,7% dos indivíduos, comparando-se com o grupo de pacientes que apresentou 33,3%. 20% dos indivíduos do grupo controle apresentaram nucleotídeos AA, sendo que esta característica não foi apresentada por nenhum dos pacientes.

Entre os pacientes e seus parentes houve diferença estatisticamente significativa em relação ao polimorfismo G218A ($p = 0,03$). Neste caso, a maioria de pacientes (63,3%) e parentes (86,7%) apresentaram nucleotídeos AA (Tabela Ap.D4, contida no Apêndice D). Porém a diferença com maior significado entre os dois grupos foi apresentada quanto aos nucleotídeos GA. 36,7% dos pacientes apresentaram esses nucleotídeos, enquanto o grupo de parentes possui apenas um indivíduo (6,7%) com GA. Os resultados obtidos comparando-se o as seqüências de parentes e controles não aparentados, não revelaram diferenças significativas (Tabela Ap.D5, contida no Apêndice D).

As alterações genéticas nos pacientes foram comparadas ao valor obtido pelo método CLUFT para os membros, face e tórax, e ao acometimento dos nervos cranianos (Tabelas Ap.D6 e Ap.D7, contida no Apêndice D). A análise dos polimorfismos em relação ao acometimento dos membros, tronco e tórax, só mostrou relevância para o grupo de alterações nos membros inferiores (L). Os dados gerados pela análise estatística indicam que há associação significativa entre o acometimento dos membros inferiores segundo a classificação do sistema CLUFT e os polimorfismos

C243T ($p < 0,01$) e G456A ($p = 0,02$), assim como a inserção de 9pb ($p < 0,01$), todos no gene HOXB1. Porém, quando comparado com as seqüências contidas na base de dados Pubmed – SNP (www.pubmed.com), verificou-se que a maioria dos pacientes apresentam uma configuração genotípica dentro dos padrões descritos na base de dados (Tabela Ap.D8, contida no Apêndice D).

Nenhum paciente apresentou L igual a 2. Para o polimorfismo C243T, entre os pacientes que têm L igual a 3, 100,0% apresentam nucleotídeos CC, sendo menor esta porcentagem quando L é igual a um (60%) ou zero (50%). Nenhum dos pacientes apresentou nucleotídeos TT. Já para o polimorfismo G456A, entre os paciente que têm L igual a três, 92,3% apresentam nucleotídeos GG. Enquanto que para os que possuem L igual a um, 60,0% apresentam nucleotídeos GG. 58,3% dos que possuem L igual a 0 são nucleotídeos GA, sendo que essas diferenças não são significantes. Nenhum paciente apresenta nucleotídeos AA.

Para a inserção de 9pb, 100,0% dos que têm L=3 e 60,0% dos que têm L=1 não possuem inserção de 9pb. Comparando-se com a mesma diferença apresentada pelos indivíduos não afetados, 60% não possuem essa inserção (desses 46,7% dentre os indivíduos controles, e 73,3% dentre os do grupo de aparentados).

Observa-se também diferença significativa entre o acometimento do nervo craniano XII e os polimorfismos A315T ($p = 0,04$) e G456A ($p = 0,02$). Nos pacientes com acometimento do XII par craniano, para o polimorfismo A315T, 100,0% dos pacientes apresentaram os nucleotídeos AA, sendo que este polimorfismo é encontrado em 56,7% dos indivíduos não afetados (46,6% dos indivíduos controles e 66,7% dos parentes). Para o polimorfismo G456T, 86,7% dos pacientes apresentam nucleotídeos

GG, 46,7% das pessoas não afetadas apresentam esses nucleotídeos (60% para parentes e 33,3% para o grupo de controle) (Apêndice D – Tabela 9).

As alterações genéticas presentes não estão relacionadas as intercorrências gestacionais ou aos possíveis efeitos quanto o uso do misoprostol durante a gestação (Apêndice D - Tabela 8)

6 DISCUSSÃO

Este estudo avalia as características clínicas da síndrome de Moebius, correlacionando-as com os resultados da análise genética para os genes HOXA1 e HOXB1 dos pacientes, em relação a seus pais, e aos indivíduos não aparentados e não portadores da síndrome. O estudo genético, mesmo que de grupos pequenos, é difícil de ser realizado no Brasil devido a grande miscigenação da população. No entanto, o custo e a complexidade desses estudos, faz com que pequenos grupos de pessoas sejam avaliados no intuito de sinalizar as possíveis alterações, para que series com números expressivos de portadores de alguma alteração e controles possam comprovar os resultados previamente obtidos.

Com relação às características clínicas, esse estudo mostrou que não houve diferenças significativas na prevalência entre o sexo dos pacientes, sendo que 53% dos pacientes eram do sexo masculino e 47% dos pacientes eram do sexo feminino. É importante salientar que a literatura mostra informações conflitantes a esse respeito, visto que alguns autores apontam para maior prevalência no sexo masculino (STROMLAND et al., 2002, GONZALEZ et al., 1998) enquanto outros, apontam para o sexo feminino (BANDIM et al., 2003). Portanto, a análise de 30 casos da população brasileira é importante para se estabelecer um parâmetro de ocorrência nacional.

Estudos pregressos sugerem o misoprostol como fator desencadeante de alterações vasculares causando hipóxia no broto embrionário e possivelmente levando à síndrome de Moebius (BANDIM et al., 2003; GONZALEZ et al., 1998). No entanto,

esse mecanismo não está totalmente elucidado. O uso do misoprostol durante os primeiros meses de gestação, quando as estruturas faciais envolvidas estão sendo formadas, foi reportado em 12 (40%) pacientes examinados. Desses, 50% foram expostos no primeiro mês de gestação, período no qual existe a organização do rombencéfalo, estrutura que da origem ao núcleo dos VI e VII pares de nervos cranianos.

O uso do misoprostol não determinou um acometimento mais severo, e para os pacientes expostos a essa medicação, a graduação CLUFT inclui, ao mesmo tempo, fenótipos mais brandos e mais graves. Até o momento, não há na literatura dados relacionando a classificação dos pacientes pelo sistema CLUFT com o uso de substâncias abortivas.

Análise prévia feita em crianças brasileiras mostrou que o misoprostol foi associado a deficiências comumente vistas na síndrome de Moebius. As alterações mais comuns foram *Talipes equinovarus* associado a nervos cranianos deficientes (principalmente os pares V, VI e VII), presentes em 17 pacientes (40,5%); este estudo também mostrou que não há correlação entre a dose, forma de administração ou o período da gestação, e o grau de acometimento dos nervos cranianos (GONZALEZ et al., 1998). Não foi objetivo do presente estudo relacionar exclusivamente o uso do misoprostol com a síndrome de Moebius, portanto, dados referentes à dose e forma de administração não foram coletados.

Ainda nesse sentido, em geral as mães não se recordavam ou não se sentiam confortáveis ao mencionar o uso de drogas abortivas, o que torna duvidoso, mesmo o dado referente ao número de pacientes onde a mãe fez uso de alguma substância. É importante salientar nesse caso, que o presente estudo aponta para 40% dos casos

estão associados ao uso de abortivos, sendo esse número similar ao estudo realizado por Gonzalez et al. (1998), onde 40,5% dos casos estavam relacionados ao uso de substâncias abortivas.

Outros artigos apontam para uma possível alteração genética envolvida, mostrando membros de uma mesma família portadores de fenótipos parecidos com a síndrome de Moebius (BARAITSER, 1977; DOTTI et al., 1989; ROJAS-MARTINEZ et al., 1991; SLEE; SMART; VILJOEN, 1991; VERZIJL et al., 2003; ZITER; WISER; ROBINSON, 1977). O presente estudo mostra que 16 indivíduos possuem parentes portadores de alguma outra síndrome ou malformações, sendo que desses, três apresentam parentes com características semelhantes as da síndrome de Moebius na família. Estes indivíduos possuem semelhanças nos padrões genéticos estudados, estando de acordo com o observado para a maioria dos outros pacientes; seus pais não puderam ser avaliados por dificuldades na obtenção de material genético.

A diplegia facial revelou um padrão de acometimento complexo, envolvendo diferentes regiões da face de forma uni ou bilateral. Contudo, pôde-se observar que as alterações faciais ocorrem num maior número de pacientes no terço superior da face, diminuindo em número de pacientes afetados e tornando-se mais branda (há pequenos traços de movimentos) nas porções mais inferiores (Quadro 5.2). Esses dados corroboram com os descritos por Verzijl et al. (2003) que descreveram em 62% dos indivíduos estudados uma atenuação da paralisia facial no terço inferior, no entanto, até o presente momento, não há explicação para esse fato.

O nervo craniano mais acometido foi o sétimo par (facial) seguido pelo sexto par (abducente), e em menor proporção pelo XII par (hipoglosso). O envolvimento de outros pares de nervo cranianos, além do VI e VII já foi relatado na literatura, sendo os mais

prevalentes o XII (hipoglosso) e o V par (trigêmeo) (ABRANSON; COHEN, MULLIKEN, et al., 1998; GONZALEZ et al., 1998; VERZIIL et al.; 2003). Contudo, o presente estudo não evidenciou alterações no V par de nervos cranianos. Esse fato pode ser explicado pela dificuldade na avaliação dos pacientes com bases meramente clínicas, sem o auxílio de exames complementares, como eletromiografias e eletroestimulação.

Além disso, é preciso muito cuidado no discernimento entre as alterações causadas pelos VI e VII pares em estruturas também inervadas pelo nervo trigêmeo. O nervo trigêmeo possui três raízes, sendo duas puramente sensitivas (ramo maxilar e oftálmico) e uma raiz mista (ramo mandibular), isto é, sensitiva e motora. Seu ramo motor vai inervar os músculos mastigatórios (m. masseter, os mm. pterigóideo medial e lateral, porção anterior do m. digástrico, m. temporal), que por sua vez funcionam concomitantemente à musculatura facial inervada pelo VII par durante a mastigação, à movimentação da língua (XII e X pares), à sensibilidade da língua (principalmente VII e XII pares) e à movimentação dos músculos componentes da palatofaringe (IX e X pares). Dessa forma a sobreposição de funções dificulta a análise do acometimento dos respectivos pares cranianos.

Dificuldade mastigatória relacionada à mordida fraca, e ausência de rotação mandibular durante a mastigação, assim como perda de sensibilidade das regiões inervadas pelo V par foram sugeridas como efeito do comprometimento do nervo trigêmeo (VERZIIL et al., 2003). Ao exame clínico dos pacientes com síndrome de Moebius não foi encontrada hipoestesia facial, e as dificuldades mastigatórias encontradas foram relacionadas com uma sucessão de causas que podem envolver distúrbios da articulação temporomandibular, hipotonia da musculatura mastigatória e facial, deformidades dento-faciais e comprometimento de outros nervos cranianos.

Outros nervos cranianos estão envolvidos na síndrome de moebius em menor proporção. O mais comum entre eles, é o nervo hipoglosso (ou XII par). Consideramos o dismorfismo lingual, assim como a dificuldade de movimentação da língua como resultados do acometimento do XII nervo craniano. Estes achados são comumente relatados na literatura (VERZIIL et al., 2005a; VERZIIL et al., 2003).

Gonzalez et al. (1998) relata 16 (76%) casos de envolvimento deste nervo, nos pacientes com síndrome de Moebius, sendo que todos os pacientes desta amostra estiveram expostos ao misoprostol durante o primeiro trimestre de gestação, e apenas 21 (50%) eram portadores da síndrome de Moebius. Strömland et al. (2002), demonstrou acometimento do XII par em 16 pacientes (64%). O acometimento do XII par craniano, também foi demonstrado através de exames iconológicos (PEDRAZA et al., 2000). Estes dados estão de acordo com os achados do presente estudo visto que foram encontrados 15 indivíduos (57,1%) com síndrome de Moebius que apresentavam envolvimento do nervo hipoglosso, sendo que desses 46,7% foram expostos ao misoprostol.

A avaliação da musculatura da língua também é complexa, uma vez que essa estrutura apresenta movimentos intrínsecos e extrínsecos. Muitos dos pacientes examinados apresentavam movimentos extrínsecos, mas não intrínsecos. E comumente, os pacientes que apresentavam maior debilidade da movimentação ou alteração do formato lingual, também apresentavam alguma alteração de palato mole.

A síndrome de Moebius já foi associada ao Autismo. Em estudo avaliando 22 pacientes portadores de síndrome de Moebius, Strömland et al. (2002) procederam testes para determinar uma condição de autismo concomitante. Os autores afirmam que sete de seus 22 pacientes, mostraram comportamento autista. Dentre estes pacientes,

todos também apresentavam algum retardo mental. Nosso estudo não objetivou a avaliação das condições mentais dos pacientes, porém alguns pacientes apresentaram claramente déficit neurológico, não desenvolvendo inclusive funções básicas como, manutenção postural e resposta verbal.

As alterações faciais são complementadas pela presença de micrognatia, fendas lábio-palatais, pregas epicantais verticais, microftalmia, deformidades dento-alveolares (DOMINGOS et al., 2004; VERZIJJL et al., 2003; STRÖMLAND et al., 2002). Os pacientes examinados nesse estudo, apresentavam combinações destas alterações maxilofaciais, sendo as mais comuns a micrognatia, e deformidades dento-faciais. Segundo Moss e Rankow (1968), os músculos da face participam do crescimento facial, portanto, o alto índice de micrognatia apresentado no estudo pode ser consequência da hipomobilidade muscular.

O estrabismo e a face em máscara foram características faciais presentes quase que na totalidade dos pacientes, e essas alterações foram interpretadas como consequência das alterações nos nervos cranianos.

Alterações como fenda palatina podem ser consequência da micrognatia secundária a hipomobilidade da musculatura facial. Este fato interfere no posicionamento da língua durante a embriogênese, não permitindo o abaixamento dos processos palatinos da maxila.

Os membros superiores e inferiores e o tronco mostram-se acometidos de maneira complexa, apresentando-se completamente desenvolvidos em alguns casos, ou podendo exibir déficit de formação de dedos, encurtamentos de membros e artrogrupos de acordo com descrições prévias da literatura (ABRAMSON; COHEN; MULLIKEN, 1998; DOMINGOS et al., 2004; VERZIJJL et al., 2003; STRÖMLAND et al.,

2002). Durante o exame clínico identificou-se a presença de alterações nas mãos e nos pés, principalmente do tipo *Talipes equinovarus*, braquidactilia, sindactilia, camptodactilia, e déficits de desenvolvimento longitudinais e transversais dos membros inferiores. Estas alterações também foram descritas em crianças expostas ao misoprostol durante a gestação, mas não portadoras da síndrome de Moebius (GONZALEZ et al., 1993). O uso do misoprostol ou de intercorrências gestacionais por nós avaliado, não está relacionado com o maior acometimento dos segmentos avaliados pelo método CLUFT, sendo que para o acometimento de membros inferiores, a condição mais prevalente foi a de ausência ou menor envolvimento, nos indivíduos expostos ao misoprostol ou a intercorrência durante a gestação ($p=0,02$).

Ao exame clínico do tórax dos pacientes com síndrome de Moebius, revelou-se a presença de escoliose como a característica mais incidente, porém esta alteração é comum na população em geral, visto que uma incidência de 2,9% da escoliose idiopática em crianças em fase escolar é descrita (GRIVAS et al., 2002).

As inúmeras características clínicas encontradas nos pacientes se sobrepõem de forma aleatória, refletindo a complexidade da síndrome de Moebius. A classificação destas alterações, ajudaria no diagnóstico e no plano de tratamento do paciente, assim como permitiria o estudo mais detalhado dos eventos determinantes da síndrome, porém classificar estes pacientes foi um desafio.

A classificação CLUFT (ABRAMSON; COHEN; MULLIKEN, 1998), deve ser vista como um protocolo clínico, que permite distinguir e catalogar as malformações de indivíduos portadores da Síndrome de Moebius. Para o estudo da etiologia da síndrome, necessitamos de informações mais detalhadas que permitissem relacionar os achados clínicos com a cronologia do desenvolvimento do embrião. Mesmo após

elaboração de um protocolo sistematizado de avaliação, o método apresentou-se falho na distinção e classificação dos variados espectros apresentados pelos pacientes. Nem sempre o maior CLUFT determina necessariamente o paciente mais debilitado. Por exemplo, o maior CLUFT apresentado foi de 33321 (maior número de estruturas afetadas), porém o paciente não apresentou nenhuma alteração que comprometesse sua autonomia. Este método não avalia o componente neurológico, e sobrepõe malformações que podem ou não pertencer a uma seqüência de causa e efeito (p. ex. diplegia facial e fenda palatina).

A classificação da forma proposta por Abramson não permite, por exemplo, detalhar quais nervos cranianos foram comprometidos concomitantemente ao nervo facial, pois avalia somente “outro nervo envolvido”. Diferentes alterações em membros também são consideradas da mesma forma, fato este que confunde o observador durante a avaliação. Essa classificação tão pouco permite evidenciar uma correlação entre as alterações das extremidades, do tronco e da face, visto que sobrepõe as alterações dos nervos cranianos ou dos membros, não permitindo distinguir quais nervos ou segmentos dos membros estão acometidos, e o quanto deles está acometido. Este fato impede de relacionarmos os achados clínicos com a seqüência de formação do embrião. Por exemplo, um acometimento completo da motilidade dos músculos da mímica sugere uma alteração do sistema nervoso mais proximal; do contrário, a alteração estaria na formação dos nervos periféricos. Portanto, seria interessante que a classificação contivesse informações mais detalhadas do padrão de inervação.

Estudos pregressos de embriologia do sistema nervo central, revelou que os genes HOXA1 e HOXB1 são necessários na formação, especificação e manutenção

dos núcleos motores dos nervos originados no quarto e quinto rombômeros, assim como desempenham importante papel na migração das células da crista neural do primeiro e segundo arcos-branquiais (CARPENTER et al., 1993; GODDARD et al., 1996; MARK et al., 1993).

A inativação do primeiro exon do gene *Hoxb1*, assim como do segundo exon, gerou camundongos com características idênticas. Estas características compreendiam hipomobilidade dos músculos da mímica facial. A dissecação dos animais, os autores constataram uma diminuição do diâmetro e do número das ramificações do nervo facial, muitas vezes terminando aparentemente de forma prematura. Os autores afirmam que o fenótipo dos animais mutantes para *Hoxb-1* é similar ao encontrado em pessoas portadoras da síndrome de Moebius ou de paralisia facial de Bell. Este estudo também mostrou que camundongos mutantes homozigotos para *Hoxa-1*, mostram maior perturbação na organização do rombencéfalo quando comparados a animais mutantes somente para *Hoxb-1* (GODDARD et al., 1996).

O gene *HOXA1* recentemente foi relacionado à síndrome de Bosley-Salih-Alorainy (BSA), descrita em casamentos co-sangüíneos de duas populações, na Turquia e Arábia Saudita. Os indivíduos acometidos apresentam hipofunção relacionada aos nervos cranianos semelhantes à síndrome de Moebius (TISCHFIELD et al., 2005). O estudo genético destes apresentou duas mutações no gene *HOXA1*, responsável pela formação dos nervos cranianos acometidos. Os portadores da síndrome BSA mostraram dois padrões diferentes de mutações: os portadores provenientes da população saudita exibiram uma inserção em homozigose de uma guanina após a base de número 175 (175-176insG), esta inserção determina um stop códon prematuro; os indivíduos provenientes da população turca, exibiam uma troca de

bases, em homozigose, na posição 84 (84C-G), determinando a substituição de um stop códon por uma tirosina. Estas mutações afetam a síntese das três diferentes homeoproteínas, promovendo a perda de função do gene HOXA1. Estas alterações não foram encontradas em nenhum dos indivíduos com a síndrome de Moebius no presente estudo.

O presente estudo baseou-se em estudos pregressos para definir a região a ser amplificada, visto que tanto nos experimentos com animais, quanto na síndrome BSA, os defeitos gerados no primeiro exon de ambos os genes (HOXA1 e HOXB1) refletem em características semelhantes às apresentadas pelos portadores da síndrome de Moebius.

No entanto, aparentemente nenhuma das alterações genéticas encontradas é determinante da síndrome de Moebius. O seqüenciamento das amostras revelou presença de polimorfismos nos HOXA1 e HOXB1, assim como uma inserção de 9pb no gene HOXB1.

A presença de uma troca de bases G218A no gene HOXA1, foi relacionada ao autismo e alterações da anatomia craniana de autistas previamente na literatura (CONCIATORI et al., 2004; INGRAM et al., 2000). Outros estudos falharam em reproduzir esta associação, indicando a possibilidade desse polimorfismo estar ligado a um componente racial, variando sua penetrância segundo a população estudada (COLLINS et al., 2003; DEVLIN et al., 2002; GALLAGHER et al., 2004; LI et al., 2002; ROMANO et al., 2003; TALEBIZADEH et al., 2002). Nosso estudo evidenciou a presença deste polimorfismo tanto nos pacientes, como nos pais e nos indivíduos não relacionados á Síndrome de Moebius.

Segundo observado na base de dados SNP - PubMed, apenas os polimorfismos G218A (HOXA1) e A315T (HOXB1), e a inserção de nove pares de bases para HOXB1, modificam a proteína. Os demais polimorfismos investigados não modificam os aminoácidos componentes da proteína.

Para o polimorfismo detectado no gene HOXA1 (G218A), a análise estatística demonstrou ser mais relevante a homozigose AA entre parentes e pacientes ($p=0,03$), considerada mais prevalente em populações europeias e asiáticas (rs10951154 - SNP – PubMed). Este polimorfismo foi investigado por outros autores, que o relacionaram com o autismo. Porém as diferenças apresentadas para este polimorfismo, aparentemente estão ligadas a um componente racial (INGRAM et al., 2000; CONCIATORI et al., 2004).

O polimorfismo A315T no gene HOXB1, mostrou uma diferença estatística significativa para a presença da forma homozigota AA no grupo de pacientes e indivíduos não portadores da síndrome (parentes e não aparentados). Quando comparados portadores da síndrome e indivíduos não portadores, há uma discrepância na qual AA é mais significativa ($p=0,01$) em pacientes, enquanto que controles apresentam maior número para AT e TT. Este polimorfismo também mostra alta incidência de AA para pacientes com acometimento do n. hipoglosso ($p=0,04$).

A inserção de 9pb para HOXB1 mostrou-se relevante nas deformidades dos membros inferiores. Observou-se que grande parte dos pacientes portadores destas deformidades não apresentavam a inserção em HOXB1, quando comparados aos outros grupos estudados.

De uma maneira geral, a avaliação estatística dos polimorfismos mostrou que estes não podem ser ligados à etiologia da síndrome de Moebius, e também não tem

relação com o uso de misoprostol ou as intercorrências gestacionais, visto que as características genéticas são compartilhadas por indivíduos afetados e não afetados.

7 CONCLUSÕES

7.1. O método CLUFT de classificação é clínico, de execução confusa e não permitiu classificar os pacientes de maneira a graduar o acometimento da síndrome.

7.2. Não há correlação entre os dados obtidos pela classificação CLUFT e os eventos ocorridos durante a gestação ou quanto aos antecedentes familiares (uso de medicação e intercorrências).

7.3. Foram encontradas, no total, cinco alterações genéticas, sendo que destas apenas três produzem uma diferença de aminoácidos.

7.4. A comparação entre os achados genéticos e clínicos mostrou que as alterações genéticas encontradas não podem ser correlacionadas a etiologia da síndrome estudada.

REFERÊNCIAS¹

Abramson DL, Cohen MM Jr, Mulliken JB. Mobius syndrome: classification and grading system. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(4):961-7.

Alderman B, Mueller B, Moore LG. Comments on "Moebius syndrome: animal model--human correlations and evidence for a brainstem vascular etiology". *Teratology* 1991;43(6):555-7.

Bandim JM, Ventura LO, Miller MT, Almeida HC, Costa AE. Autism and Mobius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(2A):181-5.

Baraitser M. Genetics of Mobius syndrome. *J Med Genet* 1977;14(6):415-7.

Bavinck JN, Weaver DD. Subclavian artery supply disruption sequence: hypothesis of a vascular etiology for Poland, Klippel-Feil, and Mobius anomalies. *Am J Med Genet* 1986;23(4):903-18.

Carpenter EM, Goddard JM, Chisaka O, Manley NR, Capecchi MR. Loss of Hox-A1 (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* 1993;118(4):1063-75.

Cattaneo L, Chierici E, Bianchi B, Sesenna E, Pavesi G. The localization of facial motor impairment in sporadic Mobius syndrome. *Neurology* 2006;66(12):1907-12.

Chisaka O, Capecchi MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* 1991;350(6318):473-9.

Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res* 1999;248(1):1-9.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

Collins JS, Schroer RJ, Bird J, Michaelis RC. The HOXA1 A218G polymorphism and autism: lack of association in white and black patients from the South Carolina Autism Project. *J Autism Dev Disord* 2003;33(3):343-8.

Conciatori M, Stodgell CJ, Hyman SL, O'Bara M, Militeri R, Bravaccio C, et al. Association between the HOXA1 A218G polymorphism and increased head circumference in patients with autism. *Biol Psychiatry* 2004;55(4):413-9.

Davis AP, Capecchi MR. A mutational analysis of the 5' HoxD genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. *Development* 1996;122(4):1175-85.

Davis AP, Witte DP, Hsieh-Li HM, Potter SS, Capecchi MR. Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 1995;375(6534):791-5.

Devlin B, Bennett P, Cook EH Jr, Dawson G, Gonen D, Grigorenko EL, et al. CPEA Genetics Network. Collaborative Programs of Excellence in Autism. No evidence for linkage of liability to autism to HOXA1 in a sample from the CPEA network. *Am J Med Genet* 2002;114(6):667-72.

Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Renucci A, Duboule D. Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature* 1989;342(6251):767-72.

Domingos AC, Lopes SL, Almeida SM, Boscolo FN, Whaites EJ. Poland-Moebius syndrome: a case with oral anomalies. *Oral Dis* 2004;10(6):404-7.

Donahue SP, Wenger SL, Steele MW, Gorin MB. Broad-spectrum Mobius syndrome associated with a 1;11 chromosome translocation. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1993;14(1):17-21.

Dotti MT, Federico A, Palmeri S, Guazzi GC. Congenital oculo-facial paralysis (Moebius syndrome): evidence of dominant inheritance in two families. *Acta Neurol (Napoli)* 1989;11(6):434-8.

Duboule D, Dolle P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J* 1989;8(5):1497-505.

Federman R, Stoopack JC. Moebius syndrome. *J Oral Surg* 1975;33(9):676-8.

Finnerty JR. The origins of axial patterning in the *metazoa*: how old is bilateral symmetry? *Int J Dev Biol* 2003;47(7-8):523-9.

Ford HL. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer? *Cell Biol Int* 1998;22(6):397-400.

Fraser S, Keynes R, Lumsden A. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature* 1990;344(6265):431-5.

Fromental-Ramain C, Warot X, Lakkaraju S, Favier B, Haack H, Birling C, et al. Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* 1996;122(2):461-72.

Gallagher L, Hawi Z, Kearney G, Fitzgerald M, Gill M. No association between allelic variants of HOXA1/HOXB1 and autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;124(1):64-7.

Gavalas A, Studer M, Lumsden A, Rijli FM, Krumlauf R, Chambon P. Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* 1998;125(6):1123-36.

Gehring WJ, Muller M, Affolter M, Percival-Smith A, Billeter M, Qian YQ, et al. The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet* 1990;6(10):323-9.

Genest DR, Di Salvo D, Rosenblatt MJ, Holmes LB. Terminal transverse limb defects with tethering and omphalocele in a 17 week fetus following first trimester misoprostol exposure. *Clin Dysmorphol* 1999;8(1):53-8.

Goddard JM, Rossel M, Manley NR, Capecchi MR. Mice with targeted disruption of Hoxb-1 fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* 1996;122(10):3217-28.

Gonzalez CH, Marques-Dias MJ, Kim CA, Sugayama SM, Da Paz JA, Huson SM, et al. Congenital abnormalities in Brazilian children associated with misoprostol misuse in first trimester of pregnancy. *Lancet* 1998;351(9116):1624-7.

Gonzalez CH, Vargas FR, Perez AB, Kim CA, Brunoni D, Marques-Dias MJ, et al. Limb deficiency with or without Mobius sequence in seven Brazilian children associated with misoprostol use in the first trimester of pregnancy. *Am J Med Genet* 1993;47(1):59-64.

Gorlin RJ, Cohen MM Jr, Lefin LS. Syndromes of the head and neck, 3rd ed. New York: Oxford University Press; 1990.

Graham Jr MJ, Edwards MJ, Lipson AH, Webster WS. Gestational hyperthermia as a cause for Moebius syndrome. *Teratology* 1988;37:461A.

Grivas TB, Koukos K, Koukou UI, Maziotou C, Polyzois BD. The incidence of idiopathic scoliosis in Greece--analysis of domestic school screening programs. *Stud Health Technol Inform* 2002;91:71-5.

Hargrave M, James K, Nield K, Toomes C, Georgas K, Sullivan T, et al. Fine mapping of the neurally expressed gene SOX14 to human 3q23, relative to three congenital diseases. *Hum Genet* 2000;106(4):432-9.

Henderson JL. The congenital facial diplegia Syndrome: clinical features, pathology and aetiology. A review of sixty-one cases. *Brain* 1939;62:381-403.

Hoover-Fong JE, Cai J, Cargile CB, Thomas GH, Patel A, Griffin CA, et al. Facial dysgenesis: a novel facial syndrome with chromosome 7 deletion p15.1-21.1. *Am J Med Genet A* 2003;117(1):47-56.

Hunt P, Wilkinson D, Krumlauf R. Patterning the vertebrate head: murine Hox 2 genes mark distinct subpopulations of premigratory and migrating cranial neural crest. *Development* 1991a;112(1):43-50.

Hunt P, Whiting J, Muchamore I, Marshall H, Krumlauf R. Homeobox genes and models for patterning the hindbrain and branchial arches. *Dev Suppl* 1991b;1:187-96.

- Ingram JL, Stodgell CJ, Hyman SL, Figlewicz DA, Weitkamp LR, Rodier PM. Discovery of allelic variants of HOXA1 and HOXB1: genetic susceptibility to autism spectrum disorders. *Teratology* 2000;62(6):393-405.
- Jennings JE, Costigan C, Reardon W. Moebius sequence and hypogonadotrophic hypogonadism. *Am J Med Genet A* 2003;123(1):107-10.
- Kawai M, Momoi T, Fujii T, Nakano S, Itagaki Y, Mikawa H. The syndrome of Mobius sequence, peripheral neuropathy, and hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Med Genet* 1990;37(4):578-82.
- Kremer H, Kuyt LP, van den Helm B, van Reen M, Leunissen JA, Hamel BC, et al. Localization of a gene for Mobius syndrome to chromosome 3q by linkage analysis in a Dutch family. *Hum Mol Genet* 1996;5(9):1367-71.
- Le Lievre CS, Le Douarin NM. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1975;34(1):125-54.
- Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978;276(5688):565-70.
- Li J, Tabor HK, Nguyen L, Gleason C, Lotspeich LJ, Spiker D, et al. Lack of association between HoxA1 and HoxB1 gene variants and autism in 110 multiplex families. *Am J Med Genet* 2002;114(1):24-30.
- Lipson AH, Webster WS, Brown-Woodman PD, Osborn RA. Moebius syndrome: animal model--human correlations and evidence for a brainstem vascular etiology. *Teratology* 1989;40(4):339-50.
- Lohmann I, McGinnis N, Bodmer M, McGinnis W. The *Drosophila* Hox gene *deformed* sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell* 2002;110(4):457-66.
- Lumsden A, Keynes R. Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 1989;337(6206):424-8.

Lumsden A, Sprawson N, Graham A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* 1991;113(4):1281-91.

MacDermot KD, Winter RM, Taylor D, Baraitser M. Oculofacialbulbar palsy in mother and son: review of 26 reports of familial transmission within the 'Mobius spectrum of defects. *J Med Genet* 1991;28(1):18-26.

Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;42(4):421-9.

Mark M, Lufkin T, Vonesch JL, Ruberte E, Olivo JC, Dolle P, et al. Two rhombomeres are altered in Hoxa-1 mutant mice. *Development* 1993;119(2):319-38.

Miller MT, Stromland K. The mobius sequence: a relook. *J AAPOS* 1999;3(4):199-208.

Möbius PJ. Ueber angeborene doppelseitige Abducens-Facialis-Lähmung. *Münch Med Wochenschr* 1888;35:91.

Moss ML, Rankow RM. The role of the functional matrix in mandibular growth. *Angle Orthodontist* 1968;38(2): 95–103

Murphy P, Hill RE. Expression of the mouse labial-like homeobox-containing genes, Hox 2.9 and Hox 1.6, during segmentation of the hindbrain. *Development* 1991;111(1):61-74.

Nishikawa M, Ichiyama T, Hayashi T, Furukawa S. Mobius-like syndrome associated with a 1;2 chromosome translocation. *Clin Genet* 1997;51(2):122-3.

Parker DL, Mitchell PR, Holmes GL. Poland-Mobius syndrome. *J Med Genet* 1981;18(4):317-20.

Pastuszak AL, Schuler L, Speck-Martins CE, Coelho KE, Cordello SM, Vargas F, et al. Use of misoprostol during pregnancy and Mobius' syndrome in infants. *N Engl J Med* 1998;338(26):1881-5.

Pedraza S, Gamez J, Rovira A, Zamora A, Grive E, Raguer N, et al. MRI findings in Mobius syndrome: correlation with clinical features. *Neurology* 2000;55(7):1058-60.

Pitner SE, Edwards JE, McCormick WF. Observations on the pathology of the Moebius syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1965;28:362-74.

Rainy H, Fowler JS. Congenital facial diplegia due to nuclear lesion. *Rev Neurol Psychiatr* 1903;1:149-55.

Reed H, Grant W. Mobius's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1957;41(12):731-40.

Richards RN. The Mobius syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 1953;35-A(2):437-44.

Rojas-Martinez A, Garcia-Cruz D, Rodriguez Garcia A, Sanchez-Corona J, Rivas F. Poland-Moebius syndrome in a boy and Poland syndrome in his mother. *Clin Genet* 1991;40(3):225-8.

Romano V, Cali F, Mirisola M, Gambino G, D' Anna R, Di Rosa P, et al. Lack of association of HOXA1 and HOXB1 mutations and autism in Sicilian (Italian) patients. *Mol Psychiatry* 2003;8(8):716-7.

Rossel M, Capecchi MR. Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* 1999;126(22):5027-40.

Ruddle FH, Bentley KL, Murtha MT, Risch N. Gene loss and gain in the evolution of the vertebrates. *Dev Suppl* 1994;155-61.

Sano M, Kaga K, Takeuchi N, Kitazumi E, Kodama K. A case of Mobius syndrome--radiological and electrophysiological findings. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005;69(11):1583-6.

Scott GA, Goldsmith LA. Homeobox genes and skin development: a review. *J Invest Dermatol* 1993;101(1):3-8.

Sharpe PT. Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res* 1995;32(1-4):17-25.

Slee JJ, Smart RD, Viljoen DL. Deletion of chromosome 13 in Moebius syndrome. *J Med Genet* 1991;28(6):413-4.

Sperber GH, Wald J. Craniofacial development. London: B.C. Decker; 2001.

Stabile M, Cavaliere ML, Scarano G, Fels A, Valiani R, Ventruto V. Abnormal B.A.E.P. in a family with Moebius syndrome: evidence for supranuclear lesion. *Clin Genet* 1984;25(5):459-63.

Stromland K, Sjogreen L, Miller M, Gillberg C, Wentz E, Johansson M, et al. Mobius sequence--a Swedish multidiscipline study. *Eur J Paediatr Neurol* 2002;6(1):35-45.

Studer M, Gavalas A, Marshall H, Ariza-McNaughton L, Rijli FM, Chambon P, et al. Genetic interactions between Hoxa1 and Hoxb1 reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* 1998;125(6):1025-36.

Sugarman GI, Stark HH. Mobius syndrome with Poland's anomaly. *J Med Genet* 1973;10(2):192-6.

Suvarna J, Bagnawar M, Deshmukh CT. Moebius syndrome with total anomalous pulmonary venous connection. *Indian J Pediatr* 2006;73(5):427-9.

Talebizadeh Z, Bittel DC, Miles JH, Takahashi N, Wang CH, Kibiryeve N, et al. No association between HOXA1 and HOXB1 genes and autism spectrum disorders (ASD). *J Med Genet* 2002;39(11):e70.

Thakkar N, O'Neil W, Duvally J, Liu C, Ambler M. Mobius syndrome due to brain stem tegmental necrosis. *Arch Neurol* 1977;34(2):124-6.

Traboulsi EI, Maumenee IH. Extraocular muscle aplasia in Moebius syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1986;23(3):120-2.

Tischfield MA, Bosley TM, Salih MA, Alorainy IA, Sener EC, Nester MJ, et al. Homozygous HOXA1 mutations disrupt human brainstem, inner ear, cardiovascular and cognitive development. *Nat Genet* 2005;37(10):1035-7.

Towfighi J, Marks K, Palmer E, Vannucci R. Mobius syndrome. Neuropathologic observations. *Acta Neuropathol (Berl)* 1979;48(1):11-7.

Van Allen MW, Blodi FC. Neurologic aspects of the Mobius syndrome. A case study with electromyography of the extraocular and facial muscles. *Neurology*. 1960 Mar;10:249-59.

Van Der Zwaag B, Verzijl HT, Beltran-Valero De Bernabe D, Schuster VL, Van Bokhoven H, Kremer H, et al. Mutation analysis in the candidate Mobius syndrome genes PGT and GATA2 on chromosome 3 and EGR2 on chromosome 10. *J Med Genet* 2002;39(6):E30.

Van der Zwaag B, Verzijl HT, Wichers KH, Beltran-Valero de Bernabe D, Brunner HG, van Bokhoven H, et al. Sequence analysis of the PLEXIN-D1 gene in Mobius syndrome patients. *Pediatr Neurol* 2004;31(2):114-8.

Verzijl HT, Padberg GW, Zwarts MJ. Electrophysiological assessment in patients with Mobius syndrome and clumsiness. *J Clin Neurophysiol* 2005;22(6):422-5.

Verzijl HT, Valk J, de Vries R, Padberg GW. Radiologic evidence for absence of the facial nerve in Mobius syndrome. *Neurology* 2005a;64(5):849-55.

Verzijl HT, van der Zwaag B, Cruysberg JR, Padberg GW. Mobius syndrome redefined: a syndrome of rhombencephalic maldevelopment. *Neurology* 2003;61(3):327-33.

Verzijl HT, van Es N, Berger HJ, Padberg GW, van Spaendonck KP. Cognitive evaluation in adult patients with Mobius syndrome. *J Neurol* 2005b;252(2):202-7.

Verzijl HT, van den Helm B, Veldman B, Hamel BC, Kuyt LP, Padberg GW, et al. A second gene for autosomal dominant Mobius syndrome is localized to chromosome 10q, in a Dutch family. *Am J Hum Genet* 1999;65(3):752-6.

Von Graefe A. *Handbuch der gesamten augenheilkunde*. Leipzig: W. Engelmann; 1880.

Webster WS, Lipson AH, Brown-Woodman PD. Uterine trauma and limb defects. *Teratology* 1987;35(2):253-60.

Yokouchi Y, Sasaki H, Kuroiwa A. Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature* 1991;353:443-5.

Ziter FA, Wiser WC, Robinson A. Three-generation pedigree of a Mobius syndrome variant with chromosome translocation. *Arch Neurol* 1977;34(7):437-42.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

As informações abaixo têm por finalidade esclarecer e pedir sua participação voluntária na pesquisa chamada ***“Estudo de mutações nos genes HOXA-1 e HOXB-1 no DNA de pacientes portadores da Síndrome de Moebius”*** que é de responsabilidade da Profa. Dra. Andrea Mantesso.

Essa pesquisa é de caráter exploratório e seu objetivo é saber se esses 2 genes que normalmente participam da formação da face das pessoas estão alterados em pessoas que têm Síndrome de Moebius.

A pesquisa não vai trazer nenhum benefício direto para as pessoas que escolherem participar, mas pode ajudar a conhecer um pouco melhor a causa da Síndrome de Moebius.

Nas pessoas que quiserem participar da pesquisa serão feitos raspados no interior da boca com pequenas escovas macias que são menores e mais moles que escovas de dente. Esse procedimento não dói, não é desconfortável, leva menos de 2 minutos e é muito usado em todo o mundo inclusive em crianças.

Por causa dessas raspagens, algumas células vão ficar grudadas nas escovas, e no laboratório, o DNA, que é o material que forma os genes, será retirado para ser estudado.

A identidade das pessoas que participarem será mantida em segredo, mesmo que o resultado da pesquisa, e/ou os dados pessoais, radiográficos e fotográficos sejam utilizados em alguma forma de publicação no meio científico. Para isso, as amostras serão identificadas com códigos e nome das pessoas não vai ser utilizado. Somente serão utilizadas fotos quando não houver possibilidade de identificação da pessoa.

O DNA que será retirado a partir das escovas vai ser usado somente nessa pesquisa, e as informações que forem obtidas vão ser utilizadas apenas pela Profa. Dra. Andrea Mantesso e colaboradores da equipe.

A Profa. Dra. Andrea Mantesso prestará esclarecimentos a qualquer momento durante a pesquisa e ela pode ser encontrada no seguinte endereço:

Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo
Disciplina de Patologia Bucal
Av. Lineu Prestes 2227 CEP 05508-900
São Paulo – SP

Tel: 30917902; 30917912
Email: mantesso@usp.br

Os esclarecimentos que forem prestados pela Profa. Dra. Andrea Mantesso são sigilosos e confidenciais e as informações de uma pessoa participante não serão passadas para as outras.

As pessoas que não quiserem participar dessa pesquisa vão continuar a receber o tratamento dentário no Centro de Atendimento à Pacientes Especiais (CAPE-USP) sem qualquer prejuízo ou distinção.

Da mesma forma, se alguém que estiver participando mudar de idéia e quiser sair da pesquisa em qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização e o tratamento dentário vai continuar como era antes.

A participação das pessoas nessa pesquisa é voluntária e não vai haver nenhuma forma de ajuda financeira, mas também não vai haver despesa alguma para quem participar.

Desejo ser informado sobre os resultados da pesquisa:

() Sim

() Não

Nome: _____

RG: _____ Data de nascimento: _____

Nome da mãe: _____

Nome do pai: _____

Endereço e telefone para contato: _____

Após ler as informações acima e ter minhas dúvidas esclarecidas pela pesquisadora, assino este Termo de Consentimento.

() **ACEITO** participar dessa pesquisa

() **NÃO ACEITO** participar dessa pesquisa

São Paulo, ____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente ou do seu representante legal

Profa. Dra. Andrea Mantesso

2ª. Via – Participante voluntário

APÊNDICE B – CLUFT

Nome: _____ nº amostra: _____

C. Nervos Cranianos

Facial VII (motor e sensitivo)

	Sim	Não	Não aplicado
Dobras da frente elevação das sobrancelhas (Couro cabeludo)			
Dobras Verticais da frente			
Tração das sobrancelhas para baixo e medial			
Fechamento das pálpebras (Inferiores)			
Abertura e fechamento das narinas			
Fechamento dos lábios (Manter mandíbula estática)			
Abaixamento do ângulo da boca (Tristeza)			
Tração do ângulo da boca para o lado (Riso)			
Tração do ângulo da boca para cima e para o lado (Sorriso)			
Elevação do lábio superior (Podendo tracionar asa do nariz)			
Abaixamento do lábio inferior (Força no mento)			
Gustação 2/3 anteriores da língua (Aplicar café com cotonete)			

Abducente VI (motor)

	Sim	Não
Estrabismo convergente		

Trigêmio V (motor e sensitivo)

	Sim	Não	Não aplicado
Sensibilidade geral da face (Toque com pinça)			
Movimentos mastigatórios (Movimentação mandibular)			

Hipoglosso XII (motor)

	Sim	Não	Não aplicado
Movimentos intrínsecos da língua			
Movimentos extrínsecos da língua (Fala e deglutição)			

Olfatório I (sensitivo)

	Sim	Não	Não aplicado
Olfato			

Óptico II (sensitivo)

	Sim	Não	Não aplicado
Visão			
Presença dos reflexos da pupila			

Óculo-motor III (motor)

	Sim	Não	Não aplicado
Ptose palpebral (pálpebra superior)			
Abdução dos globos oculares			
Estrabismo ínfero-medial ou lateral			

Troclear IV (motor)

	Sim	Não
Limitação da depressão em adução		

Vestibulococlear VIII (sensitivo)

	Sim	Não	Não aplicado
Equilíbrio			
Audição			

Glossofaringeo IX (motor e sensitivo)

	Sim	Não	Não aplicado
Tensão do véu palatino			
Deslocamento da parede faringiana (lado sadio)			
Sensibilidade do 1/3 posterior			

Vago X (motor e sensitivo)

	Sim	Não	Não aplicado
Constricção faringiana			
Tensão do véu palatino (úvula)			
Tensão das cordas vocais			
Sensibilidade da mucosa faringiana			

Acessório XI (motor)

	Sim	Não	Não aplicado
(equilíbrio do pescoço)			
Esternocleidomastóideo (Lateralização da cabeça)			
Trapézio (Suspender os ombros)			

L. Extremidades inferiores

	Sim	Não	Não aplicado
Talipes equinovarius			
Sindactilia			
Anquilose			
Falanges ausentes			
Déficit longitudinal ou transversal			

U. Extremidades superiores

	Sim	Não	Não aplicado
Falha na diferenciação ou hipoplasia digital			
Ectrodactilia			
Falha de formação longitudinal ou transversal			

F. Anomalias faciais

	Sim	Não	Não aplicado
Fenda palatina			
Micrognatia			
Microtia, microftalmia, articulação anormal			

T. Tórax

	Sim	Não	Não aplicado
Escoliose			
Hipoplasia peitoral ou anomalias mamarias			
Deformidade da caixa torácica, aplasia peitoral ou mamaria			

C=____

L=____

U=____

F=____

T=____

Uso de medicamentos durante gravidez:

Intercorrências gestacionais:

APÊNDICE C – Quadros dos polimorfismos

paciente	HOXA1			HOXB1										
	polimorfismo G218A			polimorfismo C243T			polimorfismo A315T			polimorfismo G456A			Inserção de 9pb	
	GG	GA	AA	CC	CT	TT	AA	AT	TT	GG	GA	AA	sim	não
1			X	X			X			X				X
2			X	X			X			X				X
3		X		X			X			X				X
4			X	X			X			X				X
5		X		X			X			X				X
6			X		X		X				X		X	
7			X	X			X			X				X
8			X		X		X				X		X	
9		X		X			X			X				X
10			X	X				X			X		X	
11			X	X			X			X				X
12		X		X			X			X				X
13			X	X			X			X				X
14			X		X			X			X		X	
15		X		X			X			X				X
16			X	X			X			X				X
17			X	X			X			X				X
18		X		X			X			X				X
19		X			X			X			X		X	
20		X			X		X				X		X	
21			X		X		X				X		X	
22			X	X			X			X				X
23			X	X			X			X				X
24		X		X			X			X				X
25			X	X			X			X				X
26			X	X			X			X				X
27		X			X		X				X			X
28			X	X			X				X			X
29		X			X			X			X		X	
30			X	X			X			X				X

Quadro Ap.C1 - Polimorfismos apresentados pelo grupo de pacientes

	HOXA1			HOXB1										
	polimorfismo G218A			polimorfismo C243T			polimorfismo A315T			polimorfismo G456A			Inserção de 9pb	
	GG	GA	AA	CC	CT	TT	AA	AT	TT	GG	GA	AA	sim	não
controle														
A			X			X		X				X	X	
B			X		X			X			X		X	
C			X			X			X			X	X	
D			X	X			X			X				X
E			X	X			X			X				X
F		X		X			X					X		X
G		X			X			X			X		X	
H		X			X			X			X		X	
I		X		X			X			X				X
J			X	X			X			X				X
K			X		X			X			X		X	
L			X		X			X			X		X	
M	X				X		X				X		X	
N			X	X			X			X				X
O			X		X			X			X			X

Quadro Ap.C2 - Polimorfismos dos controles

	HOXA1			HOXB1										
	polimorfismo G218A			polimorfismo C243T			polimorfismo A315T			polimorfismo G456A			Inserção de 9pb	
	GG	GA	AA	CC	CT	TT	AA	AT	TT	GG	GA	AA	sim	não
parente														
6"			X	X			X			X				X
18'			X	X			X			X				X
18"			X	X			X			X				X
19"			X	X			X			X				X
20"	X					X		X				X	X	
23'			X		X		X				X			X
24'			X		X			X			X		X	
25'			X	X			X			X				X
26'			X		X			X			X		X	
27'			X	X			X			X				X
28'			X	X			X			X				X
29'			X		X			X			X		X	
30'			X		X			X			X			X
30"			X	X			X			X				X
2'		X		X			X			X				X

Quadro Ap.C3 - Polimorfismos dos parentes

APÊNDICE D – Tabelas estatísticas

Tabela Ap.D1 - Intercorrência gestacional, uso de misoprostol durante a gestação e fenótipo dos pacientes. (N = 28)

		Intercorrência sem medicamento	Sem intercorrência e sem medicamento	Tomou medicamento	p-valor *
Nervos Cranianos Acometidos	VII _ S N(%)				
	Unilateral	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0.99
	Bilateral	4 (15,4)	10 (38,5)	12 (46,1)	
	VII _ M N(%)				
	Não afetado	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0.94
	Unilateral	1 (11,1)	3 (33,3)	5 (55,6)	
	Bilateral	3 (16,7)	7 (38,9)	8 (44,4)	
	VII _ I N(%)				
	Não afetado	0 (0,0)	2 (66,7)	1 (33,3)	0.63
	Unilateral	2 (20,0)	2 (20,0)	6 (60,0)	
	Bilateral	2 (13,3)	7 (46,7)	6 (40,0)	
	VI N(%)				
	Não afetado	0 (0,0)	2 (40,0)	3 (60,0)	0.83
	Afetado	4 (17,4)	9 (39,1)	10 (43,5)	
	XII N(%)				
	Não afetado	2 (14,3)	7 (50,0)	5 (35,7)	0.60
	Afetado	2 (14,3)	4 (28,6)	8 (57,1)	
CLUFT	Membro inferior N(%)				
	0	1 (8,3)	5 (41,7)	6 (50,0)	0.60
	1	0 (0,0)	3 (75,0)	1 (25,0)	
	2	-	-	-	
	3	3 (23,1)	4 (30,8)	6 (46,1)	
	Membro superior N(%)				
	0	2 (10,0)	8 (40,0)	10 (50,0)	0,02 *
	1	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	
	2	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	3	1 (20,0)	4 (80,0)	0 (0,0)	
	Face N(%)				
	0	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0.37
	1	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	2	0 (11,5)	11 (42,3)	12 (46,2)	
	3	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Tórax N(%)				
	0	3 (16,7)	8 (44,4)	7 (38,9)	0.42
	1	0 (0,0)	3 (50,0)	3 (50,0)	
	2	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	3	0 (0,0)	1 (25,0)	3 (75,0)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher. Diferença significativa para $p < 0.05$.

Tabela Ap.D2 - Polimorfismos entre pacientes e parentes/controles

Polimorfismo	Pacientes (N=30)	Parentes/Controles (N=30)	p-valor *
G218A N(%)			
GG	0 (0,0)	2 (6,7)	0.09
GA	11 (36,7)	5 (16,7)	
AA	19 (63,3)	23 (76,7)	
C243T N(%)			
CC	22 (73,3)	15 (50,0)	0.08
CT	8 (26,7)	12 (40,0)	
TT	0 (0,0)	3 (10,0)	
A315T N(%)			
AA	26 (86,7)	17 (56,7)	0,02 *
AT	4 (13,3)	12 (40,0)	
TT	0 (0,0)	1 (3,3)	
G456A N(%)			
GG	20 (66,7)	14 (46,7)	0.07
GA	10 (33,3)	12 (40,0)	
AA	0 (0,0)	4 (13,3)	
ins_9pb N(%)			
não	22 (73,3)	18 (60,0)	0.41
sim	8 (26,7)	12 (40,0)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher. Diferença significativa para $p < 0.05$.

Tabela Ap.D3 - Polimorfismos entre pacientes e controles

Polimorfismo	Pacientes (N=30)	Controles (N=15)	p-valor *
G218A N(%)			
GG	0 (0,0)	1 (6,6)	0.38
GA	11 (36,7)	4 (26,7)	
AA	19 (63,3)	10 (66,7)	
C243T N(%)			
CC	22 (73,3)	6 (40,0)	0,03 *
CT	8 (26,7)	7 (46,7)	
TT	0 (0,0)	2 (13,3)	
A315T N(%)			
AA	26 (86,7)	7 (46,6)	0,01 *
AT	4 (13,3)	7 (46,7)	
TT	0 (0,0)	1 (6,7)	
G456A N(%)			
GG	20 (66,7)	5 (33,3)	0,02 *
GA	10 (33,3)	7 (46,7)	
AA	0 (0,0)	3 (20,0)	
ins_9pb N(%)			
não	22 (73,3)	7 (46,7)	0.11
sim	8 (36,7)	8 (53,3)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher. Diferença significativa para $p < 0.05$.

Tabela Ap.D4 - Polimorfismos entre pacientes e seus parentes

Polimorfismo	Pacientes (N=30)	Parentes (N=15)	p-valor *
G218A N(%)			
GG	0 (0,0)	1 (6,6)	0,03 *
GA	11 (36,7)	1 (6,7)	
AA	19 (63,3)	13 (86,7)	
C243T N(%)			
CC	22 (73,3)	9 (60,0)	0.35
CT	8 (26,7)	5 (33,3)	
TT	0 (0,0)	1 (6,7)	
A315T N(%)			
AA	26 (86,7)	10 (66,7)	0.14
AT	4 (13,3)	5 (33,3)	
TT	-	-	
G456A N(%)			
GG	20 (66,7)	9 (60,0)	0.54
GA	10 (33,3)	5 (33,3)	
AA	0 (0,0)	1 (6,7)	
ins_9pb N(%)			
não	22 (73,3)	11 (73,3)	0.99
sim	8 (26,7)	4 (26,7)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher.
Diferença significativa para $p < 0.05$.

Tabela Ap.D5 - Polimorfismos entre controles e parentes dos pacientes

Polimorfismo	Controles (N=15)	Parentes (N=15)	p-valor *
G218A N(%)			
GG	1 (6,6)	1 (6,6)	0.48
GA	4 (26,7)	1 (6,7)	
AA	10 (66,7)	13 (86,7)	
C243T N(%)			
CC	6 (40,0)	9 (60,0)	0.57
CT	7 (46,7)	5 (33,3)	
TT	2 (13,3)	1 (6,7)	
A315T N(%)			
AA	7 (46,6)	10 (66,7)	0.46
AT	7 (46,7)	5 (33,3)	
TT	1 (6,7)	0 (0,0)	
G456A N(%)			
GG	5 (33,3)	9 (60,0)	0.41
GA	7 (46,7)	5 (33,3)	
AA	3 (20,0)	1 (6,7)	
ins_9pb N(%)			
não	7 (46,7)	11 (73,3)	0.26
sim	8 (53,3)	4 (26,7)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher.
Diferença significativa para $p < 0.05$.

Tabela Ap.D6 - Polimorfismos e acometimentos classificados pelo sistema CLUFT (N = 30).

		G218A			C243T			A315T			G456A			ins_9pb		
		GA	AA	p-valor *	CC	CT	p-valor *	AA	AT	p-valor *	GG	GA	p-valor *	não	sim	p-valor *
CLUFT	Membro inferior N(%)															
	0	7 (58,3)	5 (41,7)	0.19	6 (50,0)	6 (50,0)	<0,01 *	9 (75,0)	3 (25,0)	0.15	5 (41,7)	7 (58,3)	0,02 *	6 (50,0)	6 (50,0)	<0,01 *
	1	1 (20,0)	4 (80,0)		3 (60,0)	2 (40,0)		4 (80,0)	1 (20,0)		3 (60,0)	2 (40,0)		3 (60,0)	2 (40,0)	
	2	-	-		-	-		-	-		-	-		-	-	
	3	3 (23,1)	10 (76,9)		13 (100,0)	0 (0,0)		13 (100,0)	0 (0,0)		12 (92,3)	1 (7,7)		13 (100,0)	0 (0,0)	
	Membro superior N(%)															
	0	8 (38,1)	13 (61,9)	0.62	13 (61,9)	8 (38,1)	0.35	18 (85,7)	3 (14,3)	0.99	12 (57,1)	9 (42,9)	0.44	14 (66,7)	7 (33,3)	0.76
	1	2 (66,7)	1 (33,3)		3 (100,0)	0 (0,0)		3 (100,0)	0 (0,0)		3 (100,0)	0 (0,0)		3 (100,0)	0 (0,0)	
	2	0 (0,0)	1 (100,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)	
	3	1 (20,0)	4 (80,0)		5 (100,0)	0 (0,0)		4 (80,0)	1 (20,0)		4 (80,0)	1 (20,0)		4 (80,0)	1 (20,0)	
	Face N(%)															
	0	0 (0,0)	1 (100,0)	0.76	0 (0,0)	1 (100,0)	0.62	1 (100,0)	0 (0,0)	0.99	0 (0,0)	1 (100,0)	0.72	0 (0,0)	1 (100,0)	0.62
	1	1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)	
	2	10 (37,0)	17 (63,0)		20 (74,1)	7 (25,9)		23 (85,2)	4 (14,8)		18 (66,7)	9 (33,3)		20 (74,1)	7 (25,9)	
	3	0 (0,0)	1 (100,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)	
	Tórax N(%)															
	0	8 (42,1)	11 (57,9)	0.99	12 (63,2)	7 (36,8)	0.52	16 (84,2)	3 (15,8)	0.64	11 (57,9)	8 (42,11)	0.75	13 (68,4)	6 (31,6)	0.88
	1	2 (33,3)	4 (66,7)		5 (83,3)	1 (16,7)		6 (100,0)	0 (0,0)		5 (83,3)	1 (16,7)		5 (83,3)	1 (16,7)	
	2	0 (0,0)	1 (100,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)	
	3	1 (25,0)	3 (75,0)		4 (100,0)	0 (0,0)		3 (75,0)	1 (25,0)		3 (75,0)	1 (25,0)		3 (75,0)	1 (25,0)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher. Diferença significativa para $p < 0.05$.

Tabela Ap.D7 - Polimorfismos e acometimentos dos nervos cranianos (N = 29)

		G218A			C243T			A315T			G456A			ins_9pb		
		GA	AA	p-valor *	CC	CT	p-valor *	AA	AT	p-valor *	GG	GA	p-valor *	não	sim	p-valor *
Nervos Cranianos Acometidos	VII _ S N(%)															
	Unilateral	1 (50,0)	1 (50,0)	0.99	0 (0,0)	2 (100,0)	0.07	1 (50,0)	1 (50,0)	0.26	0 (0,0)	2 (100,0)	0.11	0 (0,0)	2 (100,0)	0.07
	Bilateral	9 (33,3)	18 (66,7)		21 (77,8)	6 (22,2)		24 (88,9)	3 (11,1)		19 (70,4)	8 (29,6)		21 (77,8)	6 (22,2)	
	VII _ M N(%)															
	Não afetado	0 (0,0)	1 (100,0)	0.79	1 (100,0)	0 (0,0)	0.55	1 (100,0)	0 (0,0)	0.63	1 (100,0)	0 (0,0)	0.79	1 (100,0)	0 (0,0)	0.55
	Unilateral	4 (44,4)	5 (55,6)		5 (55,6)	4 (44,4)		7 (77,8)	2 (22,2)		5 (55,6)	4 (44,4)		5 (55,6)	4 (44,4)	
	Bilateral	6 (31,6)	13 (68,4)		15 (79,0)	4 (21,1)		17 (89,5)	2 (10,5)		13 (68,4)	6 (31,6)		15 (79,0)	4 (21,1)	
	VII _ I N(%)															
	Não afetado	0 (0,0)	3 (100,0)	0.29	3 (100,0)	0 (0,0)	0.17	2 (66,7)	1 (33,3)	0.05	2 (66,7)	1 (33,3)	0.48	2 (66,7)	1 (33,3)	0.08
	Unilateral	5 (50,0)	5 (50,0)		5 (50,0)	5 (50,0)		7 (70,0)	3 (30,0)		5 (50,0)	5 (50,0)		5 (50,0)	5 (50,0)	
	Bilateral	5 (31,3)	11 (68,8)		13 (81,3)	3 (18,8)		16 (100,0)	0 (0,0)		12 (75,0)	4 (35,0)		14 (87,5)	2 (12,5)	
	VI N(%)															
	Não afetado	2 (40,0)	3 (60,0)	0.99	2 (40,0)	3 (60,0)	0.11	4 (80,0)	1 (20,0)	0.55	2 (40,0)	3 (60,0)	0.31	2 (40,0)	3 (60,0)	0.11
	Afetado	8 (33,3)	16 (66,7)		19 (79,2)	5 (20,8)		21 (87,5)	3 (12,5)		17 (70,8)	7 (29,2)		19 (79,2)	5 (20,8)	
	XII N(%)															
	Não afetado	3 (21,4)	11 (78,6)	0.25	8 (57,1)	6 (42,9)	0.11	10 (71,4)	4 (28,6)	0,04 *	6 (42,9)	8 (57,1)	0,02 *	8 (57,1)	6 (42,9)	0.11
	Afetado	7 (46,7)	8 (53,3)		13 (86,7)	2 (13,3)		15 (100,0)	0 (0,0)		13 (86,7)	2 (13,3)		13 (86,7)	2 (13,3)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher. Diferença significativa para p < 0.05.

Tabela Ap.D8 -Polimorfismos e acometimentos Lower Limb. (N = 30)

		Número de alterações no genótipo dos pacientes**				p-valor *
		0	1	2	3	
CLUFT	Lower Limb N(%)					
	0	5 (41,7)	0 (0,0)	2 (16,7)	5 (41,7)	0,01 *
	1	3 (60,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (40,0)	
	2	-	-	-	-	
	3	12 (92,3)	1 (7,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher.
Diferença significativa para $p < 0.05$.

** Segundo sequência cadastrada em Pubmed - SNP.

Tabela Ap.D9: Intercorrência gestacional, uso de misoprostol durante a gestação e alteração genética (N = 29)

		Intercorrência sem medicamento	Sem intercorrência e sem medicamento	Tomou medicamento	p-valor *
Polimorfismo					
G218A N(%)					
	GA	2 (50,0)	3 (25,0)	6 (46,1)	0.50
	AA	2 (50,0)	9 (75,0)	7 (52,9)	
C243T N(%)					
	CC	4 (100,00)	8 (66,7)	9 (69,2)	0.63
	CT	0 (0,0)	4 (33,3)	4 (30,8)	
A315T N(%)					
	AA	4 (100,0)	11 (91,7)	10 (76,9)	0.63
	AT	0 (0,0)	1 (8,33)	3 (23,1)	
G456A N(%)					
	GG	4 (100,0)	6 (50,0)	9 (69,2)	0.25
	GA	0 (0,0)	6 (50,0)	4 (30,8)	
ins_9pb N(%)					
	não	4 (100,0)	8 (66,7)	9 (69,2)	0.63
	sim	0 (0,0)	4 (33,3)	4 (30,8)	

* A diferença entre os grupos foi testada pelo teste exato de Fisher. Diferença significativa para $p < 0.05$.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CONEP